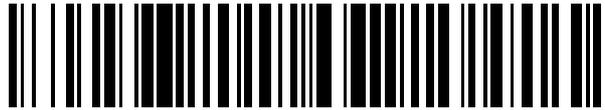


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 928**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2009 E 09737859 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2274622**

54 Título: **Uso de SFRP-3 en la evaluación de la insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

30.04.2008 EP 08008304

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

16.01.2015

73 Titular/es:

**THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY
OF TORONTO (100.0%)
Banting Institute, 100 College Street, Suite 413
Toronto, ON M5G 1L5, CA**

72 Inventor/es:

**WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE;
ARAB, SARA;
BLOCK, DIRK;
EMILI, ANDREW;
GRAMOLINI, ANTHONY;
HESS, GEORG;
HUEDIG, HENDRIK;
LIU, PETER y
MACLENNAN, DAVID**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 526 928 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

Uso de SFRP-3 en la evaluación de la insuficiencia cardíaca

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la insuficiencia cardíaca en un individuo comprendiendo las etapas de a) medir en una muestra obtenida del individuo la concentración del marcador proteína relacionada con Frizzled secretada 3 (SFRP-3), de b) medir opcionalmente en la muestra la concentración de uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y de evaluar la insuficiencia cardíaca comparando la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la(s) concentración/concentraciones determinada(s) en la etapa (b) con la concentración de este marcador o estos marcadores como se establece en una muestra de control. También se divulgan el uso de SFRP-3 como proteína marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca y una combinación de marcadores que comprende SFRP-3.

15 Antecedentes de la invención

La insuficiencia cardíaca (HF) es un importante y creciente problema de salud pública. En los Estados Unidos, por ejemplo, aproximadamente 5 millones de pacientes tienen HF y más de 550.000 pacientes se diagnostican con HF por primera vez cada año (In: American Heart Association, Heart Disease and Stroke Statistics: 2008 Update, Dallas, Texas, American Heart Association (2008)). De forma similar, las estadísticas de los Estados Unidos muestran que la HF es el principal motivo de 12 a 15 millones de visitas al consultorio y 6,5 millones de días de hospitalización cada año. De 1990 a 1999, el número anual de hospitalizaciones se ha incrementado de aproximadamente 810.000 a más de 1 millón para la HF como diagnóstico primario y de 2,4 a 3,6 millones para la HF como diagnóstico primario o secundario. En 2001, casi 53.000 pacientes murieron de HF como causa principal. La insuficiencia cardíaca es principalmente una afección de ancianos, y por tanto, el "envejecimiento de la población" ampliamente reconocido también contribuye al incremento en la incidencia de la HF. La incidencia de la HF se acerca al 10 por 1000 en la población después de los 65 años. Sólo en los EE. UU., los costes directos e indirectos estimados totales para la HF en 2005 fueron aproximadamente de 27,9 miles de millones \$ y anualmente se gastan aproximadamente 2,9 miles de millones \$ en fármacos para el tratamiento de la HF (véanse las estadísticas de la AHA citadas anteriormente).

Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca se caracteriza por una pérdida en la capacidad del corazón de bombear tanta sangre como el cuerpo necesita. Insuficiencia no quiere decir que el corazón haya parado de bombear sino que no bombea la sangre tan eficazmente como debería.

La NYHA [New York Heart Association] y la ACC/AHA [American Association of Cardiology/American Heart Association] han establecido clases funcionales de HF para calibrar la progresión de la enfermedad. El esquema de clasificación de la NYHA tiene cuatro clases de estados de enfermedad: La clase 1 es asintomática para cualquier nivel de esfuerzo. La clase 2 es sintomática para un esfuerzo intenso y las clases III y IV son sintomáticas para un esfuerzo leve y sin esfuerzo, respectivamente.

En el esquema de la ACC/AHA de cuatro fases, la fase A es asintomática pero está en riesgo de desarrollar HF. En la fase B existen pruebas de disfunción cardíaca sin síntomas. En la fase C existen pruebas de disfunción cardíaca con síntomas. En la fase D, el sujeto tiene síntomas de HF a pesar de un tratamiento máximo.

Etiología de HF

Medicamente, la insuficiencia cardíaca (HF) se debe apreciar como una enfermedad compleja. Puede estar provocada por la aparición de un acontecimiento desencadenante tal como un infarto de miocardio (ataque al corazón) o ser secundaria de otras causas tales como hipertensión, diabetes o anomalías cardíacas tales como valvulopatía. El infarto de miocardio u otras causas de HF dan como resultado una disminución inicial en la capacidad de bombeo del corazón, por ejemplo dañando el miocardio. Puede que esta disminución en la capacidad de bombeo no sea perceptible de inmediato, debido a la activación de uno o más mecanismos de compensación. Sin embargo, se ha descubierto que la progresión de la HF es independiente del estado hemodinámico del paciente. Por lo tanto, los cambios perjudiciales provocados por la enfermedad están presentes y son permanentes aún cuando el paciente permanece asintomático. De hecho, los mecanismos de compensación que mantienen la función cardiovascular normal durante las fases tempranas de la HF pueden contribuir realmente a la progresión de la enfermedad a largo plazo, por ejemplo ejerciendo efectos perjudiciales sobre el corazón y su capacidad para mantener un nivel suficiente de flujo sanguíneo en la circulación.

Algunos de los cambios fisiopatológicos más importantes que se producen en la HF son (i) activación del eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal, (ii) disfunción endotelial sistémica y (iii) remodelación miocárdica.

(i) Los tratamientos dirigidos específicamente a contrarrestar la activación del eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal incluyen agentes bloqueantes beta-adrenérgicos (betabloqueantes), inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), determinados bloqueantes de los canales de calcio, nitratos y agentes bloqueantes de la endotelina-1. Los bloqueantes de los canales de calcio y los nitratos, aunque producen una mejora clínica, no han demostrado claramente que prolonguen la supervivencia, mientras que los betabloqueantes y los inhibidores de ACE han demostrado que prolongan significativamente la vida, ya que presentan antagonistas de la aldosterona. Los estudios experimentales que usan agentes bloqueantes de la endotelina-1 han demostrado un efecto beneficioso.

(ii) La disfunción endotelial sistémica es una característica bien reconocida de HF y está claramente presente en el momento en que están presentes signos temporales de insuficiencia ventricular izquierda. La disfunción endotelial es importante con respecto a la relación íntima de la microcirculación miocárdica con los miocitos cardíacos. Las pruebas sugieren que la disfunción microvascular contribuye significativamente a la disfunción de los miocitos y a los cambios morfológicos que dan lugar a una insuficiencia miocárdica progresiva.

En términos de fisiopatología subyacente, las pruebas sugieren que la disfunción endotelial puede estar provocada por una ausencia relativa de NO lo que se puede atribuir a un incremento en la formación de O₂ vascular por una oxidasa dependiente de NADH y la posterior eliminación en exceso de NO. Los posibles factores que contribuyen al incremento en la producción de O₂ incluyen un incremento en el tono simpático, norepinefrina, angiotensina II, endotelina-1 y TNF- α . Además, los niveles de IL-10, un citocina antiinflamatoria clave, son inapropiadamente bajos en relación con los niveles de TNF- α . Ahora se cree que los niveles elevados de TNF- α , con citocinas proinflamatorias asociadas incluyendo IL-6, y receptores de TNF- α solubles, desempeñan un papel significativo en la evolución de la HF provocando una disminución en la contractilidad miocárdica, dilatación biventricular e hipotensión, y probablemente están implicados en la activación y disfunción endotelial. También se cree que TNF- α puede desempeñar un papel en la atrofia muscular hasta el momento inexplicable que se produce en pacientes con HF grave. Los estudios preliminares en pequeños números de pacientes con tratamiento con receptores de TNF solubles han indicado mejoras en la clasificación funcional de NYHA y en el bienestar del paciente, medidos por índices de calidad de vida.

(iii) La remodelación miocárdica es un proceso complejo que acompaña la transición de la insuficiencia cardíaca de asintomática a sintomática, y se puede describir como una serie de cambios adaptivos dentro del miocardio, como alteraciones en la forma, masa y volumen ventriculares (Piano, M.R., et al., J. Cardiovasc. Nurs. 14 (2000) 1-23; Molkentin, J.D., Ann. Rev. Physiol. 63 (2001) 391-426). Los principales componentes de la remodelación miocárdica son las alteraciones en la biología de los miocitos, como la hipertrofia miocitaria, pérdida de miocitos por necrosis o apoptosis, alteraciones en la matriz extracelular y alteraciones en la geometría de la cavidad ventricular izquierda. No queda claro si la remodelación miocárdica es simplemente la respuesta del órgano final que se produce con los años de exposición a los efectos tóxicos de la estimulación neurohormonal a largo plazo, o si la remodelación miocárdica contribuye de forma independiente a la progresión de la insuficiencia cardíaca. Las pruebas hasta la fecha sugieren que un tratamiento apropiado puede ralentizar o detener la progresión de la remodelación miocárdica.

Marcadores y estado de la enfermedad

Como se indica anteriormente, es probable que la hipertrofia miocitaria represente una de las primeras etapas que conduce a la HF. La hipertrofia miocitaria se caracteriza por un incremento en la expresión de algunos genes que codifican proteínas contráctiles, tales como la cadena pesada de p-miosina y la troponina T (TnT), y de algunas proteínas no contráctiles, tales como péptidos natriuréticos de tipo A y de tipo B, por un incremento en el tamaño celular y por alteración citoesquelética (Piano, M.R., et al., J. Cardiovasc. Nurs. 14 (2000) 1-23; Molkentin, J.D., Ann. Rev. Physiol. 63 (2001) 391-426).

Los estudios de modelos humanos y animales de insuficiencia cardíaca sugieren una función miocitaria deprimida en las fases tardías de la insuficiencia cardíaca. Se ha sugerido que los mecanismos que subyacen a la disfunción de los miocitos implican alteraciones en la red encargada del calcio, el miofilamento y el citoesqueleto (de Tombe, P.P., Cardiovasc. Res. 37 (1998) 367-380). Por ejemplo, en modelos humanos y animales de insuficiencia cardíaca, se reduce la actividad enzimática de la calcio-ATPasa del retículo sarcoplásmico, aunque tanto los niveles de ARNm como de proteína del intercambiador de Na⁺/Ca²⁺ del sarcolema se incrementan. Además, se produce intercambio de isoformas de TnT, reducción en la fosforilación de troponina I (TnI), disminución de la actividad ATPasa de actomiosina miofibrilar y potenciación en la formación de microtúbulos en ambos modelos humanos y animales de insuficiencia cardíaca.

Inicialmente, los cambios en el corazón, que dan lugar a la remodelación miocárdica, pretenden compensar las partes enfermas del miocardio con el fin de mantener la demanda corporal de oxígeno y nutrientes. Sin embargo, la fase de compensación de la insuficiencia cardíaca es limitada, y, en última instancia, el corazón defectuoso no puede mantener el gasto cardíaco adecuado para cumplir con las necesidades del cuerpo. Por tanto, existe una transición de una fase de compensación a una fase de descompensación. En la fase de descompensación, la cascada de cambios en el corazón continúa pero ya no es beneficiosa, lo que lleva al paciente a la progresión de la insuficiencia cardíaca a un estado crónico y finalmente a la muerte.

De acuerdo con "ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult" (S. Hunt et al., www.acc.org = las guías de práctica clínica de ACC/AHA) todo el proceso de la enfermedad en el área de la insuficiencia cardíaca se agrupa hoy en día en cuatro fases como se indica anteriormente. En las fases A y B, se encuentran los individuos con riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, mientras que las fases C y D representan los grupos de pacientes que muestran signos y síntomas de insuficiencia cardíaca. Los detalles para definir las diferentes fases de A a D dadas en la referencia anterior están incluidos en el presente documento por referencia.

Procedimientos de diagnóstico en la insuficiencia cardíaca

La única prueba de diagnóstico más útil en la evaluación de pacientes con HF es la ecocardiografía bidimensional exhaustiva acoplada con estudios del flujo Doppler para determinar si están presentes anomalías de miocardio, válvulas cardíacas, o pericardio y qué cavidades están implicadas. Se deben tratar tres cuestiones fundamentales: 1) ¿la LVEF se preserva o se reduce?, 2) ¿la estructura del LV es normal o anormal?, y 3) ¿existen otras anomalías estructurales tales como anomalías valvulares, pericárdicas o ventriculares izquierdas que puedan explicar el cuadro clínico? Se debe cuantificar esta información con una estimación numérica de la EF, medida de las dimensiones y/o volúmenes ventriculares, medida del grosor de las paredes, y evaluación de la geometría de las cavidades y la motilidad regional. Se debe evaluar el tamaño del ventrículo derecho y el funcionamiento sistólico. También se debe determinar el tamaño auricular de forma semicuantitativa y se deben medir los volúmenes y/o dimensiones auriculares izquierdas.

Los datos hemodinámicos no invasivos adquiridos en el momento de la ecocardiografía son un importante correlato adicional para los pacientes con EF preservada o reducida. La cuantificación combinada del patrón de afluencia de la válvula mitral, patrón de llenado venoso pulmonar, y velocidad anular mitral proporciona datos sobre las características del llenado del LV y la presión auricular izquierda. La evaluación del gradiente regurgitante de la válvula tricúspide acoplado con la medida de la dimensión de la vena cava inferior y su respuesta durante la respiración proporciona una estimación de la presión arterial pulmonar sistólica y la presión venosa central.

El volumen sistólico se puede determinar con la medida de las dimensiones y el Doppler pulsado combinados en el cono arterial LV. Sin embargo, se pueden presentar anomalías en cualquiera de estos parámetros en ausencia de HF. Ninguno de estos se correlaciona necesariamente de forma específica con HF; no obstante, un patrón de llenado totalmente normal se opone a la HF clínica.

Desde una perspectiva clínica, la enfermedad es clínicamente asintomática en las fases de compensación y de descompensación temprana (completamente asintomática en la fase A y con cardiopatía estructural pero sin signos ni síntomas de HF en la fase B, véanse las guías de práctica clínica de ACC/AHA). Los signos externos de la enfermedad (tales como la dificultad para respirar) no aparecen hasta bien entrada la fase de descompensación (es decir, las fases C y D de acuerdo con las guías clínicas de ACC/AHA). El diagnóstico actual se basa en los síntomas externos de los pacientes en las fases C y D.

Típicamente, los pacientes con insuficiencia cardíaca reciben un tratamiento estándar con fármacos que interactúan con mecanismos específicos implicados en la insuficiencia cardíaca. No existen pruebas de diagnóstico que reflejen esos mecanismos específicos de forma fiable y que ayuden al médico a elegir el fármaco correcto (y dosis) para cada paciente (por ejemplo, inhibidor de ACE, AT II, betabloqueantes, etc).

Diagnóstico previo de HF con marcadores

Parece que la evaluación temprana de los pacientes con riesgo de insuficiencia cardíaca sólo que es posible con marcadores bioquímicos puesto que el individuo con riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca en esa fase aún está libre de síntomas clínicos de HF. No existen marcadores bioquímicos establecidos actualmente disponibles para una evaluación presintomática fiable de la enfermedad. En el momento en el que se establece el diagnóstico de la HF hoy en día, la enfermedad ya está muy avanzada.

En los últimos años se ha demostrado que la familia de péptidos natriuréticos, en especial la familia de péptidos natriuréticos auriculares y la familia de péptidos natriuréticos cerebrales tienen un valor significativo en la evaluación de la HF.

Pronóstico de HF y necesidad

Debido al menos en parte al diagnóstico tardío, el 50 % de los pacientes con HF mueren dentro del plazo de dos años desde el diagnóstico. La tasa de supervivencia de 5 años es menor del 30 %. Existe una necesidad significativa de nuevos marcadores bioquímicos que ayuden en el diagnóstico temprano de la insuficiencia cardíaca.

Una mejora en la evaluación temprana de los individuos con riesgo de insuficiencia cardíaca, es decir, de individuos que son clínicamente asintomáticos para la insuficiencia cardíaca está justificada.

Se ha establecido en los últimos años que los marcadores de péptidos natriuréticos de tipo B representan una herramienta excelente para el seguimiento de la progresión de la enfermedad en pacientes con HF y para la evaluación del riesgo de complicaciones cardiovasculares, como un ataque al corazón.

5 Sin embargo, al igual que para muchas otras áreas de diagnóstico, un único marcador no es suficiente.

10 Mientras que un valor bajo de NT-proBNP tiene un valor diagnóstico de un resultado negativo muy alto para descartar la HF o LVD, se ha descubierto que el valor diagnóstico de un resultado positivo para la insuficiencia cardíaca en los estudios anteriores y otros estudios (véase, Triepels R.H., et al., Clin. Chem. 49, Supl. A (2003) 37-38) está en el intervalo de un 50-60 %. Un marcador de este tipo útil en la evaluación de individuos con riesgo de insuficiencia cardíaca que por sí mismo tenga una alta mejora en, o en combinación con NT-proBNP, y en comparación con NT-proBNP solo tenga una mejora en el valor diagnóstico de un resultado positivo para HF, es de gran importancia clínica/práctica.

