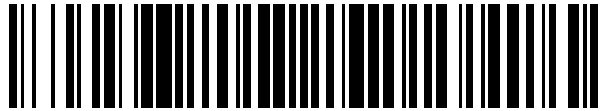


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 009**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2008 E 08707286 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2115477**

54 Título: **Uso de IGFBP-7 en la evaluación de la insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

25.01.2007 EP 07001582

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

13.10.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH y

THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF TORONTO (50.0%)

72 Inventor/es:

WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE;

BLOCK, DIRK;

EMILI, ANDREW;

FONG, VINCENT;

GRAMOLINI, ANTHONY;

HESS, GEORG;

HUEDIG, HENDRIK;

ISSERLIN, RUTH;

KISLINGER, THOMAS;

LIU, PETER;

MACLENNAN, DAVID y

VON DER ELTZ, HERBERT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 548 009 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 IGFBP-7 en la evaluación de la insuficiencia cardíaca

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para evaluar la insuficiencia cardíaca en un individuo, que comprende las etapas de a) medir en una muestra obtenida del individuo la concentración de la proteína marcadora proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP-7), b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de una o más proteínas marcadoras de la insuficiencia cardíaca distintas, y evaluar la insuficiencia cardíaca mediante la comparación de la concentración determinada en la etapa (a), y opcionalmente la(s) concentración(es) determinada(s) en la etapa (b), con la concentración de esta proteína marcadora o estas proteínas marcadoras según lo establecido en una muestra de control, en el que un aumento del valor de IGFBP y, opcionalmente, de otra(s) proteína(s) marcadora(s) es indicativa de insuficiencia cardíaca, que además se caracteriza porque dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total. También se reivindican el uso de IGFBP-7 como una proteína marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca y de una combinación de marcadores que comprenda la IGFBP-7.

20 Antecedentes de la invención

La insuficiencia cardíaca (IC) es un problema importante y creciente de salud pública. En los Estados Unidos, por ejemplo, aproximadamente 5 millones de pacientes tienen IC y más de 550.000 pacientes son diagnosticados de IC por primera vez cada año (en: American Heart Association, Heart Disease and Stroke Statistics: 2005 Update, Dallas, Texas, American Heart Association (2005)). Del mismo modo, las estadísticas estadounidenses muestran que la IC es la razón principal de entre 12 y 15 millones de consultas y 6,5 millones de días de hospitalización por año. De 1990 a 1999, el número anual de hospitalizaciones ha aumentado de aproximadamente 810.000 a más de 1 millón de IC como diagnóstico primario y 2,4 a 3,6 millones de dólares para la IC como diagnóstico primario o secundario. En 2001, cerca de 53.000 pacientes murieron de IC como causa primaria. La insuficiencia cardíaca es principalmente una enfermedad de ancianos, y por tanto el ampliamente reconocido "envejecimiento de la población" también contribuye al aumento de la incidencia de IC. La incidencia de la IC se aproxima al 10 por 1000 en la población después de los 65 años. Sólo en los EE.UU., los costos directos e indirectos estimados totales de la IC en 2005 fueron de aproximadamente 27,9 billones de dólares y aproximadamente 2.9 billones de dólares se gastan al año en medicamentos para el tratamiento de la IC (cf. la estadística de la AHA citada anteriormente).

35 Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca se caracteriza por una pérdida en la capacidad del corazón para bombear tanta sangre como el cuerpo necesita. La insuficiencia no significa que el corazón ha dejado de bombear, sino que no logra bombear sangre tan eficazmente como debería.

La NYHA [New York Heart Association] y la ACC/AHA [American Association of Cardiology/ American Heart Association] han establecido dos clases funcionales de IC para evaluar la progresión de la enfermedad. El esquema de clasificación de la NYHA tiene cuatro clases de estado de la enfermedad: la clase 1 es asintomática en cualquier nivel de esfuerzo, la clase 2 es sintomática en el ejercicio intenso, y las clases III y IV son sintomáticas en ejercicio ligero y sin esfuerzo, respectivamente.