15 Un marcador que ayude en la evaluación de un paciente con insuficiencia cardíaca también es de gran importancia para lograr un progreso técnico adicional en esta área de diagnóstico clínicamente muy importante y difícil.

Sumario de la invención

20 Ahora se ha descubierto y establecido que el marcador proteína relacionada con Frizzled secretada 3 (SFRP-3) puede ayudar en la evaluación de la insuficiencia cardíaca. En un modo de realización puede ayudar a evaluar si un individuo está en riesgo de desarrollar la insuficiencia cardíaca. En otro aspecto, puede ayudar en la evaluación de la progresión de la enfermedad. En otro modo de realización, puede ayudar a predecir la aparición de la insuficiencia cardíaca. En otro modo de realización puede ayudar a evaluar y seleccionar un régimen de tratamiento apropiado para prevenir o tratar la insuficiencia cardíaca.

25 Se divulga en el presente documento un procedimiento para evaluar la insuficiencia cardíaca en un individuo que comprende las etapas de medir en una muestra seleccionada del grupo que consiste en suero, plasma y sangre completa obtenida del individuo, la concentración del marcador SFRP-3, de opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y de evaluar la insuficiencia cardíaca comparando la concentración de SFRP-3 y opcionalmente la(s) concentración/concentraciones del uno o más de otros marcadores con la concentración de este marcador o estos marcadores como se establece en una muestra de control.

30 La invención también se refiere al uso de la proteína SFRP-3 en una muestra seleccionada del grupo que consiste en suero, plasma, y sangre completa como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

35 Se divulga además el uso de una combinación de marcadores que comprende SFRP-3 y uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

40 Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención serán aparentes en vista de la descripción que sigue. Sin embargo, se entenderá que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican modos de realización preferentes de la invención, se presentan únicamente a modo de ilustración, puesto que serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención.

Descripción detallada de la invención

45 En un primer modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la insuficiencia cardíaca en un individuo comprendiendo las etapas de a) medir en una muestra obtenida del individuo la concentración del marcador SFRP-3, b) medir opcionalmente en la muestra la concentración de uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y c) evaluar la insuficiencia cardíaca comparando la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la(s) concentración/concentraciones determinada(s) en la etapa (b) con la concentración de este marcador o estos marcadores como se establece en una muestra de control.

50 Como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con el mismo en esta sección.

55 Los artículos "un/uno" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un anticuerpo" quiere decir un anticuerpo o más de un anticuerpo.

60 La expresión "uno o más" indica de 1 a 50, preferentemente de 1 a 20, también es preferente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 15.

65

El término "marcador" o "marcador bioquímico" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que se va a usar como diana para analizar una muestra de prueba de un paciente. En un modo de realización, los ejemplos de dichas dianas moleculares son proteínas o polipéptidos. Se contempla que las proteínas o polipéptidos usados como marcador en la presente invención incluyen fragmentos naturales de dicha proteína en particular, fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables comprenden preferentemente al menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 o 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. Un experto en la técnica reconocerá que las proteínas que se liberan por las células o que están presentes en la matriz extracelular se pueden dañar, por ejemplo, durante la inflamación, y podrían degradarse o escindirse en dichos fragmentos. Determinados marcadores se sintetizan en una horma inactiva, que se puede activar posteriormente por proteólisis. Como apreciará el experto en la técnica, como parte de un complejo también pueden estar presentes proteínas o fragmentos de las mismas. Dicho complejo también se puede usar como marcador en el sentido de la presente invención. Además, o como alternativa, un polipéptido marcador puede llevar una modificación postraducciona. Los ejemplos de modificaciones postraduccionales, entre otros, son glucosilación, acilación y/o fosforilación.

El término "evaluar la insuficiencia cardíaca" se usa para indicar que el procedimiento de acuerdo con la presente invención ayudará a los médicos a evaluar si un individuo está en riesgo de desarrollar la insuficiencia cardíaca, o ayudará al médico en su evaluación de un paciente con HF en una o varias de otras áreas de relevancia diagnóstica en la HF. Las áreas de relevancia diagnóstica en la evaluación de un individuo con HF son la estadificación de la insuficiencia cardíaca, el diagnóstico diferencial de insuficiencia cardíaca aguda y crónica, la valoración del riesgo de progresión de la enfermedad, la orientación para la selección de un fármaco apropiado, seguimiento de la respuesta al tratamiento y la revisión de los pacientes con HF.

Un "marcador de insuficiencia cardíaca" en el sentido de la presente invención es un marcador que, si se combina con el marcador SFRP-3, añade información relevante en la evaluación de la HF al problema de diagnóstico en investigación. La información se considera relevante o de valor añadido si, a una especificidad dada la sensibilidad, o si a una sensibilidad dada, la especificidad, respectivamente, de la evaluación de HF se puede mejorar incluyendo dicho marcador en una combinación de marcadores que ya comprende el marcador SFRP-3. Preferentemente, la mejora en la sensibilidad o especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa a un nivel de significación de $p = 0,05, 0,02, 0,01$ o inferior. Preferentemente, el uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca se seleccionan del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación.

El término "muestra" como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra biológica obtenida para el propósito de evaluación *in vitro*. En los procedimientos de la presente invención, la muestra o muestra del paciente puede comprender preferentemente cualquier fluido corporal. Las muestras de prueba preferentes incluyen sangre, suero, plasma, orina, saliva y líquido sinovial. Las muestras preferentes son sangre completa, suero, plasma o líquido sinovial, representando plasma o suero el tipo de muestra más conveniente. Como apreciará el experto en la técnica, cualquier evaluación de este tipo se realiza *in vitro*. La muestra del paciente se desecha después. La muestra del paciente sólo se usa para el procedimiento *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere de nuevo al cuerpo del paciente. Típicamente, la muestra es una muestra líquida, por ejemplo, sangre completa, suero o plasma.

La expresión "comparando la concentración ... con la concentración como se establece en una muestra de control" se usa simplemente para ilustrar adicionalmente lo que es igualmente obvio para el experto en la técnica. La muestra de control puede ser una muestra de control interna o externa. En un modo de realización, se usa una muestra de control interna, es decir el/los nivel(es) de marcador(es) se evalúa(n) en la muestra de prueba así como en una o más de otras muestras tomadas del mismo sujeto para determinar si existe cualquier cambio en el/los nivel(es) de dicho(s) marcador(es). En otro modo de realización, se usa una muestra de control externa. Para una muestra de control externa, la presencia o cantidad de un marcador en una muestra derivada del individuo se compara con su presencia o cantidad en un individuo que se sabe que padece, o que se sabe que está en riesgo de, una afección dada; o un individuo que se sabe que está libre de una afección dada, es decir, "individuo normal". Por ejemplo, un nivel de marcador en una muestra del paciente se puede comparar con un nivel que se sabe que está asociado con una evolución específica de enfermedad en la HF. Normalmente, el nivel de marcador de la muestra está directa o indirectamente correlacionado con un diagnóstico y el nivel de marcador se usa, por ejemplo, para determinar si un individuo está en riesgo de HF. De forma alternativa, el nivel de marcador de la muestra se puede comparar, por ejemplo, con un nivel de marcador que se sabe que está asociado con una respuesta al tratamiento en pacientes con HF, el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica, la orientación para la selección de un fármaco apropiado para tratar la HF, la valoración del riesgo de progresión de la enfermedad, o la revisión de los pacientes con HF. Dependiendo del uso de diagnóstico destinado, se elige una muestra de control apropiada y un valor de control o de referencia para el marcador establecido en el mismo. Se apreciará por el experto en la técnica que dicha muestra de control en un modo de realización se obtiene de una población de referencia que sea de la misma edad y que esté libre de enfermedades de confusión. Como también queda claro para el experto en la técnica, los valores de marcadores absolutos establecidos en una muestra de control dependerán del ensayo usado. Preferentemente, se usan muestras de 100 individuos bien caracterizados de la población de referencia apropiada para establecer un valor de control (referencia). También preferente, se puede elegir la población de referencia para

que consista en 20, 30, 50, 200, 500 o 1000 individuos. Los individuos sanos representan una población de referencia preferente para establecer un valor de control.

Proteína relacionada con Frizzled secretada 3 (SFRP-3)

5 Las proteínas Wingless (Wnt) son una gran familia de moléculas de señalización secretadas que regulan aspectos cruciales del desarrollo, incluyendo la especificación del riesgo celular, proliferación, supervivencia, migración y adhesión (véase, Nusse, R., Cell Res. 15 (2005) 28-32). La señalización de Wnt consiste en rutas canónicas y no canónicas. En la ruta de señalización de Wnt canónica, la β -catenina es un mediador clave. La unión al receptor de Wnt activa la molécula de transducción de señal citoplásmica intracelular Dishevelled, que a su vez inactiva un complejo de proteínas que normalmente fosforila la β -catenina y la selecciona como objetivo para su degradación. Tras la estimulación de Wnt, sin embargo, la inhibición del complejo de degradación permite que se acumulen niveles altos de β -catenina en el núcleo, donde se activa la transcripción de genes diana de Wnt.

15 Aunque la ruta de Wnt canónica media en muchos efectos de Wnt, algunos procesos regulados por Wnt son independientes de la β -catenina. Esta señalización de Wnt no canónica a menudo se atribuye a una de las dos rutas denominadas como rutas de Ca^{2+} /proteína cinasa C (PKC) y RhoA/JNK (véase, Veeman, M.T., et al., Developmental Cell 5 (2003) 367-377).

20 Las proteínas relacionadas con Frizzled secretadas (SFRP) son una familia de proteínas solubles. Debido a su homología con el dominio de unión a Wnt en los receptores de Frizzled (Fz), las SFRP se caracterizaron como antagonistas de Wnt. Las SFRP se unen a proteínas Wnt directamente y bloquean ambas rutas de señalización de Wnt canónicas y no canónicas.

25 La familia de SFRP comprende cinco miembros en los seres humanos. Se descubrieron simultáneamente y se nombraron por grupos diferentes pero en la actualidad se designan de forma uniforme como SFRP 1-5. En 1996, se identificó y se aisló el primer miembro de la familia de SFRP (ahora denominado SFRP-3) como un factor condrogénico en extractos de cartílago bovino (Hoang, B., et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 26131-26137, sugieren un papel en la morfogénesis esquelética). La comparación de secuencias y el análisis filogenético muestran que SFRP1, SFRP2 y SFRP5 están estrechamente relacionadas, y se agrupan conjuntamente en un subgrupo que diverge del formado por las SFRP-3 y SFRP4 relacionadas.

35 Las SFRP incorporan dos dominios independientes. El extremo N-terminal contiene un péptido señal de secreción seguido por un dominio rico en cisteína, que es la región de unión a Wnt propuesta. La parte de extremo C-terminal de las proteínas SFRP se caracteriza por segmentos de residuos cargados positivamente y por seis residuos de cisteína adicionales.

40 La proteína relacionada con Frizzled secretada 3 (= SFRP-3) es una proteína modular de 36 kD que se sabe que se secreta en varios tejidos humanos, incluyendo la placenta, corazón, cerebro, músculo esquelético, riñón y páncreas, pulmón e hígado. En la literatura, esta molécula también se ha denominado FRE; FRITZ; FZRB; FRP 3; proteína relacionada con Frizzled; FRZB PEN; hFIZ; FRZB 1; PROTEÍNA RELACIONADA CON FRIZZLED 1; OASF, OA.

45 Aún no se han establecido claramente los papeles biológicos de SFRP-3. Los datos experimentales se refieren a varias acciones para SFRP-3 y se han revisado por Bovolenta, P., et al. (J. Cell Sci. 121 (2008) 737-746).

Durante el desarrollo fetal y embrionario, la SFRP-3 se expresa principalmente en el hueso lo que implica su papel en el desarrollo del esqueleto.

50 Recientes estudios han revelado que la SFRP-3 es un candidato oncoinhibidor. La expresión de SFRP-3 con frecuencia está silenciada por la hipermetilación del promotor en una variedad de cánceres. Se ha demostrado que la expresión restablecida de SFRP-3 inhibe el crecimiento celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo*. Se describe que la SFRP-3 se pierde o se regula por disminución en carcinomas invasivos, tales como en tumores de mama, gástrico, cervical, hepatocelular y de próstata (Shi, Y., et al., Acta Pharmacol Sin. 28 (2007) 1499-1504).

55 Se ha informado de polimorfismos de SFRP-3 asociados con una susceptibilidad para la artrosis (Rodríguez-López, J., et al., Ann. Rheum. Dis. 66 (2007) 1052-1055).

60 Un estudio que examinaba la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga demostró que los niveles de ARNm de SFRP-3 y SFRP-4 no se correlacionaban con la expresión de la proporción Fas proapoptótico/Fas-antagónico (Schumann, H., et al., Cardiovasc. Res. 45 (2000) 720-728). Además, la expresión diferencial del ARNm de SFRP-3 se midió en pacientes que padecen distrofias musculares (Chen, Y.W., et al., J. Cell. Biology 151 (2000) 1321-1336).

Varias solicitudes de patente tratan la utilidad potencial de las SFRP como agentes de diagnóstico, agentes preventivos y agentes terapéuticos para una amplia variedad de enfermedades bastante diferentes.

65

El documento WO 2004/053063 se refiere a la detección de SFRP-3 expresada diferencialmente al nivel de ácido nucleico o proteína para el diagnóstico de osteopatía en un paciente que padece mieloma múltiple.

5 El documento WO 2006/081379 usa la determinación inmunológica de la SFRP-3 para evaluar la presencia de actividad de proteína morfogénica ósea (BMP) en una célula.

El documento US 2004/849643 reivindica el uso de SFRP-3 para el tratamiento de osteopatías y el documento WO 2006/130076 se refiere más específicamente al uso de SFRP-3 en el tratamiento de la artrosis.

10 El documento WO 2007/082733 divulga la determinación inmunológica de la SFRP-3 circulante en suero y/u orina y su aplicación de diagnóstico opcional para detectar la poliquistosis renal.

15 El documento WO 2005/070448 especula que se puede usar la SFRP-3 para el diagnóstico y tratamiento de una gran variedad de enfermedades inmunitarias y proliferativas. Se afirma que se puede usar como agente terapéutico para un tumor de ovario, colon, páncreas, mesotelioma, mama, riñón, cuello uterino y vejiga. Además, se afirma que se puede usar la SFRP-3 tanto para el tratamiento de inflamación o de una enfermedad autoinmunitaria como para el tratamiento de una osteopatía o enfermedad de cartílago.

20 El documento WO 2008/031009 proporciona varios antagonistas de Wnt quiméricos para el uso diagnóstico y terapéutico en asociación con la trastornos mediados por Wnt y de señalización de Wnt celulares, incluyendo cáncer. Una construcción comprende secuencias de SFRP-3.

25 El documento WO 2004/050894 describe un procedimiento de cribado de compuestos terapéuticos potenciales para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva. Se enumeran más de 90 secuencias de ARNm como implicadas en la progresión de la insuficiencia cardíaca y en la recuperación miocárdica endógena y mecanismos de reparación. Estas secuencias proporcionan la base para el cribado de compuestos terapéuticos potenciales. Una de las secuencias génicas enumeradas es la de la SFRP-3.

30 El documento WO 1999/000138 describe el uso de la SFRP-3 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El documento WO 2007/022515 describe el uso de la SFRP-3 para reducir la muerte celular y /o lesión tisular asociada con afecciones isquémicas.

35 El documento WO 2004/103394 se refiere al uso de la SFRP-3 como agente terapéutico en el contexto de la modulación de la regeneración nerviosa.

40 El documento WO 2004/1135 especula sobre el uso de varias SFRP (por ejemplo, SFRP-3) dentro de una composición farmacéutica para modular la proliferación, diferenciación o tanto la proliferación como la diferenciación en células madre en un sujeto.

Parece que en la técnica anterior, no se sabe si la presencia o el nivel de la proteína SFRP-3 tiene una utilidad de diagnóstico en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

45 Los inventores de la presente invención han descubierto ahora y pueden establecer que un incremento en el valor de la SFRP-3 medido a partir de una muestra de fluido corporal derivada de un individuo es indicativo de insuficiencia cardíaca.

50 Los valores para la SFRP-3 medidos en un grupo de control o una población de control se usan, por ejemplo, para establecer un valor de corte o un intervalo de referencia. Un valor por encima de dicho valor de corte o fuera del intervalo de referencia y su extremo más alto se considera elevado.

En un modo de realización, se establece un valor de corte fijo. Dicho valor de corte se elige para que coincida el problema de diagnóstico de interés.

55 En un modo de realización, los valores para la SFRP-3 medidos en un grupo de control o una población de control se usan para establecer un intervalo de referencia. En un modo de realización preferente, se considera que una concentración de SFRP-3 es elevada si el valor medido está por encima del percentil 90 del intervalo de referencia. En otros modos de realización preferentes, se considera que una concentración de SFRP-3 es elevada si el valor medido está por encima del percentil 95, del percentil 96, del percentil 97 o del percentil 97,5 del intervalo de referencia.

60 En un modo de realización, la muestra de control será una muestra de control interna. En este modo de realización, se obtienen muestras en serie del individuo en investigación y se comparan los niveles de marcadores. Esto puede ser útil, por ejemplo, en la evaluación de la eficacia del tratamiento.

65 El procedimiento de acuerdo con la presente invención se basa en una muestra de líquido obtenida de un individuo y en la medida de la SFRP-3 en dicha muestra. Un "individuo", como se usa en el presente documento, se refiere a un único organismo humano o no humano. Por tanto, los procedimientos y composiciones descritos en el presente

documento son aplicables tanto a enfermedades humanas como veterinarias. Preferentemente, el individuo es un sujeto humano.

5 Preferentemente, el marcador SFRP-3 se mide específicamente a partir de una muestra de líquido por el uso de un agente de unión específico.

10 Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor para SFRP-3, una unión de lectina a SFRP-3 o un anticuerpo para SFRP-3. Un agente de unión específico tiene al menos una afinidad de 10^7 l/mol por su correspondiente molécula diana. El agente de unión específico tiene una afinidad de 10^8 l/mol o aún más preferente de 10^9 l/mol por su molécula diana. Como apreciará un experto en la técnica, el término específico se usa para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para SFRP-3. Preferentemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta de la molécula diana da como resultado una afinidad de unión que es sólo de un 10 % o menor, más preferentemente sólo de un 5 % o menor de la afinidad para la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específico preferente cumplirá los criterios mínimos anteriores de afinidad así como los de especificidad.

15 Un agente de unión específico es preferentemente un anticuerpo reactivo con SFRP-3. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos, anticuerpos monocatenarios así como construcciones genéticas que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

20 Se puede usar cualquier fragmento de anticuerpo que retenga los criterios anteriores de un agente de unión específico. Los anticuerpos se generan por procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo, como se describe en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1990), todo el libro, en especial las páginas 43-78). Además, el experto en la técnica es muy consciente de los procedimientos basados en inmunoabsorbentes que se pueden usar para el aislamiento específico de anticuerpos. Por estos medios, se puede potenciar la calidad de los anticuerpos policlonales y por tanto su rendimiento en los inmunoensayos (Tijssen, P., *supra*, páginas 108-115).

25 Para los logros divulgados en la presente invención, se pueden usar los anticuerpos policlonales que se presentan en cabras. Sin embargo, claramente también se pueden usar anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo, ratas, conejos o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Puesto que los anticuerpos monoclonales se pueden producir en cualquier cantidad requerida con propiedades constantes, representan herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica.

30 La generación y el uso de los anticuerpos monoclonales para SFRP-3 en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, respectivamente, representan aún otros modos de realización preferentes.

35 No es fácil purificar SFRP-3 a partir de una fuente natural. La producción recombinante de SFRP-3 es un procedimiento de elección para obtener mayores cantidades de SFRP-3. En un modo de realización preferente, la SFRP-3 se produce por expresión recombinante usando un sistema de expresión eucariota. Los ejemplos de sistemas de expresión eucariota son expresión en baculovirus, expresión en levaduras y expresión en un sistema de expresión de mamífero. En un modo de realización preferente, la expresión de SFRP-3 se realizará en un sistema de expresión de mamífero. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamífero son células CHO, células HEK, células de mieloma, etc. En otro modo de realización preferente, la SFRP-3 producida de forma recombinante se usa como antígeno en la producción de anticuerpos poli o monoclonales frente a SFRP-3. También puede ser preferente purificar anticuerpos policlonales por inmunoadsorción sobre un inmunoadsorbente de SFRP-3 que hace uso de una SFRP-3 producida de forma recombinante, como se describe en el presente documento anteriormente.

40 Como apreciará el experto en la técnica, ahora que se ha identificado la SFRP-3 como marcador que es útil en la evaluación de HF, se pueden usar formas alternativas para lograr un resultado comparable con los logros de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Dichas estrategias comprenden, entre otras, el uso de péptidos sintéticos o recombinantes, que representan un epítipo clínicamente relevante de SFRP-3 para inmunización. De forma alternativa, se puede usar la inmunización de ADN también conocida como vacunación de ADN.

45 Para la medida, se incubaba la muestra de líquido obtenida de un individuo con el agente de unión específico para SFRP-3 bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo agente de unión - SFRP-3. No es necesario especificar dichas condiciones, ya que el experto, sin ningún esfuerzo inventivo, puede identificar fácilmente dichas condiciones de incubación apropiadas. Se mide la cantidad de complejo agente de unión - SFRP-3 y se usa en la evaluación de HF. Como apreciará el experto en la técnica, existen numerosos procedimientos para medir la cantidad del complejo agente de unión específico - SFRP-3, todos descritos en detalle en libros relevantes (véase, por ejemplo, Tijssen P., *supra*, o Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (eds.), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996)).

50 Preferentemente, la SFRP-3 se detecta en un formato de ensayo de tipo sándwich. En un ensayo de este tipo, por un lado se usa un primer agente de unión específico para capturar la SFRP-3 por un lado, y por otro lado se usa un

segundo agente de unión específico, que está etiquetado para que sea directa o indirectamente detectable. Preferentemente, se usa un anticuerpo para SFRP-3 en un inmunoensayo cualitativo (SFRP-3 presente o ausente) o cuantitativo (se determina la cantidad de SFRP-3).

5 Como se describe en detalle en la sección de ejemplos, se han usado dos modelos de ratón para identificar ARNm y polipéptidos hallados en tejido cardíaco de animales de experimentación por procedimientos de micromatrices y
 10 polipéptidos avanzados. Sin embargo, estos modelos proporcionaron al menos en parte datos discordantes, y, por supuesto los datos de tejido 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 descubrió que se expresaba diferencialmente en
 15 un modelo puede que no se exprese diferencialmente en un segundo modelo o incluso que muestre datos discordantes aún en otro modelo. Se puede descubrir que el ARNm expresado diferencialmente no se correlaciona con niveles potenciados de los polipéptidos respectivos en la circulación. Incluso si una proteína se puede expresar diferencialmente en tejido, en la mayoría de los casos esta proteína no tiene relevancia diagnóstica alguna si se mide a partir de un fluido corporal, ya que puede que no se libere a la circulación, puede que se fragmente o se modifique, por ejemplo, tras la liberación a partir de una célula o tejido, puede que no sea estable en la circulación, puede que no sea medible en la circulación, puede que no sea específica para una enfermedad dada, etc.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención son capaces de detectar la proteína SFRP-3 en una muestra de fluido corporal. Incluso más sorprendentemente, son capaces de demostrar que la presencia de SFRP-3
 20 en dicha muestra de líquido obtenida de un individuo se puede correlacionar con HF. No se requiere ninguna muestra de tejido ni de biopsia para hacer uso del marcador SFRP-3 en la evaluación de HF. Se considera que medir el nivel de proteína SFRP-3 es muy ventajoso en el campo de HF.

En un modo de realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se practica con suero como material de muestra de líquido. En otro modo de realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se practica con plasma como material de muestra de líquido. En otro modo de realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se practica con sangre completa como material de muestra de líquido.

30 En otro modo de realización preferente, la presente invención se refiere al uso de la proteína SFRP-3 como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca a partir de una muestra de líquido obtenida de un individuo.

El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un único acontecimiento o proceso provoque la enfermedad respectiva como, por ejemplo, en enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, el diagnóstico correcto puede ser muy difícil, en especial cuando la etiología de la enfermedad no se entiende totalmente, como es el caso de HF. Como apreciará el experto en la técnica, ningún marcador bioquímico en el campo de la HF se diagnostica con una especificidad del 100 % y al mismo tiempo con una sensibilidad del 100 % para un determinado problema diagnóstico. Más bien, se usan marcadores bioquímicos para evaluar con una determinada probabilidad o valor predictivo un problema diagnóstico subyacente. El experto en la técnica está totalmente familiarizado con los procedimientos matemáticos/estadísticos que se usan rutinariamente para calcular un riesgo relativo o la probabilidad del problema diagnóstico que se evalúa. En la práctica clínica rutinaria, en general, varios síntomas clínicos y marcadores biológicos se consideran conjuntamente por un médico en el diagnóstico, tratamiento, y abordaje de la enfermedad subyacente.

45 Preferentemente, en otro modo de realización preferente de la presente invención, el procedimiento para la evaluación de HF se realiza midiendo la concentración de SFRP-3 y de uno o más de otros marcadores y usando la concentración de SFRP-3 y del otro o más de otros marcadores en la evaluación de HF.

En la evaluación de HF, el marcador SFRP-3 ayudará al médico en uno o más de los siguientes aspectos: evaluar el riesgo para un individuo de insuficiencia cardíaca o evaluar un paciente que tiene insuficiencia cardíaca, por ejemplo, con la intención de identificar la fase de insuficiencia cardíaca, diferenciar entre insuficiencia cardíaca aguda y crónica, valorar el riesgo de progresión de la enfermedad, proporcionar orientación para la selección de un tratamiento apropiado, seguir la respuesta del paciente al tratamiento, y seguir la evolución de la enfermedad, es decir, en la revisión de los pacientes con HF.

55 Cribado (evaluación de si los individuos están en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca):

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para evaluar si un individuo esté en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador SFRP-3, de opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y de evaluar el riesgo de dicho individuo de desarrollar insuficiencia cardíaca comparando la concentración para SFRP-3 y opcionalmente la(s) concentración/concentraciones determinada(s) para el opcionalmente uno o más de otros marcadores con la concentración de este marcador o estos marcadores con su o sus valores de referencia.

65

5 El cribado en el sentido de la presente invención se refiere a la evaluación objetiva de individuos con respecto a su riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Mientras que dicho cribado se puede realizar, en teoría, en cualquier muestra, en la práctica clínica dicha opción de cribado se dará normalmente en individuos de algún modo en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Como se analiza anteriormente, dichos individuos pueden ser clínicamente
 5 asintomáticos, es decir, no tienen signos ni síntomas de HF. En un modo de realización preferente, el cribado para HF se dará para individuos con riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, por ejemplo que entran en las fases A o B como se define por las guías de práctica clínica de ACC/AHA.

10 Como se menciona anteriormente, la insuficiencia cardíaca es una de las enfermedades más prevalentes, costosas y potencialmente mortales en los países desarrollados. Debido a su alta prevalencia y a su larga fase asintomática, la identificación de los individuos con riesgo de desarrollar HF sería de suma importancia para intervenir en y si fuera posible interrumpir la evolución de la enfermedad. Sin una evaluación del riesgo muy temprana, parece imposible la prevención de la progresión de la enfermedad del estado asintomático a una fase sintomática de HF.

15 El riesgo de insuficiencia cardíaca se evalúa por procedimientos matemáticos/estadísticos totalmente conocidos y entendidos por el experto en la técnica. Preferentemente, el riesgo para un individuo de insuficiencia cardíaca se expresa en términos relativos y se da como el denominado riesgo relativo (= RR). Para calcular dicho RR de insuficiencia cardíaca, se compara el valor para SFRP-3 de un individuo con los valores establecidos para SFRP-3 en una población de referencia, preferentemente individuos sanos que no desarrollan insuficiencia cardíaca. También
 20 preferente, la evaluación de dicho RR de insuficiencia cardíaca se basa en un grupo de individuos que han desarrollado insuficiencia cardíaca dentro del periodo de estudio, preferentemente dentro de uno o además preferente dentro de dos años, y un grupo de individuos que no desarrolló insuficiencia cardíaca en el mismo periodo de estudio.

25 En otro modo de realización preferente, la presente invención se refiere al uso del marcador SFRP-3 en el cribado de insuficiencia cardíaca. Como conoce el experto en la técnica, el término "uso como marcador" implica que la concentración de una molécula marcadora se cuantifica por medios apropiados y que el valor medido para dicho marcador se usa a continuación para indicar, es decir para marcar, la presencia o ausencia de una enfermedad o afección clínica. Los medios apropiados para la cuantificación son, por ejemplo agentes de unión específicos, como anticuerpos.
 30

Preferentemente, el cribado para HF se realizará en individuos que se sospecha que están en riesgo de insuficiencia cardíaca en el futuro. Los pacientes con riesgo de insuficiencia cardíaca en el futuro en este sentido son pacientes diagnosticados con hipertensión, enfermedad aterosclerótica, diabetes, obesidad y síndrome metabólico. Preferentemente, el riesgo de insuficiencia cardíaca en el futuro se evalúa con individuos que padecen hipertensión,
 35 enfermedad aterosclerótica, diabetes, y/o síndrome metabólico.

También es preferente el uso del marcador SFRP-3 en la evaluación del riesgo de insuficiencia cardíaca en el futuro para un individuo en la fase B de acuerdo con la guía de práctica clínica de ACC/AHA, es decir, un individuo que presenta un cambio estructural en el corazón pero que no muestra síntomas de insuficiencia cardíaca.
 40

En otro modo de realización preferente, la presente invención se refiere al uso de SFRP-3 como un marcador de una combinación de marcadores de HF para propósitos de cribado de HF.

45 En el contexto de cribado, un nivel elevado de SFRP-3 es un indicador positivo de un incremento en el riesgo de que un individuo desarrolle insuficiencia cardíaca.

Estadificación de los pacientes

50 En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* que ayuda en la estadificación de los pacientes con insuficiencia cardíaca, que comprende las etapas de a) medir en una muestra la concentración del marcador SFRP-3, de b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y estadificar la insuficiencia cardíaca comparando la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la(s) concentración/concentraciones determinada(s) en la etapa (b) con la concentración de este marcador o estos marcadores con su o sus valores de referencia. Preferentemente, el nivel de
 55 marcador SFRP-3 se usa como ayuda en la clasificación de los individuos investigados en los grupos de individuos que son clínicamente "normales" (es decir, individuos en la fase A de acuerdo con la clasificación de ACA/ACC), pacientes asintomáticos que tienen una cardiopatía estructural (fase B de acuerdo con la clasificación de ACA/ACC) y el grupo de pacientes que tienen insuficiencia cardíaca (es decir, pacientes en la fase C o fase D de acuerdo con la clasificación de ACA/ACC).
 60

Diferenciación entre una complicación cardíaca aguda y una enfermedad cardíaca crónica

65 En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* que ayuda en el diagnóstico diferencial entre una complicación cardíaca aguda y una cardiopatía crónica, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador SFRP-3, de opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y establecer un diagnóstico diferencial entre una

complicación cardíaca aguda y cardiopatía crónica comparando la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la(s) concentración/concentraciones determinada(s) en la etapa (b) con la concentración de este marcador o estos marcadores con su o sus valores de referencia.

5 El experto en la técnica está familiarizado con los significados de "complicación cardíaca aguda" y de "cardiopatía crónica".

Preferentemente, una "complicación cardíaca aguda" se refiere a una afección, enfermedad o disfunción aguda del corazón, en particular a insuficiencia cardíaca aguda, por ejemplo, infarto de miocardio (MI) o arritmia. Dependiendo del grado de un MI, puede estar seguido de LVD y CHF.

Preferentemente, una "cardiopatía crónica" es un debilitamiento en la actividad cardíaca, por ejemplo, debido a isquemia del corazón, arteriopatía coronaria, o infarto(s) de miocardio previo(s), en particular pequeño(s) (posiblemente seguido de LVD progresiva). También puede ser un debilitamiento debido a enfermedades inflamatorias, defectos en válvula cardíaca (por ejemplo, defectos en la válvula mitral), miocardiopatía dilatada, miocardiopatía hipertrófica, defectos en el ritmo cardíaco (arritmias), y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Por tanto, queda claro que una cardiopatía crónica también puede incluir pacientes que han padecido un síndrome coronario agudo, por ejemplo, MI, pero que actualmente no padecen una complicación cardíaca aguda.

20 Es importante diferenciar entre un complicación cardíaca aguda y cardiopatía crónica, debido a que una complicación cardíaca aguda y cardiopatía crónica pueden requerir regímenes de tratamiento bastante diferentes. Por ejemplo, para un paciente que presenta infarto de miocardio agudo puede ser de suma importancia tratamiento previo para la revascularización. Mientras que un tratamiento para la revascularización realizado en un paciente con insuficiencia cardíaca crónica a lo sumo es de muy poco o ningún daño para este paciente.

25 En otro modo de realización preferente de acuerdo con la presente invención, el marcador SFRP-3 se usa en el diagnóstico diferencial de insuficiencia cardíaca aguda y crónica.

30 Evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para evaluar el riesgo en un paciente con HF de progresión de la enfermedad, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador SFRP-3, de opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y de establecer el riesgo para dicho individuo de progresión de la enfermedad comparando la concentración para SFRP-3 y opcionalmente la(s) concentración/concentraciones determinada(s) para el opcionalmente uno o más de otros marcadores con la concentración de este marcador o estos marcadores con su o sus valores de referencia.

40 En la actualidad, es muy difícil evaluar o incluso predecir con una probabilidad razonable si un paciente diagnosticado con HF tiene un estado más o menos estable o si la enfermedad progresará y el estado de salud del paciente como resultado es probable que empeore. Normalmente, la gravedad y la progresión de la insuficiencia cardíaca se establecen clínicamente evaluando los síntomas clínicos o por la identificación de cambios adversos usando tecnologías de formación de imágenes tales como ecocardiografía. En un modo de realización, el empeoramiento de la insuficiencia cardíaca se establece por el seguimiento de la fracción de expulsión ventricular izquierda (LVEF). Un deterioro en la LVEF de un 5 % o más se considera como progresión de la enfermedad.