En el esquema de cuatro etapas de la ACC/AHA, la etapa A es sintomática, pero es de riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, en la etapa B hay evidencia de disfunción cardíaca asintomática, en la etapa C hay evidencia de disfunción cardíaca con síntomas, y en la Etapa D el sujeto tiene síntomas de IC a pesar del tratamiento máximo.

50 Etiología de la IC

Médicamente, la insuficiencia cardíaca (IC) se debe apreciar como una enfermedad compleja. Puede ser causada por la ocurrencia de un evento que la dispare, como un infarto de miocardio (ataque al corazón) o ser secundaria a otras causas, como la hipertensión, la diabetes o malformaciones cardíacas como una enfermedad valvular. El infarto de miocardio u otras causas de IC resultan en una disminución inicial en la capacidad de bombeo del corazón, por ejemplo por daños en el músculo cardíaco. Esta disminución de la capacidad de bombeo puede no ser perceptible inmediatamente, debido a la activación de uno o más mecanismos compensatorios. Sin embargo, se ha encontrado que la progresión de la IC que es independiente del estado hemodinámico del paciente. Por lo tanto, los cambios perjudiciales causados por la enfermedad están presentes y en curso, incluso mientras el paciente permanece asintomático. De hecho, los mecanismos compensatorios que mantienen una función cardiovascular normal durante las fases tempranas de la IC en realidad pueden contribuir a la progresión de la enfermedad a largo plazo, por ejemplo, al ejercer efectos nocivos sobre el corazón y su capacidad para mantener un nivel suficiente de flujo de sangre en la circulación.

65

Algunos de los más importantes cambios fisiopatológicos que se producen en la IC son (i) la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, (ii) la disfunción endotelial sistémica y (iii) la remodelación del miocardio.

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

(ii) la disfunción endotelial sistémica es una característica bien reconocida de la IC y está claramente presente en el momento en el que se presentan señales de disfunción ventricular izquierda. La disfunción endotelial es importante con respecto a la íntima relación de la microcirculación miocárdica con los miocitos cardíacos. La evidencia sugiere que la disfunción microvascular contribuye significativamente a la disfunción de los miocitos y los cambios morfológicos que conducen a la progresiva insuficiencia miocárdica.

En términos de fisiopatología subyacente, la evidencia sugiere que la disfunción endotelial puede ser causada por una carencia relativa de NO que puede atribuirse a un aumento en la formación vascular de O₂ por una oxidasa dependiente de NADH y el posterior exceso de recogida de NO. Los factores que contribuyen al aumento de producción de O₂ incluyen el aumento del tono simpático, la noradrenalina, la angiotensina II, endotelina-1 y TNF- α . Además, los niveles de IL-10, una citocina antiinflamatoria clave, se encuentran inadecuadamente bajos en relación con los niveles de TNF- α . Actualmente se cree que los niveles elevados de TNF- α , con citoquinas proinflamatorias asociadas, incluyendo la IL-6 y los receptores de TNF- α soluble, desempeñan un papel importante en la evolución de la IC al causar una disminución de la contractilidad miocárdica, dilatación biventricular e hipotensión, y están probablemente implicados en la activación y disfunción endoteliales. También se cree que el TNF- α puede desempeñar un papel en el desgaste muscular, hasta el momento sin explicación, que se produce en pacientes con IC grave. Los estudios preliminares en un pequeño número de pacientes en terapia con receptor de TNF soluble han indicado mejoras en la clasificación funcional de la NYHA y en el bienestar del paciente, medido mediante 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 puede describirse como una serie de cambios adaptativos en el miocardio, como alteraciones en la forma, masa y volumen ventricular (Piano, MR, et al., J. Cardiovasc Nurs 14 (2000) 1-23; Molkentin, JD, Ann Rev. Physiol 63 (2001) 391-426). Los principales componentes de la remodelación miocárdica son alteraciones en la biología de los miocitos, como una hipertrofia de los miocitos, pérdida de miocitos por necrosis o apoptosis, alteraciones en la matriz extracelular y alteraciones en la geometría de la cámara ventricular izquierda. No está claro si la remodelación del miocardio es simplemente la respuesta de los órganos diana que se produce tras 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 evidencias hasta la fecha sugieren que una terapia adecuada puede retrasar o detener la progresión de la remodelación del miocardio.