45 En otro modo de realización preferente, la presente invención, por tanto, se refiere al uso del marcador SFRP-3 en la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad para un paciente que padece HF. En la evaluación de la progresión de la enfermedad para pacientes que padecen HF, un nivel elevado de SFRP-3 es un indicador de un incremento en el riesgo de progresión de la enfermedad.

50 Orientación en la selección de un tratamiento de HF apropiado

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro*, que ayuda en la selección de un tratamiento de HF apropiado, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador SFRP-3, de opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y de seleccionar un tratamiento apropiado comparando la concentración para SFRP-3 y opcionalmente la(s) concentración/concentraciones determinada(s) para el opcionalmente uno o más de otros marcadores con la concentración de este marcador o estos marcadores con su o sus valores de referencia.

60 Se espera que el marcador SFRP-3 sirva para ayudar al médico a seleccionar el régimen de tratamiento más apropiado a partir de diversos regímenes de tratamiento en cuestión en el área de insuficiencia cardíaca. En otro modo de realización preferente, por tanto, se refiere al uso del marcador SFRP-3 en la selección de un régimen de tratamiento para un paciente que padece HF.

65 Seguimiento de la respuesta de un paciente al tratamiento

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento in vitro para el seguimiento de la respuesta de un paciente al tratamiento de HF, que comprende las etapas de a) medir en una muestra la concentración del marcador SFRP-3, de b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y de seguir la respuesta de un paciente al tratamiento de HF comparando la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la(s) concentración/concentraciones determinada(s) en la etapa (b) con la concentración de este marcador o estos marcadores con su o sus valores de referencia.

De forma alternativa, el procedimiento anterior para el seguimiento de la respuesta de un paciente al tratamiento se puede practicar estableciendo el nivel de marcador pre- y post-terapéutico para SFRP-3 y para el opcionalmente uno o más de otros marcadores y comparando el/los nivel(es) pre- y post-terapéutico(s).

El diagnóstico de insuficiencia cardíaca se establece clínicamente. De acuerdo con la presente invención, HF se considera clínicamente establecido si un paciente cumple los criterios de las fases C o D como se define por la guía de práctica clínica de ACC/AHA. De acuerdo con esta guía clínica la fase C se refiere a pacientes con cardiopatía estructural y con síntomas previos o actuales de insuficiencia cardíaca. Los pacientes en la fase D son aquellos pacientes con insuficiencia cardíaca resistente al tratamiento que requieren intervenciones especializadas.

Como se indica además anteriormente, los valores medidos para NT-proBNP están altamente correlacionados con la gravedad de la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, parece que tanto BNP como NT-proBNP no son ideales en el seguimiento de la respuesta de un paciente al tratamiento, véase, por ejemplo, Beck-da-Silva, L., et al., Congest. Heart Fail. 11 (2005) 248-253, cuestionario 254-255.

Parece que el marcador SFRP-3 es apropiado para el seguimiento de la respuesta de un paciente al tratamiento. Por tanto, la presente invención también se refiere al uso de SFRP-3 en el seguimiento de la respuesta de un paciente al tratamiento. En el área de diagnóstico, también se puede usar el marcador SFRP-3 para establecer un valor de referencia antes del tratamiento y para medir la SFRP-3 en un punto temporal o en varios puntos temporales después del tratamiento. En la revisión de los pacientes con HF, un nivel elevado de SFRP-3 es un indicador positivo para un tratamiento eficaz de HF.

Combinación de marcadores

Los marcadores bioquímicos se pueden determinar individualmente o bien, en un modo de realización preferente de la invención, se pueden medir simultáneamente usando una tecnología de matrices a base de chips o perlas. A continuación, las concentraciones de los biomarcadores se interpretan de forma independiente usando un valor de corte del individuo para cada marcador o se combinan para su interpretación, es decir, forman una combinación de marcadores.

Como apreciará el experto en la técnica, la etapa de correlacionar un nivel de marcadores con una cierta probabilidad o riesgo se puede realizar y lograr de diferentes formas. Preferentemente, los valores medidos para el marcador SFRP-3 y el uno o más de otros marcadores se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con el problema diagnóstico subyacente. Los valores de marcadores se pueden combinar con la medida de SFRP-3 por cualquier procedimiento matemático del estado de la técnica apropiado.

Preferentemente, el algoritmo matemático aplicado en la combinación de marcadores es una función logística. El resultado de aplicar dicho algoritmo matemático o dicha función logística, preferentemente, es un único valor. Dependiendo del problema diagnóstico subyacente, se puede correlacionar fácilmente dicho valor con, por ejemplo, el riesgo para un individuo de insuficiencia cardíaca o u otros usos de diagnóstico destinados útiles en la evaluación de pacientes con HF. En una forma preferente, dicha función logística se obtiene por a) clasificación de individuos en los grupos, por ejemplo, en normales, individuos con riesgo de insuficiencia cardíaca, pacientes con insuficiencia cardíaca aguda o crónica etc., b) identificación de marcadores que difieren significativamente entre estos grupos por análisis univariante, c) análisis de regresión logístico para evaluar los valores discriminatorios independientes de marcadores útiles en la evaluación de estos grupos diferentes y d) construcción de la función logística para combinar los valores discriminatorios independientes. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes pero representan una combinación de marcadores.

En un modo de realización preferente, la función logística usada para combinar los valores para SFRP-3 y el valor de al menos otro marcador se obtiene por a) clasificación de individuos en los grupos de normales e individuos con riesgo de insuficiencia cardíaca, respectivamente, b) establecer los valores para SFRP-3 y el valor del al menos otro marcador c) realizar un análisis de regresión logístico y d) construcción de la función logística para combinar los valores de marcador para SFRP-3 y el valor del al menos otro marcador.

Una función logística para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad emplea preferentemente un algoritmo desarrollado y obtenido aplicando procedimientos estadísticos. Los procedimientos estadísticos apropiados son, por ejemplo, análisis discriminante (DA) (es decir, DA lineal, cuadrático, regularizado), procedimientos de núcleo (es decir, SVM), procedimientos no paramétricos (es decir, clasificadores del vecino k más

próximo), PLS (mínimos cuadrados parciales), procedimientos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, procedimientos de bosques aleatorios, procedimientos de "boosting"/"bagging"), modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística), procedimientos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), modelos aditivos generalizados, procedimientos basados en lógica difusa, procedimientos basados en redes neuronales y algoritmos genéticos. El experto en la técnica no tendrá problema en seleccionar un procedimiento estadístico apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención y de este modo obtener un algoritmo matemático apropiado. Preferentemente, el procedimiento estadístico empleado para obtener el algoritmo matemático usado en la evaluación de la insuficiencia cardíaca se selecciona de DA (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrático, regularizado), procedimientos de núcleo (es decir, SVM), procedimientos no paramétricos (es decir, clasificadores del vecino k más próximo), PLS (mínimos cuadrados parciales), procedimientos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, procedimientos de bosques aleatorios, procedimientos "boosting") o modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística). Los detalles relativos a estos procedimientos estadísticos se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I., et al., *J. of Computational and Graphical Statistics* 12 (2003) 475-511; Friedman, J.H., *J. of the American Statistical Association* 84 (1989) 165-175; 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 (2001) 5-32; 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 modo de realización preferente de la invención el uso de un valor de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y la discriminación del estado A del estado B, por ejemplo, normales e individuos con riesgo de insuficiencia cardíaca, pacientes con HF que responden al tratamiento y fallos en el tratamiento, pacientes que tienen una insuficiencia cardíaca aguda y pacientes con HF que tienen una insuficiencia cardíaca crónica, pacientes con HF que muestran progresión de la enfermedad y pacientes con HF que no muestran progresión de la enfermedad, respectivamente.

El área bajo la curva de eficacia diagnóstica (=AUC) es un indicador del rendimiento o la precisión de un procedimiento de diagnóstico. La precisión de un procedimiento de diagnóstico se describe mejor por sus características de eficacia diagnóstica (ROC) (véase en especial, Zweig, M.H., y Campbell, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC es una curva de todos los pares de sensibilidad/especificidad que resultan de variar continuamente el valor umbral de decisión en todo el intervalo de datos observado.

El rendimiento clínico de una prueba de laboratorio depende de su precisión diagnóstica, o la capacidad para clasificar correctamente sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La precisión diagnóstica mide la capacidad de la prueba para distinguir correctamente dos afecciones diferentes de los sujetos investigados. Dichas afecciones son, por ejemplo, sano y enfermedad o progresión de la enfermedad frente a no progresión de la enfermedad.

En cada caso, la curva ROC representa el solapamiento entre las dos distribuciones representando la sensibilidad frente a 1 - especificidad, para el intervalo completo de los valores umbrales de decisión. En el eje y está la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos [definida como (número de resultados de la prueba de positivos verdaderos)/(número de resultados de prueba de positivos verdaderos + negativos falsos)]. Esto también se ha denominado como positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x está la fracción de positivo falso, o 1 - especificidad [definida como (número de resultados positivos falsos)/(número de resultados negativos verdaderos + número de resultados positivos falsos)]. Es un índice de especificidad y se calcula totalmente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de positivos verdaderos y falsos se calculan totalmente por separado, al usar los resultados de la prueba de dos subgrupos diferentes, la curva ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto en la curva ROC representa un par de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un valor umbral de decisión particular. Una prueba con discriminación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene una curva ROC que pasa a través de la esquina izquierda superior, donde la fracción de positivos verdaderos es de 1,0, o del 100 % (sensibilidad perfecta), y la fracción de positivos falsos es de 0 (especificidad perfecta). La curva teórica para una prueba sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina izquierda inferior hasta la esquina derecha superior. La mayoría de las curvas están entre estos dos extremos. (Si la curva ROC cae completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se remedia fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor que" a "menor que" o viceversa). De forma cualitativa, cuanto más cerca esté la curva de la esquina izquierda superior, mayor será la precisión global de la prueba.

Un objetivo conveniente de cuantificar la precisión diagnóstica de una prueba de laboratorio es expresar su rendimiento por un único número. La medida global más común es el área bajo la curva ROC (AUC). Por convención, este área es siempre > 0,5 (si no, se puede invertir el criterio de decisión para que así sea). Los valores varían entre 1,0 (separación perfecta de los valores de prueba de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia distributiva aparente entre los dos grupos de los valores de prueba). El área no depende sólo de una porción particular de la curva tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad a una especificidad del 90 %, sino de toda la curva. Esta es una expresión cuantitativa, descriptiva, de lo cerca que está la curva ROC de ser perfecta (área =1,0).

La sensibilidad de ensayo global dependerá de la especificidad requerida para practicar el procedimiento divulgado aquí. En determinados ajustes preferentes, una especificidad de un 75 % puede ser suficiente y los procedimientos estadísticos y algoritmos resultantes pueden estar basados en este requisito de especificidad. En un modo de realización preferente, el procedimiento usado para evaluar individuos con riesgo de insuficiencia cardíaca se basa en una especificidad de un 80 %, de un 85 %, o también preferente de un 90 % o de un 95 %.

Como se analiza anteriormente, el marcador SFRP-3 ayuda a evaluar el riesgo de un individuo de desarrollar insuficiencia cardíaca así como en la evaluación de diagnóstico *in vitro* adicional de un paciente que tiene insuficiencia cardíaca. Un modo de realización preferente es el uso de SFRP-3 como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

El uso de una combinación de marcadores que comprende SFRP-3 y uno o más de otros marcadores de HF en la evaluación de pacientes con HF o en la evaluación de individuos con riesgo de HF representa otro modo de realización preferente de la presente invención. En una combinación de marcadores de este tipo, el uno o más de otros marcadores, preferentemente, se selecciona del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación.

En uno o más de otros marcadores de HF seleccionados más preferentes con los que se puede combinar la medida de SFRP-3, preferentemente, se selecciona(n) del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación. Estos otros marcadores preferentes cuyas medidas, se combinan preferentemente con la medida de SFRP-3 o que forman parte de la combinación de marcadores de HF que comprenden SFRP-3, respectivamente, se analizan con más detalle a continuación.

Marcador de péptido natriurético

Un marcador de péptido natriurético en el sentido de la presente invención es un marcador seleccionado de la familia de péptido natriurético auricular (ANP) o un marcador seleccionado de la familia de péptido natriurético cerebral (BNP).

Los marcadores polipeptídicos en la familia del péptido natriurético auricular o bien en la familia del péptido natriurético cerebral se derivan de pre-proformas de las hormonas activas correspondientes.

Los marcadores de péptido natriurético preferentes de acuerdo con la presente invención son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP, y fragmentos fisiológicos inmunológicamente detectables de los mismos. Tal como aprecia fácilmente un experto en la técnica, el fragmento inmunológicamente detectable tiene que comprender al menos un epítipo que permita la detección específica de dicho fragmento fisiológico. Un fragmento fisiológico es un fragmento como se presenta naturalmente en la circulación de un individuo.

Los marcadores en ambas familias de péptido natriurético representan fragmentos de las correspondientes pro-hormonas, es decir, proANP y proBNP, respectivamente. Puesto que se aplican consideraciones similares a ambas familias, sólo se describirá en detalle la familia de marcadores BNP. La pro-hormona de la familia BNP, es decir, proBNP consiste en 108 aminoácidos. proBNP se escinde en 32 aminoácidos C-terminales (77-108) que representan la hormona biológicamente activa BNP y los aminoácidos N-terminales 1-76 denominados proBNP N-terminal (o NT-proBNP). BNP, proBNP N-terminal (1-76) así como otros productos de degradación (Hunt, P.J., et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.* 214 (1995) 1175-1183) circulan en la sangre. Si bien la molécula precursora completa (proBNP 1-108) también se produce en el plasma, no se resuelve completamente. Sin embargo, se describe (Hunt, P.J., et al., *Peptides* 18 (1997) 1475-1481) que es detectable una liberación baja de proBNP (1-108) en plasma pero que debido a una degradación parcial muy rápida en el extremo N-terminal algunos aminoácidos están ausentes. Actualmente, en general, se acepta que, por ejemplo, para NT-proBNP, la porción 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 se pueden medir de forma fiable a partir de fluidos corporales. Una divulgación detallada relativa a procedimientos basados en la detección inmunológica de esta parte central de la molécula NT-proBNP se da en el documento WO 00/45176 y se remite al lector al mismo para obtener detalles. Puede ser de ventaja adicional medir sólo una cierta sustracción de NT-proBNP para la que se ha propuesto el término NT-proBNP natural. Una divulgación detallada relativa a esta sustracción de NT-proBNP se encuentra en el documento WO 2004/099253. El experto descubrirá todas las instrucciones necesarias en el mismo. Preferentemente, la NT-proBNP medida es o corresponde a la NT-proBNP como se mide con el ensayo Elecsys® NT-proBNP de Roche Diagnostics, Alemania.

Los preanálisis son consistentes con NT-proBNP, que permite un fácil transporte de la muestra hasta un laboratorio central (Mueller, T., et al., *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 942-944). Las muestras de sangre se pueden almacenar a temperatura ambiente durante varios días o se pueden enviar o despachar sin pérdida con recuperación. Por el contrario, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4° Celsius da lugar a una pérdida en la concentración de al menos un 20 % (Mueller, T., et al., *supra*; Wu, A.H., et al., *Clin. Chem.* 50 (2004) 867-873).

La familia de péptidos natriuréticos cerebrales (en especial BNP y NT-proBNP) se ha investigado rigurosamente en el cribado de ciertas poblaciones para HF. Los hallazgos con estos marcadores, en especial con NT-proBNP son

bastante esperanzadores. Los valores elevados de NT-proBNP incluso en "pacientes" asintomáticos son claramente indicativos de "problemas cardíacos" (Gremmler, B., et al., Exp. Clin. Cardiol. 8 (2003) 91-94). Estos autores mostraron que una NT-proBNP elevada indica la presencia de 'dolor cardiorenal' y se debe derivar de inmediato para investigación adicional. En línea con diversos otros grupos de investigadores Gremmler, et al., también descubrieron que una concentración de NT-proBNP anormal es una prueba de diagnóstico preciso tanto para la exclusión de HF en la población como para descartar la disfunción ventricular izquierda (=LVD) en sujetos disneicos. El papel de los valores de BNP o NT-proBNP negativos en el descarte de HF o LVD se corrobora por otros grupos de investigadores, véase, por ejemplo, McDonagh, T.A., et al., Eur. J. Heart Fail. 6 (2004) 269-273; y Gustafsson, F., et al., J. Card. Fail. 11, Supl. 5 (2005) S15-20.

El BNP se produce principalmente (aunque no exclusivamente) en el ventrículo y se libera tras el incremento de la tensión de la pared. Por tanto, un incremento en el BNP liberado refleja predominantemente disfunciones del ventrículo o disfunciones que se originan en la aurícula pero que afectan al ventrículo, por ejemplo, a través del llenado insuficiente o la sobrecarga de la volemia. Al contrario que BNP, el ANP se produce y se libera predominantemente desde la aurícula. Por lo tanto, el nivel de ANP puede reflejar predominantemente la función auricular.

ANP y BNP son las hormonas activas y tienen una semivida más corta que sus respectivos homólogos inactivos, NT-proANP y NT-proBNP. El BNP se metaboliza en la sangre, mientras que NT-proBNP circula en la sangre como molécula intacta y como tal se elimina por vía renal. La semivida in vivo de NT-proBNP es 120 min mayor que la de BNP, que es de 20 min (Smith, M.W., et al., J. Endocrinol. 167 (2000) 239-246).

Por lo tanto, dependiendo de la evolución temporal o propiedades de interés, cualquier medida de las formas activas o bien inactivas del péptido natriurético puede ser ventajosa.

En la evaluación de un individuo con riesgo de insuficiencia cardíaca, el valor medido para SFRP-3 se combina preferentemente con el valor para NT-proANP y/o NT-proBNP. Preferentemente, el valor para NT-proBNP se combina con el valor para SFRP-3. Consideraciones similares se aplican para la selección de un tratamiento apropiado, la valoración del riesgo de progresión de la enfermedad, y el seguimiento de la evolución de la enfermedad.

En caso de que se use SFRP-3 en la evaluación de la respuesta de un paciente al tratamiento, su medida se combina preferentemente con la medida de ANP o BNP.

En caso de que se use SFRP-3 para diferenciar entre insuficiencia cardíaca aguda y crónica, la combinación preferente de marcadores comprende SFRP-3, ANP o pro ANP y BNP o proBNP.

Marcador de troponina cardíaca

El término troponina cardíaca se refiere a las isoformas cardíacas de troponina I y troponina T. Como se indicó anteriormente, el término marcador también se refiere a variantes fisiológicas de la molécula marcadora, como fragmentos o complejos fisiológicos. Para los marcadores de troponina cardíaca, se sabe que sus complejos producidos fisiológicamente son de importancia diagnóstica y están expresamente incluidos en el presente documento.

La troponina T tiene un peso molecular de aproximadamente 37.000 Da. La isoforma de troponina T que se encuentra en el tejido cardíaco (cTnT) es suficientemente divergente del músculo esquelético TnT como para permitir la producción de anticuerpos que distinguen ambas de esas isoformas TnT. La TnT se considera un marcador de daño miocárdico agudo; véase, Katus, H.A., et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 21 (1989) 1349-1353; Hamm, C.W., et al., N. Engl. J. Med. 327 (1992) 146-150; Ohman, E.M., et al., N. Engl. J. Med. 335 (1996) 1333-1341; Christenson, R.H., et al., Clin. Chem. 44 (1998) 494-501; y EP 0 394 819.

La troponina I (TnI) es un elemento inhibidor de 25 kDa del complejo de troponina, hallado en el tejido muscular. La TnI se une a actina en ausencia de Ca^{2+} , inhibiendo la actividad ATPasa de actomiosina. La isoforma TnI que se encuentra en el tejido cardíaco (cTnI) es divergente en un 40 % de la TnI del músculo esquelético, lo que permite que ambas isoformas se distingan inmunológicamente. La concentración en plasma normal de cTnI es <0,1 ng/ml (4 pM). cTnI se libera en el torrente circulatorio después de la muerte celular cardíaca; por tanto, la concentración de cTnI en plasma es elevada en pacientes con infarto de miocardio agudo (Benamer, H., et al., Am. J. Cardiol. 82 (1998) 845-850).

Las únicas isoformas cardíacas de troponina I y T permiten que se distingan inmunológicamente de otras troponinas del músculo esquelético. Por lo tanto, la liberación en la sangre de troponina I y T del músculo cardíaco dañado puede estar específicamente relacionada con el daño del tejido cardíaco. Hoy en día se apreciará por el experto en la técnica que las troponinas cardíacas se pueden detectar de la circulación en su forma libre o bien como parte de un complejo (véase, por ejemplo, los documentos US 6.333.397, US 6.376.206 y US 6.174.686).

En la evaluación de un individuo con riesgo de insuficiencia cardíaca así como en la evaluación de un paciente que padece de insuficiencia cardíaca, el valor medido para SFRP-3 se combina preferentemente con el valor de la isoforma

cardíaca de troponina T y/o troponina I. Una troponina cardíaca preferente usada en combinación con el marcador SFRP-3 es troponina cardíaca T.

Marcador de inflamación

5 El experto en la técnica está familiarizado con el término marcador de inflamación. Los marcadores de inflamación preferentes son interleucina-6, proteína C reactiva, amiloide A del suero y una proteína S100.

10 La interleucina-6 (IL-6) es una proteína secretada de 21 kDa que tiene numerosas actividades biológicas que se pueden dividir en las implicadas en hematopoyesis y las implicadas en la activación de la respuesta inmunitaria innata. La IL-6 es un reactivo de fase aguda y estimula la síntesis de una variedad de proteínas, incluyendo moléculas de adhesión. Su función principal es la de mediar en la producción en fase aguda de proteínas hepáticas, y su síntesis está inducida por las citocinas IL-1 y TNF- α . La IL-6 se produce normalmente por macrófagos y linfocitos T. La concentración sérica normal de IL-6 es de < 5 pg/ml.

15 La proteína C reactiva (CRP) es una proteína de fase aguda de unión a Ca²⁺ homopentamérica con subunidades de 21 kDa que está implicada en la defensa del huésped. La síntesis de CRP está inducida por IL-6, e indirectamente por IL-1, puesto que la IL-1 puede desencadenar la síntesis de IL-6 por células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. La concentración en plasma normal de CRP es de < 3 μ g/ml (30 nM) en un 90 % de la población sana, y de < 10 μ g/ml (100 nM) en un 99 % de individuos sanos. Las concentraciones de CRP en plasma se pueden medir, por ejemplo, por amiloide A en suero (=SAA) que es una proteína de fase aguda de bajo peso molecular de 11,7 kDa. Se sintetiza predominantemente por el hígado en respuesta a la estimulación de IL-1, IL-6 o TNF- α y está implicada en la regulación de la respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T. Después de acontecimientos agudos, la concentración de SAA se incrementa hasta 1000 veces, alcanzando un miligramo por milímetro. Se usa para el seguimiento de la inflamación en enfermedades tan diversas como fibrosis quística, rechazo de injerto renal, traumatismo o infecciones. En la artritis reumatoide se ha usado en ciertos casos como sustituto para CRP, pero el SAA aún no está ampliamente aceptado.

30 Las proteínas S100 forman una familia que se incrementa constantemente de proteínas de unión a Ca²⁺ que actualmente incluye más de 20 miembros. La estructura fisiológicamente relevante de proteínas S100 es un homodímero pero parte puede también puede formar heterodímeros entre sí, por ejemplo, S100A8 y S100A9. Las funciones intracelulares varían desde la regulación de fosforilación de proteínas, de actividades enzimáticas, o de la dinámica del citoesqueleto a la implicación en la proliferación y diferenciación celular. Ya que algunas proteínas S100 también se liberan de células, se han descrito también funciones extracelulares, por ejemplo, supervivencia neuronal, proliferación de astrocitos, inducción de apoptosis y regulación de procesos inflamatorios. Se han descubierto los S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12 en la inflamación con S100A8 que responde a inflamación crónica, mientras que S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se incrementan en inflamación aguda. S100A8, S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se han ligado a diferentes enfermedades con componentes inflamatorios incluyendo algunos cánceres, rechazo de aloinjerto renal, colitis y de la forma más importante a RA (Burmeister, G., y Gallacchi, G., *Inflammopharmacology* 3 (1995) 221-230; Foell, D., et al., *Rheumatology* 42 (2003) 1383-1389). Los marcadores S100 más preferentes para evaluar un individuo con riesgo de HF o un paciente que tiene HF por ejemplo, para su uso en una combinación de marcadores de acuerdo con la presente invención, son S100A8, S100A9, heterodímero S100A8/A9 y S100A12.

45 La sE-selectina (molécula de adhesión leucocitaria endotelial soluble 1, ELAM-1) es una glucoproteína transmembranaria de tipo I de 115 kDa, expresada sólo en células endoteliales y sólo después de la activación por citocinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α) o endotoxina. La E-selectina de superficie celular es un mediador de la unión escalonada de los leucocitos al endotelio, una etapa esencial en la extravasación de los leucocitos en el sitio de inflamación, desempeñando de este modo un papel importante en la respuesta inflamatoria localizada. La E-selectina soluble se encuentra en la sangre de individuos sanos, lo que probablemente surge de la escisión proteolítica de la molécula expresada en la superficie. Se ha informado de niveles elevados de sE-selectina en suero en una variedad de condiciones patológicas (Gearing, A.J. y Hemingway, I., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 667 (1992) 324-331).

50 En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere al uso de SFRP-3 como molécula marcadora para HF en combinación con una o más moléculas marcadoras para HF en la evaluación de HF a partir de una muestra de líquido obtenida de un individuo.

60 Como se indica anteriormente, en un procedimiento preferente de acuerdo con la presente invención, el valor medido para SFRP-3 se combina al menos con el valor de al menos un marcador adicional seleccionado del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca, y un marcador de inflamación.

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere al uso de la combinación de marcadores SFRP-3 y NT-proBNP en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

65 En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere al uso de la combinación de marcadores SFRP-3 y troponina T en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere al uso de la combinación de marcadores SFRP-3 y CRP en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

5 En otro modo de realización preferente, la presente invención se refiere a una combinación de marcadores que comprende los marcadores SFRP-3, troponina T, NT-proBNP y CRP.

Aún en otro modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un panel de marcadores usado en un procedimiento para la evaluación de HF in vitro por marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de SFRP-3 y de uno o más de otros marcadores de HF y usar las concentraciones determinadas en la evaluación de HF.

Un panel de marcadores de acuerdo con la presente invención se mide preferentemente usando una técnica de matriz de proteínas. Una matriz es una colección de marcadores individuales determinables. Dichos marcadores pueden ser espacialmente determinables, tales como matrices contenidas dentro de placas de microvaloración o impresas sobre superficies planas en las que cada marcador está presente en distintas coordenadas X y Y. De forma alternativa, los marcadores pueden ser determinables en base a etiquetas, perlas, nanopartículas, o propiedades físicas. Las micromatrices se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos conocidos por el experto en la técnica (véanse, por ejemplo, el documento US 5.807.522; Robinson, W.H., et al., Nat. Med. 8 (2002) 295-301; Robinson, W.H., et al., Arthritis Rheum. 46 (2002) 885-893). Matriz como se usa en el presente documento se refiere a cualquier ensayo inmunológico con múltiples marcadores determinables. En un modo de realización, los marcadores determinables son antígenos. En otro modo de realización, los elementos determinables son autoanticuerpos. Una micromatriz es una forma en miniatura de una matriz. Antígeno, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula que se une específicamente a un anticuerpo. El término autoanticuerpo está bien definido en la técnica.

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a una matriz de proteínas que comprende el marcador SFRP-3 y opcionalmente uno o más de otros marcadores de HF.

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a una matriz de proteínas que comprende los marcadores SFRP-3 y NT-proBNP.

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a una matriz de proteínas que comprende los marcadores SFRP-3 y troponina T.

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a una matriz de proteínas que comprende los marcadores SFRP-3 y CRP.

En otro modo de realización preferente, la presente invención se refiere a una matriz de proteínas que comprende los marcadores SFRP-3, troponina T, NT-proBNP y CRP.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el verdadero alcance de ésta se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1. Análisis fenotípicos de ratones naturales y R9C. (A) Las curvas de supervivencia para ratones naturales (WT)(n=79) y ratones R9C (n=44) se generan después de un periodo de 24 semanas. (B) Acortamiento cardíaco evaluado por ecocardiografía (= acortamiento fraccional). El deterioro funcional significativo en los animales transgénicos R9C empieza tan sólo a las 8 semanas de edad.

Figura 2. Ecocardiografía y parámetros hemodinámicos en ratones naturales y AB. (A) Cambios en la presión máxima en mmHg a 2, 4 y 8 semanas postcirugía. (B) Cambio en la fracción de expulsión ventricular izquierda (LVEF) en % a las 2, 4 y 8 semanas después de cirugía. (Los círculos cerrados indican los datos de ratones con operación simulada y los círculos abiertos indican los datos de ratones con unión aórtica (AB).

Figura 3. SFRP-3 medida en muestras de 242 pacientes con HF y 118 muestras de control, respectivamente. Las concentraciones en ng/ml se dan en el eje y. Las muestras derivadas de pacientes con insuficiencia cardíaca están etiquetadas HF (HF = rombos), y NHS para controles sanos (suero humano normal = NHS = cuadrados), respectivamente.

Figura 4. Valores de SFRP-3 detectados en muestras de HF a partir de la rutina clínica y en un panel de control extendido, respectivamente. Se dan las concentraciones calculadas para sFRP-3, medidas en muestras derivadas de pacientes con insuficiencia cardíaca, etiquetadas (HF), y en muestras de controles sanos, etiquetadas como suero humano normal, = NHS, respectivamente. Las transferencias de cajas y bigotes muestran los cuartiles inferiores y superiores (cajas) así como los valores más altos y más bajos (bigotes).

Ejemplo 1

Modelos de ratón de insuficiencia cardíaca

5 1.1 El modelo de ratón R9C

Se ha informado de que la miocardiopatía dilatada humana heredada resultó de la conversión de Arg9 a Cys en el gen fosfolambano (PLN) humano (PLN-R9C) (Schmitt, J.P., et al., Science 299 (2003) 1410-1413). La aparición de la miocardiopatía dilatada en pacientes afectados comenzó típicamente durante la adolescencia, seguido de un deterioro progresivo en la función cardíaca lo que da lugar a crisis y mortalidad. Un modelo de ratón transgénico de esta mutación mostró un fenotipo cardíaco similar al de los pacientes afectados y se presentó con miocardiopatía dilatada, disminución en la contractilidad cardíaca y muerte prematura (Schmitt et al., 2003, supra).

Se estableció una curva de supervivencia para los ratones transgénicos. Los ratones PLN-R9C tuvieron una mediana de la supervivencia se sólo ~20 semanas persistiendo menos de un 15 % pasadas 24 semanas (Fig. 1 A). Las primeras muertes registradas en la línea PLN-R9C se observan a las 12 semanas de edad, mientras que sólo un ratón de control natural murió durante el periodo de 24 semanas. Se selecciona ocho semanas como el punto temporal representativo de enfermedad en fase 'temprana' antes de la primera mortalidad registrada, mientras que se elige 16 semanas como el punto medio entre 8 y 24 semanas (DCM clásico). Un análisis detallado de la patología de los corazones aislados muestra pruebas de agrandamiento ventricular y auricular incluso a las 8 semanas de edad en los ratones PLN-R9C. Las secciones transversales del músculo cardíaco aislado (obtenido de ratones naturales y PLN-R9C seguido de tinción con hematoxilina y eosina también muestran pruebas de dilatación ventricular izquierda, o adelgazamiento de la pared ventricular, en los animales transgénicos que empieza a las 8 semanas, con progresión continuada de la dilatación con la edad.

Las medidas cardíacas funcionales se realizan por ecocardiografía en los ratones macho de 8, 16 y 24 semanas de edad (resumidas en la Tabla 1). Las medidas de ecocardiografía del grosor de la pared anterior y posterior muestran que los ratones R9C tiene una dilatación significativa a las 8 semanas, que continúa con el deterioro durante toda la vida de los ratones. La contractilidad, evaluada por el acortamiento cardíaco (Fig. 1 B), también se reduce ligeramente, pero significativamente, a las 8 semanas, aunque una disminución más pronunciada es claramente evidente a las 16 semanas. Los ratones hembra analizados muestran hallazgos idénticos a los machos (datos no mostrados).

Tabla 1:

35 Parámetros ecocardiográficos y hemodinámicos en ratones naturales (WT) y R9C a las 8, 16, y 24 semanas en ratones macho.

	WT	R9C	WT	R9C	WT	R9C
Edad	8 semanas	8 semanas	16 semanas	16 semanas	24 semanas	24 semanas
Sexo	M	M	M	M	M	M
HR (bpm)	560±6	567±5	569±5	552±15	565±9	502±15*
AW (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*
PW (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*
LVEDD (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*
LVESD (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*
FS (%)	52,7±0,9	47,6±1,2*	53,1 ± 0,7	32,9±1,9*	52,9 ± 1,5	22,6±2,1*
VCFC (circ/s)	10,5±0,2	9,1±0,2*	10,5 ± 0,1	7,0±0,5*	10,9 ± 0,3	5,1±0,5*
PAVc (cm/s)	102,4±2,4	97,8±2,6	110,1±3,7	85,3±3,2*	111,3±2,9	73,6±3,1*
AVA (m/s ²)	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 media ± EEM. Símbolos usados en la tabla 1: HR = frecuencia cardíaca; AW, PW= grosor de pared anterior y posterior (ventrículo izquierdo); LVEDD, LVESD = Dimensión telediastólica y telesistólica ventricular izquierda, respectivamente; FS = acortamiento fraccional = (LVEDD-LVESD)/LVEDD x 100 %; ETC = tiempo de expulsión corregido para HR; VCFC = velocidad del acortamiento circunferencial corregido para HR = FS/ETC; PAVc = velocidad aórtica máxima corregida para HR; onda E = onda diastólica transmitral de llenado temprano; LVESP, LVEDP= presión telesistólica y telediastólica ventricular izquierda; +dP/dtmax = primera derivada positiva máxima de la presión ventricular izquierda; -dP/dtmax = primera derivada negativa máxima de la presión ventricular izquierda; AVA = aceleración de la velocidad aórtica (PAVc/tiempo de aceleración); *P<0,05 en comparación con WT.

50 1.2 El modelo de ratón de cerclaje aórtico (AB)

En este modelo de ratón, la sobrecarga de presión provocada por el cerclaje aórtico (AB) induce hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca.

5 Por intervención quirúrgica, se realiza una sobrecarga de presión en ratones C57BL. La coartación de la aorta ascendente (conocida como cerclaje aórtico) induce hipertrofia cardíaca y crecimiento del músculo miocárdico, en especial en el ventrículo izquierdo como respuesta primaria a la coartación de la aorta. En las fases tardías de este modelo de ratón, el corazón se vuelve hipertrófico y finalmente se dilata. Este modelo está bien caracterizado y ha demostrado que es altamente reproducible con una baja tasa de mortalidad de un 10-15 % o menos en base a la experiencia. Después de la coartación, este modelo animal permite evaluar el progreso del desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda e insuficiencia cardíaca en respuesta al estrés hemodinámico.

10 En resumen, se anestesiaron ratones C57BL con cetamina (90 mg/kg) y Rompun (10 mg/Kg) mezclados y se ligó la aorta usando una aguja de calibre 25. Los ratones con operación simulada sufrieron el mismo procedimiento quirúrgico, excepto porque la ligadura no se aprieta contra la aguja.

15 Puntos temporales experimentales

20 Para examinar la respuesta hipertrófica, se sacrifican los animales con cerclaje y los controles con operación simulada a las una, dos, cuatro y ocho semanas postintervención. La función cardíaca y el desarrollo de hipertrofia se evalúan por análisis ecocardiográfico y se confirman *post mortem* examinando la histología. La tabla 2 muestra un resumen de la función cardíaca evaluada a diversos puntos temporales por ecocardiografía. Los detalles de los parámetros ecocardiográficos dados en la tabla 2 son conocidos para el experto y se pueden encontrar, por ejemplo, en Asahi, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 9199-9204, y Oudit, G.Y., et al., Nat. Med. 9 (2003) 1187-1194.

Tabla 2

Parámetro	2 sem, simulado	2 sem,AB	4 sem, simulado	4 sem,AB	8 sem, simulado	8 sem,AB
Frecuencia cardíaca (bpm)	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 (ul)	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 (ul)	13,7±2,4	15,8±3,3	14,7±1,9	25,7±0,9	18,4±0,5	36,5±3,7
Volumen telesistólico (ul)	14,7±2,8	16,9±3,3	15,5±2,1	28,0±0,7	19,3±0,5	40,2±4,3
Volumen telediastólico (ul)	30,6±2,4	34,5±3,2	35,2±1,1	39,8±1,6	36,8±1,4	47,2±4,1
Presión máxima (mmHg)	93,1±3,5	149,2±4,8	92,6±0,8	153,5±6,1	93,6±5,0	169,8±10,2
Presión mínima (mmHg)	4,9±1,3	3,2±0,4	3,6±0,1	7,3±3,6	4,1±0,5	6,2±1,9
Presión telesistólica (mmHg)	87,3±4,3	139,4±2,8	89,2±1,0	149,6±5,0	90,5±4,9	168,3±9,8
Presión telediastólica (mmHg)	14,0±3,2	10,6±2,7	13,0±0,7	16,8±4,8	16,5±1,4	16,9±3,1
Volumen sistólico (ul)	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 expulsión (%)	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 (ul/min)	5,113,5±819,2	5,879,1±714,0	6,114,8±897,0	4,108,6±310,3	5,066,0±653,3	3,893,8±466,1
Análisis sistólico (mmHg*ul)	1,339,6±134,0	2,196,3±94,6	1,577,8±134,4	1,477,8±99,6	1451,8±130,4	1,179,2±104,1
Elasticidad arterial (Ea) (mmHg/ul)	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 máx (mmHg/s)	5,481,6±491,1	6785,3±434,2	6,036,0±352,9	5,133,2±621,4	5,755,8±652,9	6,454,4±712,0
dPdt mín (mmHg/s)	-5049,6±426,9	-7427,5±685,3	-4,743,3±287,7	-5,484,75±412,2	-4564,5±525,8	-7625±586,5
dVdt máx (ul/s)	883,0±61,2	758,0±29,8	856,5±27,4	1,152,8±206,3	1,188,0±114,1	1,041,2±109,6
dVdt mín (ul/s)	-679,6±71,4	-696,3±30,6	-703,5±52,2	-921,0±158,0	-1,000,5±76,8	-938,4±126,2
P a dVdt máx (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 máx (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 máx (ul)	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 mín (ul)	14,7±2,6	17,1±3,2	15,6±1,9	27,0±0,7	19,2±0,4	39,0±4,3
Tau_w (ms)	11,4±1,2	8,6±0,7	10,7±0,9	11,2±1,3	11,3±0,5	8,8±0,4
Tau_g (ms)	15,8±1,5	12,1±1,2	17,5±0,7	17,4±1,0	17,5±1,0	15,6±1,0
Potencia máxima (mW)	6,4±0,6	9,5±0,4	6,8±0,5	8,8±0,5	7,3±0,7	9,0±0,5
Potencia máxima ajustada precarga (mWsul ²)	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 realiza una histología por tinción con hematoxilina/eosina (HE) en tejido cardíaco de ratones AB y ratones de control a las 2, 4 y 8 semanas. La histología confirma los procesos necróticos y de remodelación esperados para los ratones AB, mientras que el tejido cardíaco en los ratones con operación simulada no muestran ningún cambio significativo. A las dos semanas después de la cirugía, el ventrículo un ratón con ligadura muestra hipertrofia ventricular izquierda significativa que, después de cuatro semanas, ha progresado adicionalmente y a las ocho semanas postcirugía se asemeja mucho a una miocardiopatía dilatada en fase final.

Ejemplo 2

10 Análisis de micromatrices

Se usan preparaciones de tejido sin analizar para el análisis de micromatrices sin aislamiento adicional de orgánulos. La metodología de análisis de datos de micromatrices se describe en la literatura (véase, por ejemplo, los documentos US 5.807.522; Robinson, W.H., et al., Nat. Med. 8 (2002) 295-301; Robinson, W.H., et al., Arthritis Rheum. 46 (2002) 885-893).

Preparación de muestra y espectroscopía de masas

20 Homogeneización cardíaca y aislamiento de orgánulos

Se aíslan los corazones, se retiran las aurículas, los ventrículos se pican cuidadosamente con una cuchilla de afeitar y se aclaran exhaustivamente con PBS helada (solución salina tamponada con fosfato) para retirar el exceso de sangre. Se homogeneiza el tejido durante 30 s usando un homogeneizador de vidrio manual suelto en tampón en 10 ml de tampón de lisis (sacarosa 250 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 1 mM, DDT (ditiotreitól) 1 mM, y PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Todas las etapas posteriores se realizan a 4 °C. El lisado se centrifuga en una centrifuga de mesa a 800 x g durante 15 min; el sobrenadante sirve como una fuente para fracciones microsómicas, mitocondrias y citosol. El sedimento que contiene núcleos se diluye en 8 ml de tampón de lisis y se coloca en forma de capa sobre 4 ml de tampón de sacarosa 0,9 M (sacarosa 0,9 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 1 mM, DDT 1 mM y PMSF 1 mM) y se centrifuga a 1000 x g durante 20 min a 4 °C. El sedimento resultante se resuspende en 8 ml de un tampón sacarosa 2 M (sacarosa 2 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM y PMSF 1 mM), en coloca en forma de capa sobre 4 ml de tampón de sacarosa 2 M y se sedimenta por ultracentrifugación a 150.000 x g durante 1 h (Beckman SW40,1 rotor). Los núcleos se recuperan como sedimento. Las mitocondrias se aíslan del sobrenadante por re-centrifugación a 7500 x g durante 20 min a 4 °C; el sedimento resultante se lava dos veces en tampón de lisis. Los microsomas se sedimentan por ultracentrifugación del citoplasma postmitocondrial a 100.000 x g durante 1 h en un rotor Beckman SW41. El sobrenadante sirvió como fracción citosólica (= cito).

Extracción de orgánulos

Las proteínas mitocondriales solubles se extraen incubando 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 somete a sonicación brevemente y los restos se retiran por centrifugación a 13.000 x g durante 30 min. El sobrenadante sirve como la fracción "mito 1". El sedimento insoluble resultante se resuspende en tampón de extracción de detergente de membrana (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 agita suavemente durante 30 min seguido de centrifugación a 13.000 x g durante 30 min; el sobrenadante sirvió como fracción "mito 2".

Las proteínas asociadas a membrana se extraen resuspendiendo los microsomas en tampón de extracción de detergente de membrana. La suspensión se incubaba con agitación suave durante 1 h y el resto insoluble se retira por centrifugación a 13.000 x g durante 30 min. El sobrenadante sirve como la fracción "micro".

50 Digestión de extractos de orgánulos y MudPIT análisis

Se precipita una alícuota de aproximadamente 100 µg de proteína total (determinada por ensayo Bradford) de cada fracción durante la noche con 5 vol. de acetona helada a aproximadamente 20 °C, seguido de centrifugación a 13.000 x g durante 15 min. El sedimento de proteína se solubiliza en un volumen pequeño de urea 8 M, Tris-HCl 50 mM, DTT pH 8,5, 1 mM durante 1 h a 37 °C, seguido de carboxiamidometilación con yodoacetamida 5 mM durante 1 h a 37 °C en oscuridad. A continuación, las muestras se diluyen a urea 4 M con un vol. igual de bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8,5, y se digieren con un proporción de 1:150 veces de endoproteinasa Lys-C (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canadá) a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, las muestras se diluyen a urea 2 M con un vol. igual de bicarbonato de amonio 50 mM pH 8,5, complementado con CaCl₂ hasta una concentración final de 1 mM, y se incubaba durante la noche con perlas de tripsina Poroszyme (Applied Biosystems, Streetsville, Ontario, Canadá) a 30 °C con giro. Las mezclas peptídicas resultantes se extraen en fase sólida con cartuchos SPEC-Plus PT Cl 8 (Ansys Diagnostics, Lake Forest, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacenan a -80 °C hasta su uso. Se establece un procedimiento MudPIT multiciclo de 12 etapas de 20 h de duración totalmente automático como se describe (Kislinger, T., et al., Mol. Cell Proteom. 2 (2003) 96-106). En resumen, se interconecta una bomba cuaternaria de HPLC con un espectrómetro de masas con trampa iónica LCQ DECA XP (Thermo Finnigan, San Jose, CA). Una microcolumna por

capilaridad con sílice fundido i.d. 100 μm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) se empujar hasta una punta fina usando un extractor láser P-2000 laser puller (Sutter Instruments, Novato, CA) y se empaqueta con 8 cm de resina Zorbax Eclipse XDB-C18 5 μm (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canadá), seguido de 6 cm de resina de intercambio catiónico fuerte Partisphere 5 μm (Whatman, Clifton, NJ). Las muestras del individuo se cargan manualmente sobre columnas separadas usando un recipiente a presión. Las condiciones del disolvente para cromatografía son exactamente como se describen en Kislinger, T., et al., Mol. Cell Proteom. 2 (2003) 96-106.

Identificación y validación de proteínas

Se usa el algoritmo de búsqueda de base de datos SEQUEST para emparejar los espectros de masas en tándem de péptidos con las secuencias peptídicas en una base de datos formateada FASTA mínimamente redundante mantenida localmente con secuencias de proteínas humanas y de ratón obtenidas de las bases de datos Swiss-Prot/TrEMBL y IPI. Para evaluar estadísticamente la tasa de descubrimiento falso empírico para controlar, y por tanto, minimizar identificaciones de positivos falsos, todos los espectros se buscan frente a secuencias de proteínas en ambas orientaciones de aminoácidos normal (directa) e invertida (inversa) (Kislinger, T., et al., Mol. Cell Proteom. 2 (2003) 96-106). El algoritmo de filtración STATQUEST se aplica después a todos los resultados de búsqueda putativos para obtener una medida de la fiabilidad estadística (puntuación de confianza) para cada identificación de candidato (valor p de corte $< 0,15$, correspondiente a una probabilidad de un 85 % o mayor de ser un emparejamiento correcto). Los emparejamientos de alta confianza se analizan sintácticamente en una base de datos de tipo SQL interna usando una secuencia de comandos basada en Perl. Se diseña la base de datos para que dé cabida a los resultados de la búsqueda de la base de datos y a información de los espectros (cabeceras de barrido) para múltiples emparejamientos peptídicos para una proteína dada, junto con la información relativa al nombre de la muestra, número de experimento, etapa MudPIT, fuente de orgánulo, secuencia de aminoácidos, masa molecular, punto isoelectrónico, carga, y nivel de confianza. Sólo las proteínas con un valor p de confianza predicho de un 95 % o más, y para las que se detectan de forma colectiva al menos dos espectros, se mantienen para análisis adicionales.

Ejemplo 3

Evaluación estadística de los datos obtenidos en los sistemas modelo

3.1 Procedimientos estadísticos usados para generar los valores p de expresión diferencial para el modelo de ratón R9C

Los datos de partida obtenidos con los procedimientos descritos en el ejemplo 2 consiste en 6190 proteínas cada una con recuentos espectrales, la suma de todos los espectros asociados con la proteína, para cada uno de los 137 ciclos experimentales diferentes. Los datos de partida, 6190 subconjuntos de proteínas, se someten a normalización global que, en primer lugar, separa los datos dentro de cada ciclo en un número igual de grupos, fijado a 100 para este análisis, en base a sus recuentos espectrales. A continuación, se realiza un LOESS (Cleveland, W.S. y Devlin, S.J., Journal of the American Statistical Association 83 (1988) 596-610) en cada grupo (1 - 100) ajustando las diferencias en recuentos espectrales a través de un conjunto de genes con recuentos espectrales similares.

En base a nuestros datos de partida, se construyeron dos modelos lineales, el primer modelo usa control/enfermedad, tiempo (8 sem, 16 sem, final) y ubicación (cito, micro, mitol, mitoll) como factores y se describe usando:

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

El segundo modelo usa sólo el tiempo (8 sem, 16 sem, final) y ubicación (cito, micro, mitol, mitoll) como factores y se describe usando:

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

donde β_0 es el término de intersección y β_1 , β_2 , β_3 , y β_4 son las estimaciones de pendiente para las variables tiempo, tiempo al cuadrado, ubicación y control/enfermedad.

Los dos modelos se comparan usando Anova, siendo la hipótesis de nulidad que no existe diferencia entre los dos modelos. Un valor p bajo indica entonces que no existen pruebas suficientes para decir que los dos modelos son el mismo. La información adicional indica que el estado (es decir, control/enfermedad) parece que es un componente significativo del modelo. Para extraer las proteínas que tienen un cambio significativo en la abundancia de proteína relativa entre nuestros modelos de control y enfermedad, nuestra lista de 6190 proteínas se clasifica en base a sus valores p computerizados. Esto genera un conjunto de 593 proteínas con valores $p < 0,05$.

Para representar la prueba de hipótesis múltiple del modelo anterior, a continuación se corrigen los valores p usando la corrección de la tasa de descubrimiento falso (FDR), específicamente la corrección Benjamini-Hochberg FDR (Benjamini, Y., y Hochberg, Y., Journal of the Royal Statistical Society B. 57 (1995) 289-300). Esto genera un conjunto de 40 proteínas con valores p corregidos $< 0,05$ para el modelo de ratón R9C.

3.2 Procedimientos estadísticos usados para generar los valores p de expresión diferencial para el modelo de ratón de cerclaje aórtico

5 A partir de 68 ciclos experimentales en el modelo de ratón de cerclaje aórtico, se identifican 3152 proteínas con recuentos espectrales. Se aplica el mismo análisis de datos a los conjuntos de datos para el modelo de ratón de cerclaje aórtico como se describe anteriormente para el modelo de ratón R9C.

Ejemplo 4

10

4.1. ELISA para la medida de SFRP-3 en muestras de suero y plasma humanos

15 Para la detección de SFRP-3 en suero o plasma humano, se desarrolló un ELISA de tipo sándwich. Para la captura y detección del antígeno, se conjugaron alícuotas de anticuerpo policlonal anti-SFRP-3 de R&D Systems (número de catálogo: AF 192) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

20 Se incuban placa de microvaloración de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-SFRP-3 biotinilado durante 60 min a 0,5 µg/ml en 1x solución PBS. Después de la incubación, se lavan las placas tres veces con 1x PBS + 0,02 % Tween-20, se bloquean con PBS +BSA 1 % (seroalbúmina bovina) y después se lavan de nuevo tres veces con 1x PBS + 0,02 % Tween-20. A continuación, se incuban los pocillos durante 1 h con una dilución en serie de la SFRP-3 recombinante como antígeno estándar o con muestras de suero o plasma diluidas (1:5) de pacientes o individuos de control, respectivamente. Después de la unión de SFRP-3, se lavaron las placas tres veces con 1x PBS + 0,02 % Tween-20. Para la detección específica de SFRP-3 unida, se incuban los pocillos con 100 µl de anticuerpo policlonal anti- SFRP-3 digoxigenilado durante 45 min a 1 µg/ml en 1x PBS + 1 % BSA. A continuación, se lavaron las placas tres veces para retirar el anticuerpo no unido. En una etapa siguiente, se incuban los pocillos con 75 mU/ml de conjugados anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N.º catálogo 1633716) durante 30 min en 1x PBS + 1 % BSA. Posteriormente, se las placas se lavan seis veces con el mismo tampón. Para la detección de complejos antígeno-anticuerpo, se incuban los pocillos con 100 µl de solución ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N.º catálogo 11685767) y se mide de densidad óptica (DO) después de 15 min a 405 y 492 nm con un lector ELISA.

25 30 4.2. ELISA de SFRP-3 con sueros de pacientes que tienen HF y obtenidos de la rutina clínica y donantes aparentemente sanos, respectivamente

35 Para evaluar adicionalmente la utilidad de los ensayos de SFRP-3 bajo condiciones clínicas rutinarias, se investiga un panel de sueros de pacientes con HF (n=242) y de 118 sueros de pacientes de control aparentemente sanos. Como se menciona antes, se diluyen los sueros 1:5 en 1xPBS + 1 % BSA. La tabla 3 muestra el resultado para estos paneles extendidos:

40

Tabla 3: Resultados de ELISA para SFRP-3 (panel con muestras de HF de rutina clínica)

<u>Muestras de insuficiencia cardíaca</u>				<u>Controles normales</u>			
N=242	DO delta	Conc. [ng/ml]		n = 118 N.º muestra	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)			medida	calculada (*5)
4,143	0,658	3,04	15,22	1	0,851	2,35	11,73
4,144	0,778	3,90	19,49	2	0,592	1,25	6,26
4,145	0,443	1,57	7,87	3	0,795	2,11	10,53
4,146	0,725	3,52	17,58	4	0,601	1,29	6,46
4,150	0,782	3,93	19,64	5	0,695	1,68	8,41
4,151	0,400	1,28	6,40	6	0,903	2,57	12,87
4,152	0,617	2,76	13,78	7	0,513	0,93	4,64
4,153	0,614	2,73	13,67	8	0,359	0,26	1,32
4,154	0,490	1,89	9,46	9	0,444	0,64	3,20
4,155	0,607	2,69	13,43	10	0,856	2,37	11,85
4,157	0,409	1,34	6,72	11	0,520	0,95	4,77
4,158	0,365	1,04	5,20	12	0,581	1,21	6,05
4,159	0,884	4,70	23,49	13	0,447	0,65	3,26
4,161	0,676	3,17	15,84	14	0,565	1,14	5,70
4,162	0,979	5,45	27,23	15	0,536	1,02	5,10
4,163	0,472	1,77	8,85	16	0,428	0,71	3,57
4,164	0,443	1,57	7,87	17	0,398	0,60	2,99
4,170	0,401	1,29	6,43	18	0,461	0,84	4,22
4,171	0,743	3,65	18,25	19	0,413	0,66	3,28
4,172	0,373	1,10	5,48	20	0,816	2,31	11,54
4,173	0,645	2,95	14,75	21	0,607	1,43	7,13
4,174	0,543	2,25	11,26	22	0,595	1,38	6,90
4,175	0,223	0,00	0,00	23	0,369	0,48	2,42
4,176	0,377	1,13	5,63	24	0,443	0,77	3,87
4,178	0,517	2,14	10,72	25	0,438	0,75	3,77
4,181	0,462	1,74	8,71	26	0,449	0,80	3,99
4,182	0,519	2,16	10,78	27	0,270	0,09	0,44
4,187	0,554	2,41	12,07	28	0,456	0,82	4,12
4,189	0,635	3,04	15,18	29	0,346	0,39	1,96
4,190	0,739	3,88	19,39	30	0,493	0,97	4,86
4,191	0,530	2,24	11,18	31	0,406	1,32	6,60
4,192	0,590	2,69	13,45	32	0,342	0,88	4,42

ES 2 526 928 T3

Muestras de insuficiencia cardíaca

N=242	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)
4,193	0,360	1,03	5,15
4,194	0,928	5,56	27,80
4,196	0,449	1,65	8,27
4,198	0,272	0,42	2,09
4,199	0,520	2,17	10,83
4,200	0,489	1,94	9,69
4,202	0,983	6,10	30,50
4,203	0,451	1,66	8,32
4,204	0,606	2,81	14,06
4,205	0,483	1,90	9,49
4,206	0,495	1,98	9,91
4,212	0,322	0,76	3,81
4,213	0,420	1,45	7,24
4,588	0,823	2,23	11,13
4,589	1,265	4,30	21,49
4,590	1,167	3,81	19,05
4,591	1,459	5,34	26,72
4,594	1,107	3,51	17,56
4,595	0,880	2,47	12,37
4,597	1,093	3,44	17,22
4,606	1,341	4,69	23,46
4,607	1,144	3,69	18,46
4,608	1,222	4,08	20,39
4,613	0,599	1,28	6,41
4,622	1,468	5,40	27,00
4,623	0,957	2,82	14,09
4,624	1,254	4,25	21,23
4,625	0,869	2,43	12,13
4,633	0,837	2,29	11,43
4,640	0,813	2,18	10,92
4,641	0,785	2,06	10,30
4,643	1,561	5,94	29,69
4,676	1,055	3,27	16,33
4,677	1,253	4,23	21,16
4,678	0,976	2,90	14,52
4,680	0,944	2,76	13,78
4,681	0,870	2,43	12,16
4,684	1,228	4,11	20,55
4,685	0,746	2,01	10,03
4,687	1,040	3,35	16,73
4,688	0,747	2,01	10,05
4,690	0,738	1,97	9,85
4,691	0,883	2,61	13,03
4,692	1,430	5,44	27,21
4,693	1,036	3,32	16,61

Controles normales

n = 118 N.º muestra	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)
33	0,448	1,61	8,04
44	0,393	1,23	6,16
45	0,404	1,31	6,54
46	0,261	0,28	1,42
47	0,200	0,00	0,00
48	0,372	1,09	5,44
49	0,315	0,69	3,45
50	0,299	0,57	2,87
51	0,522	2,11	10,53
52	0,327	0,78	3,88
53	0,542	2,24	11,21
54	0,403	1,30	6,52
55	0,332	0,81	4,07
56	0,394	1,24	6,21
57	0,372	1,11	5,55
58	0,505	2,06	10,28
59	0,341	0,89	4,47
60	0,289	0,53	2,67
61	0,322	0,76	3,81
62	0,289	0,53	2,67
63	0,396	1,28	6,40
64	0,392	1,25	6,26
65	0,313	0,70	3,52
66	0,298	0,60	2,98
67	0,292	0,56	2,79
68	0,564	2,49	12,45
69	0,354	0,99	4,93
70	0,280	1,32	6,61
71	0,431	1,53	7,63
72	0,342	0,90	4,51
73	0,363	1,05	5,25
74	0,304	0,64	3,20
75	0,466	1,78	8,88
76	0,593	1,96	9,79
77	0,531	1,58	7,88
78	0,558	1,74	8,68
79	0,386	0,76	3,79
80	0,543	1,64	8,22
81	0,362	0,63	3,16
82	0,502	1,40	7,01
83	0,543	1,64	8,22
84	0,853	3,79	18,97
85	0,532	1,59	7,93
86	0,553	1,71	8,55
87	0,581	1,88	9,40

ES 2 526 928 T3

Muestras de insuficiencia cardíaca

N=242	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)
4,694	0,623	1,49	7,46
4,695	0,646	1,59	7,94
4,696	1,003	3,16	15,82
4,697	1,066	3,47	17,34
4,698	0,715	1,87	9,37
4,699	0,869	2,55	12,73
4,700	0,789	2,19	10,95
4,701	0,764	2,08	10,41
4,702	1,208	4,19	20,96
4,703	0,865	2,53	12,63
4,704	1,295	4,67	23,34
4,705	0,737	1,97	9,83
4,706	0,590	1,36	6,78
4,707	1,168	3,98	19,91
4,708	0,730	1,94	9,68
4,711	0,736	1,96	9,81
4,712	0,576	1,30	6,50
4,713	0,590	1,36	6,80
4,714	0,881	4,01	20,05
4,715	0,725	2,84	14,21
4,717	0,631	2,20	11,01
4,720	0,692	2,61	13,07
4,726	0,532	1,58	7,89
4,728	0,787	3,29	16,45
4,729	0,698	2,65	13,26
4,730	1,035	5,31	26,55
4,732	0,511	1,45	7,26
4,736	0,525	1,54	7,70
4,737	0,856	3,82	19,09
4,738	0,906	4,21	21,06
4,739	1,101	5,91	29,56
4,790	0,519	1,50	7,50
4,795	0,714	2,77	13,84
4,799	0,605	2,03	10,16
4,805	0,637	2,24	11,20
4,806	0,602	2,01	10,07
4,807	0,354	0,59	2,96
4,808	0,579	1,87	9,34
4,811	0,657	2,37	11,87
4,813	0,999	4,99	24,97
4,815	1,074	5,66	28,29
4,819	0,952	4,59	22,95
4,820	0,951	4,59	22,94
4,821	0,747	3,27	16,34
4,822	0,810	3,77	18,86

Controles normales

n = 118 N.º muestra	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)
88	0,438	1,03	5,17
89	0,309	0,37	1,87
90	0,592	1,95	9,76
91	0,677	2,74	13,68
92	0,530	1,70	8,52
93	0,580	2,04	10,20
94	0,549	1,83	9,14
95	0,388	0,82	4,11
96	0,601	2,19	10,94
97	0,577	2,02	10,11
98	0,343	0,57	2,83
99	0,428	1,06	5,30
100	0,473	1,34	6,68
101	0,409	0,95	4,73
102	0,326	0,47	2,36
103	0,348	0,59	2,96
104	0,336	0,53	2,63
105	0,504	1,53	7,67
106	0,392	1,47	7,37
107	0,401	1,55	7,74
108	0,373	1,33	6,65
109	0,541	2,67	13,37
110	0,278	0,59	2,94
111	0,630	3,42	17,10
112	0,404	1,57	7,84
113	0,587	3,05	15,26
114	0,488	2,24	11,19
115	0,541	2,67	13,35
116	0,613	3,27	16,36
117	0,634	3,45	17,25
118	0,575	2,95	14,76
119	0,622	3,35	16,74
120	0,608	3,23	16,14
121	0,404	1,57	7,86
122	0,382	1,40	7,00
123	0,281	0,61	3,04
124	0,376	1,35	6,77
125	0,600	3,17	15,83
126	0,560	2,83	14,13
127	0,438	1,84	9,18
128	0,406	1,58	7,92
Cuartil 1 min	0,364		3,83
med	0,200		0,00
máx	0,440		6,49
	0,903		18,97

ES 2 526 928 T3

Muestras de insuficiencia cardíaca

N=242	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)
4,823	0,701	2,91	14,57
4,827	0,859	4,18	20,90
4,830	1,297	8,56	42,82
4,831	1,078	6,20	31,01
4,832	0,979	5,24	26,22
4,836	0,905	4,57	22,87
4,837	0,521	1,64	8,21
4,838	0,732	3,15	15,76
4,843	0,524	1,67	8,33
4,845	1,016	5,59	27,94
4,846	0,989	5,34	26,70
4,847	0,684	2,78	13,92
4,849	0,697	2,88	14,42
4,850	0,902	4,55	22,75
4,851	0,883	4,39	21,93
4,853	0,696	2,87	14,37
4,855	0,953	5,01	25,04
4,857	0,991	5,35	26,76
4,858	1,245	7,96	39,81
4,860	0,737	3,19	15,95
4,862	0,840	4,02	20,08
4,867	0,889	4,44	22,20
4,868	1,077	6,19	30,93
4,869	1,013	6,21	31,04
4,871	0,600	2,83	14,16
4,872	1,101	6,99	34,96
4,873	0,615	2,95	14,75
4,876	0,742	3,95	19,76
4,878	0,843	4,77	23,87
4,879	1,140	7,35	36,76
4,880	0,831	4,68	23,38
4,881	0,667	3,36	16,80
4,882	0,958	5,74	28,68
4,886	0,692	3,55	17,77
4,889	1,077	6,78	33,89
4,893	1,107	7,04	35,22
4,894	1,002	6,12	30,58
4,895	0,879	5,07	25,36
4,896	1,257	8,45	42,27
4,900	1,480	10,78	53,90
4,902	1,351	9,40	46,98
4,904	1,656	12,86	64,30
4,905	0,606	2,88	14,40
4,906	0,610	2,91	14,56
4,907	0,658	3,29	16,43

Controles normales

n = 118 N.º muestra	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)
Cuartil 3	0,559		9,17

NHS

ES 2 526 928 T3

Muestras de insuficiencia cardíaca

N = 242	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)
4,911	0,734	3,89	19,46
4,912	0,613	2,93	14,65
4,913	1,081	6,81	34,04
4,914	0,812	4,52	22,58
4,916	0,856	4,88	24,41
4,917	1,689	13,26	66,29
4,928	1,050	6,54	32,68
4,929	1,949	16,94	84,68
4,930	1,502	11,02	55,11
4,937	0,835	4,70	23,52
4,940	0,895	5,21	26,03
4,941	1,433	10,27	51,33
4,942	0,701	3,63	18,13
4,943	0,582	2,69	13,44
4,944	0,732	3,87	19,36
4,945	1,257	8,45	42,26
4,948	0,657	3,28	16,40
4,949	1,186	7,78	38,88
4,950	1,603	10,09	50,47
4,952	1,083	5,79	28,93
4,953	1,085	5,80	28,99
4,954	1,263	7,16	35,82
4,955	0,872	4,27	21,37
4,956	1,237	6,95	34,77
4,957	0,980	5,04	25,18
4,961	1,324	7,65	38,27
4,965	1,308	7,53	37,64
4,967	0,642	2,70	13,49
4,968	0,772	3,59	17,94
4,971	0,821	3,92	19,62
4,974	1,030	5,40	26,98
4,975	1,423	8,48	42,40
4,976	1,472	8,91	44,53
4,977	1,291	7,39	36,93
4,978	0,783	3,66	18,31
4,979	1,036	5,44	27,19
4,981	0,607	2,46	12,30
4,982	0,937	4,73	23,65
4,983	1,353	7,89	39,45
4,986	1,062	5,63	28,15
4,995	1,282	7,31	36,57
4,996	1,420	8,45	42,25
4,997	0,992	5,12	25,62
5,004	1,336	7,75	38,74
5,005	0,769	3,57	17,84

Controles normales

n = 118 N.º muestra	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)

Muestras de insuficiencia cardíaca

N=242	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)
5,008	0,967	4,94	24,71
5,009	1,011	5,26	26,29
5,010	0,826	3,95	19,77
5,011	0,811	3,85	19,27
5,012	0,953	4,84	24,21
5,020	0,565	2,18	10,88
5,021	0,978	5,02	25,11
5,022	0,920	4,61	23,04
5,023	0,759	3,50	17,48
5,026	1,482	8,99	44,93
5,030	0,592	2,36	11,79
5,031	1,644	10,49	52,45
5,034	1,272	7,24	36,18
5,035	0,936	6,25	31,26
5,036	0,684	3,89	19,44
5,042	0,671	3,77	18,87
5,043	0,874	5,64	28,19
5,044	0,813	5,06	25,29
5,045	1,097	7,94	39,69
5,046	0,992	6,82	34,08
5,048	0,904	5,93	29,63
5,049	0,538	2,65	13,23
5,050	0,503	2,36	11,82
5,055	0,390	1,46	7,29
5,056	1,077	7,72	38,62
5,057	0,704	4,06	20,30
5,058	0,573	2,93	14,67
5,063	0,880	5,69	28,46
5,064	0,816	5,08	25,40
5,065	0,840	5,31	26,56

Controles normales

n = 118 N.º	DO delta	Conc. [ng/ml]	
		medida	calculada (*5)

5 Los datos resumidos en la tabla 3 también se muestran gráficamente en la figura 3. Los datos de la tabla 3 también se han usado para calcular los diagramas de cajas mostrados en la figura 4. Las figuras 3 y 4 demuestran que existe bastante diferencia en el promedio de los valores de SFRP-3 medidos en sueros derivados de pacientes con insuficiencia cardíaca en comparación con los valores de SFRP-3 medidos en sueros derivados de individuos de control aparentemente sanos.

10 Ejemplo 5

Combinaciones de marcadores que comprenden el marcador SFRP-3 en la evaluación de la insuficiencia cardíaca

Ejemplo 5.1. La combinación de marcadores NT-proBNP y SFRP-3

15 La combinación de marcadores NT-proBNP y SFRP-3 se evalúa para la diferenciación de pacientes en fase B y fases C más D, respectivamente. Se evalúa la precisión diagnóstica analizando muestras de líquido individuales obtenidas a partir de grupos de individuos bien caracterizados, es decir, 50 individuos en la fase B de acuerdo con los criterios de ACA/ACC para la clasificación de HF y 50 pacientes que padecen HF y que tienen la fase C de acuerdo con los
 20 criterios de ACA/ACC para la clasificación de HF. NT-proBNP medido por un ensayo disponible comercialmente (Roche Diagnostics, ensayo NT-proBNP (N.º cat. 03 121 640 160 para analizador de inmunoensayo Elecsys® Systems) y SFRP-3 medido como se describe anteriormente, se cuantifican en una muestra de suero obtenida a partir

de cada uno de estos individuos. Se realiza un análisis ROC de acuerdo con Zweig, M.H., y Campbell, G., *supra*. La capacidad discriminadora para diferenciar pacientes en fase C de individuos en fase B para la combinación de SFRP-3 con el marcador NT-proBNP establecido se calcula por análisis discriminante regularizado (Friedman, J. H., Regularized Discriminant Analysis, Journal of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175).

5

Ejemplo 5.2 La combinación de marcadores troponina T y SFRP-3

Se evalúa la combinación de marcadores troponina T y SFRP-3 para la diferenciación de pacientes que padecen una complicación cardíaca aguda de pacientes que padecen cardiopatía crónica, respectivamente. Se evalúa la precisión diagnóstica analizando las muestras de líquido individuales obtenidas de grupos de individuos bien caracterizados, es decir, 50 individuos diagnosticados con una complicación cardíaca aguda y 50 individuos diagnosticados con cardiopatía crónica. La troponina T medida por un ensayo disponible comercialmente (Roche Diagnostics, ensayo de troponina T (N.º cat. 201 76 44 para analizador de inmunoensayo Elecsys® Systems) y SFRP-3 medida como se describe anteriormente, se cuantifican en una muestra de suero obtenida de cada uno de estos individuos. Se realiza un análisis ROC de acuerdo con Zweig, M. H., y Campbell, G., *supra*. La capacidad discriminadora para diferenciar pacientes en fase C de individuos en fase B para la combinación de SFRP-3 con el marcador NT-proBNP establecido se calcula por análisis discriminante regularizado (Friedman, J. H., J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175).

10

15

20

Ejemplo 5.3 La combinación de marcadores NT-proBNP y CRP

Se evalúa la combinación de marcadores proteína C reactiva y SFRP-3 para la diferenciación de pacientes diagnosticados con una miocardiopatía frente a controles que no padecen ninguna cardiopatía de confusión, respectivamente. Se evalúa la precisión diagnóstica analizando las muestras de líquido individuales obtenidas de grupos bien caracterizados de 50 individuos con miocardiopatía y de 50 individuos de control sanos. CRP medida por un ensayo disponible comercialmente (Roche Diagnostics, ensayo CRP (ensayo de alta sensibilidad de proteína C reactiva cuantitativo Tina (látex)- Roche N.º cat. 11972855 216) y SFRP-3 medida como se describe anteriormente, se cuantifican en una muestra de suero obtenida de cada uno de estos individuos. Se realiza un análisis ROC de acuerdo con Zweig, M.H., y Campbell, G., *supra*. La capacidad discriminadora para diferenciar pacientes en fase C de individuos en fase B para la combinación de SFRP-3 con el marcador NT-proBNP establecido se calcula por análisis discriminante regularizado (Friedman, J. H., J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175).

25

30

ES 2 526 928 T3

Listado de secuencias

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

5 <120> Uso de SFRP-3 en la evaluación de la insuficiencia cardíaca

<130> 24949 WO

<150> EP08008304

10 <151> 30/04/2008

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.2

15 <210> 1

<211> 325

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

Met Val Cys Gly Ser Pro Gly Gly Met Leu Leu Leu Arg Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys Leu Leu Arg Val Pro Gly Ala Arg Ala
 20 25 30

Ala Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp
 35 40 45

Asn Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn
 50 55 60

Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys
 65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys
 85 90 95

Thr Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys
 100 105 110

Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His
 115 120 125

Ser Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg
 130 135 140

ES 2 526 928 T3

Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr Ala Asp Gly Ala Asp
 145 150 155 160

Phe Pro Met Asp Ser Ser Asn Gly Asn Cys Arg Gly Ala Ser Ser Glu
 165 170 175

Arg Cys Lys Cys Lys Pro Ile Arg Ala Thr Gln Lys Thr Tyr Phe Arg
 180 185 190

Asn Asn Tyr Asn Tyr Val Ile Arg Ala Lys Val Lys Glu Ile Lys Thr
 195 200 205

Lys Cys His Asp Val Thr Ala Val Val Glu Val Lys Glu Ile Leu Lys
 210 215 220

Ser Ser Leu Val Asn Ile Pro Arg Asp Thr Val Asn Leu Tyr Thr Ser
 225 230 235 240

Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Leu Asn Val Asn Glu Glu Tyr Ile Ile
 245 250 255

Met Gly Tyr Glu Asp Glu Glu Arg Ser Arg Leu Leu Leu Val Glu Gly
 260 265 270

Ser Ile Ala Glu Lys Trp Lys Asp Arg Leu Gly Lys Lys Val Lys Arg
 275 280 285

Trp Asp Met Lys Leu Arg His Leu Gly Leu Ser Lys Ser Asp Ser Ser
 290 295 300

Asn Ser Asp Ser Thr Gln Ser Gln Lys Ser Gly Arg Asn Ser Asn Pro
 305 310 315 320

Arg Gln Ala Arg Asn
 325

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para evaluar la insuficiencia cardíaca en un individuo que comprende las etapas de
 - 5 a) medir en una muestra obtenida del individuo la concentración del marcador proteína relacionada con Frizzled secretada 3 (SFRP-3),
 - b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca, y
 - 10 c) evaluar la insuficiencia cardíaca comparando la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la(s) concentración/concentraciones determinada(s) en la etapa (b) con la concentración de este marcador o estos marcadores como se establece en una muestra de control, en el que dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en suero, plasma y sangre completa y, en el que un incremento en la proteína SFRP-3 es
 - 15 indicativo de insuficiencia cardíaca.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque además dicha muestra es suero.
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque además dicho uno o más de otros marcadores se seleccionan del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un
- 20 marcador de troponina cardíaca, y un marcador de inflamación.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque además dicho uno o más de otros marcadores es NT-proBNP.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque además dicho uno o más de otros marcadores es troponina T.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el marcador SFRP-3 se mide en una muestra
- 30 obtenida de un individuo con riesgo de insuficiencia cardíaca.
7. Uso de un nivel incrementado de la proteína SFRP-3 en una muestra seleccionada del grupo que consiste en suero, plasma, y sangre completa como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.
- 35 8. Use de una combinación de marcadores que comprende un nivel incrementado de proteína SFRP-3 en una muestra seleccionada del grupo que consiste en suero, plasma, y sangre completa y uno o más de otros marcadores de insuficiencia cardíaca en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.
9. Uso de la combinación de marcadores de acuerdo con la reivindicación 8, en el que uno o más de otros
- 40 marcadores se selecciona del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación.
10. Uso de una combinación de marcadores de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende al menos SFRP-3, y
- 45 NT-proBNP.

Fig. 1A

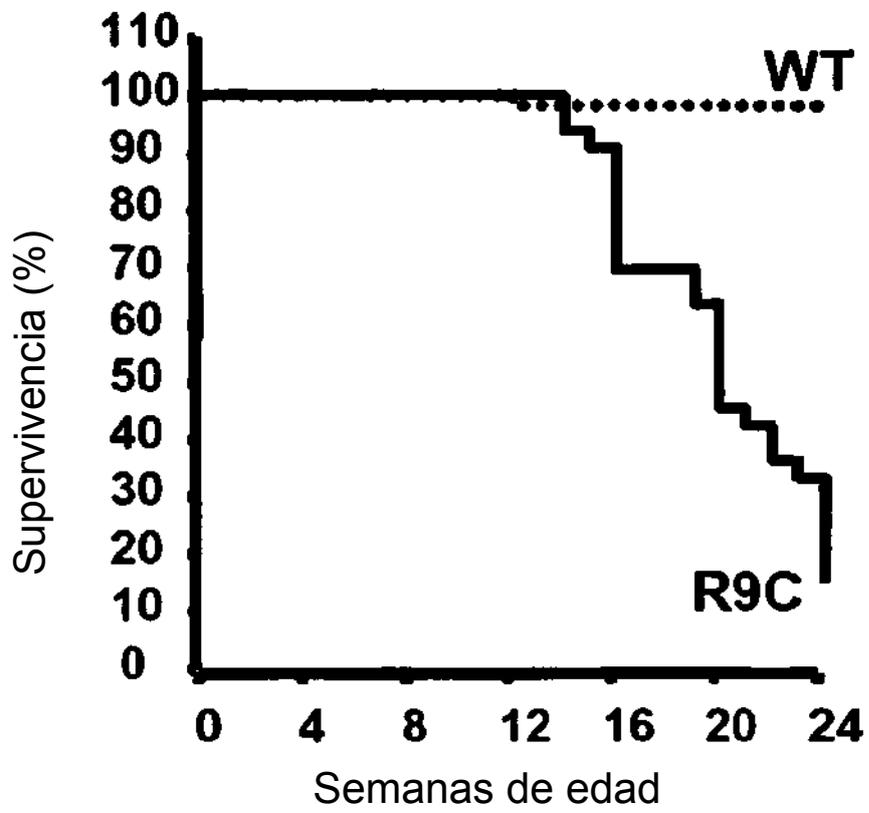


Fig. 1B

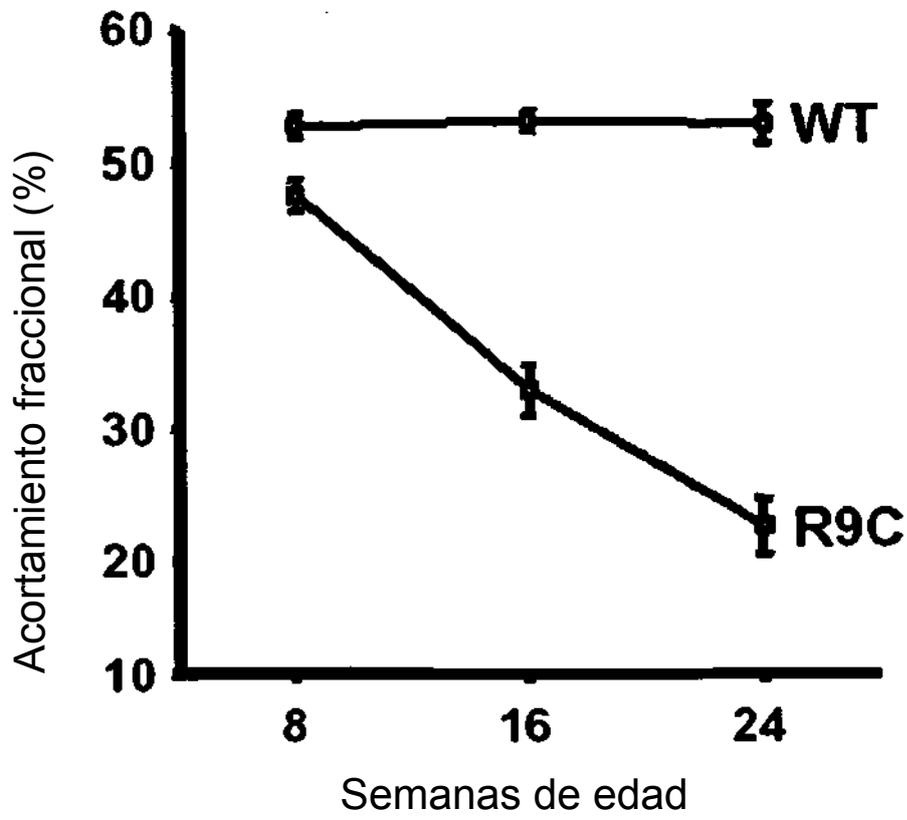


Fig. 2

Función cardíaca en ratones AB y controles

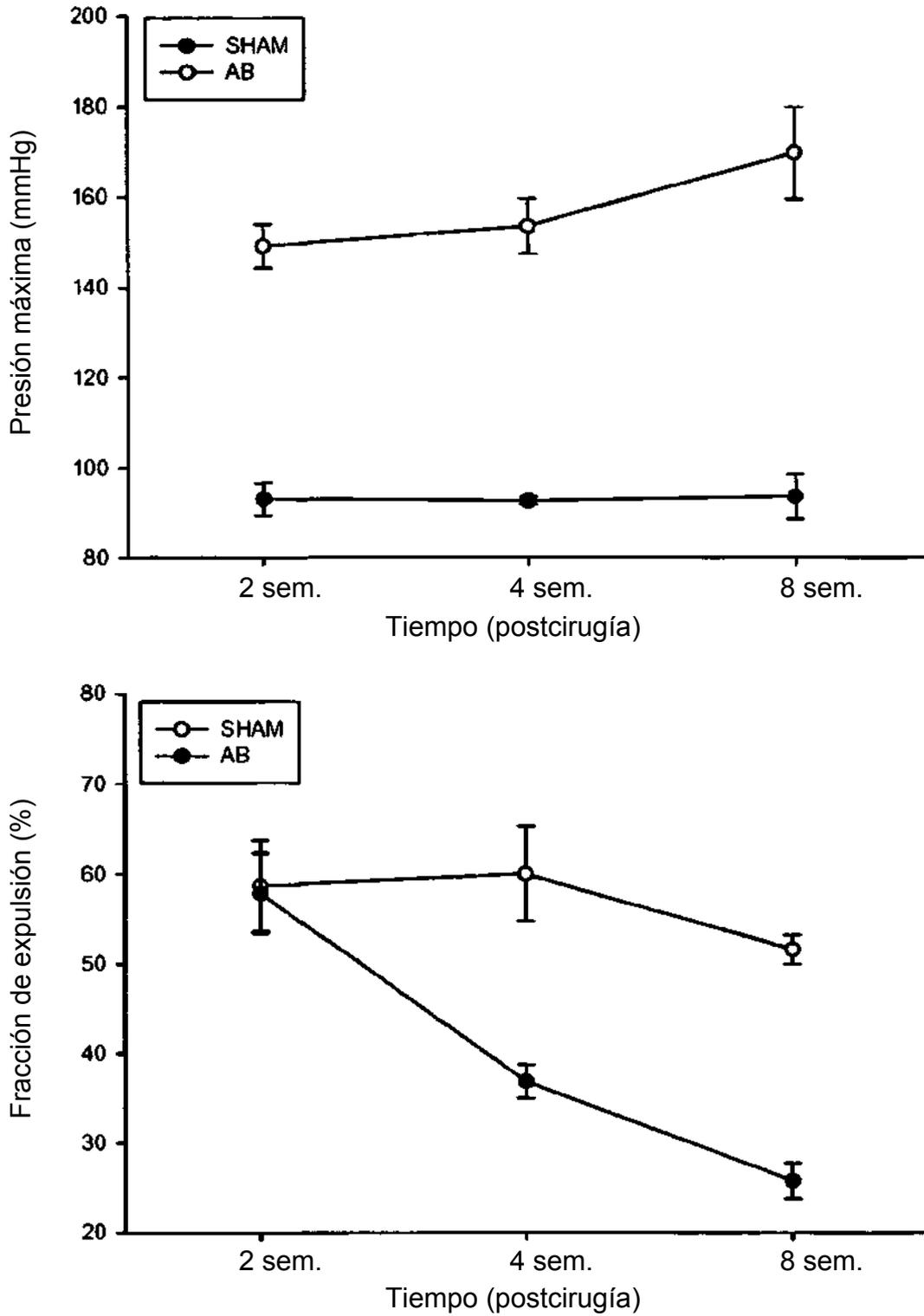


Fig. 3

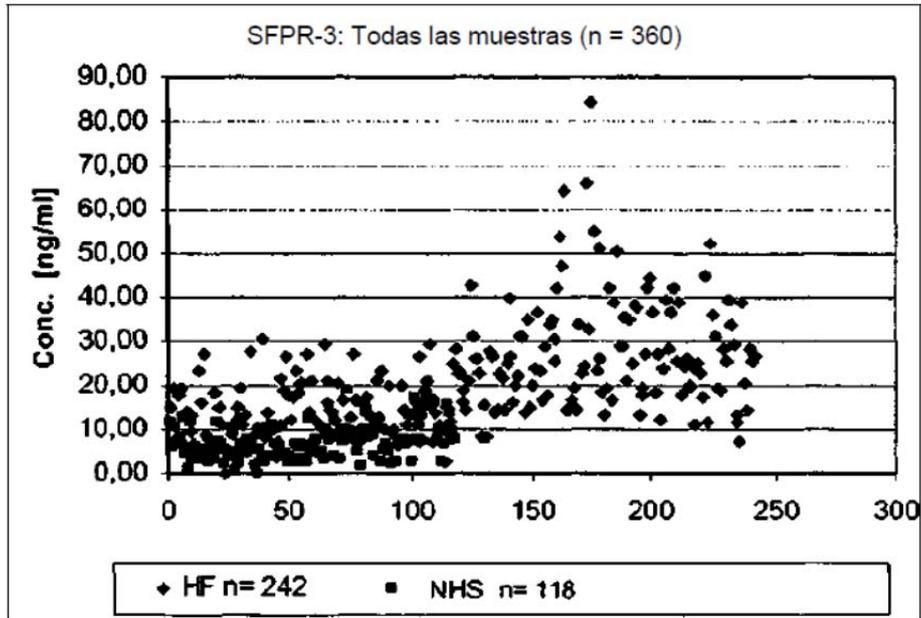


Fig. 4