Marcadores y estado de la enfermedad

Como se ha indicado anteriormente, la hipertrofia de los miocitos es probable que represente uno de los primeros pasos hacia la IC. La hipertrofia de los miocitos se caracteriza por un aumento de la expresión de algunos genes que codifican las proteínas contráctiles, tales como la cadena pesada de la p-miosina y la troponina T (TnT), y de algunas proteínas no contráctiles, como los péptidos natriuréticos de tipo A y de tipo B, por un aumento del tamaño celular y por la alteración del citoesqueleto (Piano, MR, et al, J. Cardiovasc. Nurs. 14 (2000) 1-23; Molkentin, JD, Ann Rev. Physiol 63 (2001) 391 a 426).

Los estudios en modelos humanos y animales de insuficiencia cardíaca sugieren una función deprimida de los miocitos en las últimas etapas de la insuficiencia cardíaca. Se ha sugerido que los mecanismos que subyacen a la disfunción de los miocitos implican alteraciones en el vía de manejo de calcio, los miofilamentos y el citoesqueleto (de Tombe, PP, Cardiovasc. Res. 37 (1998) 367-380). Por ejemplo, en modelos humanos y animales de insuficiencia cardíaca, la actividad enzimática ATPasa-calcio en el retículo endoplásmico se reduce, mientras que tanto los niveles de RNAm como de proteína del intercambiador de Na⁺/Ca²⁺ de la sarcolema se incrementan. Por otra parte, hay una conmutación de isoformas de TnT, una reducción de la fosforilación de la troponina I (TnI), disminución de la actividad de la ATPasa de actomiosina miofibrilar y potenciación de la formación de microtúbulos, tanto en modelos humanos como animales de insuficiencia cardíaca.

Inicialmente los cambios en el corazón que llevan a la remodelación del miocardio están destinados a compensar las partes enfermas del miocardio con el fin de sostener la demanda del cuerpo de oxígeno y nutrientes. Sin embargo, la fase de compensación de la insuficiencia cardíaca es limitada, y, en última instancia, la insuficiencia cardíaca es incapaz de mantener un gasto cardíaco adecuado para satisfacer las necesidades del cuerpo. Por lo tanto, hay una transición de una fase compensatoria a la fase de descompensación. En la fase de descompensación, la cascada de

cambios en el corazón continúa, pero ya no es beneficiosa, y hace que el paciente progrese de insuficiencia cardíaca a un estado crónico y finalmente la muerte. De acuerdo con la "ACC/ AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult" (S. Hunt et al., www.acc.org = guías de práctica de la ACC/ AHA) el continuo de enfermedad en el área de la insuficiencia cardíaca, se agrupa hoy en cuatro etapas como se señaló anteriormente. En las fases A y B se encuentran las personas con riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, mientras que las fases C y D representan los grupos de pacientes con signos y síntomas de insuficiencia cardíaca. Los detalles para la definición de las diferentes etapas de la A a la D se dan en la referencia anterior.

Métodos de diagnóstico de la insuficiencia cardíaca

La prueba diagnóstica más útil en la evaluación de los pacientes con IC es el ecocardiograma 2-dimensional completo, junto con estudios de flujo Doppler para determinar si están presentes anomalías de miocardio, de las válvulas del corazón o el pericardio y si las cámaras están involucradas. Tres preguntas fundamentales deben responderse: 1) ¿la FEVI está conservada o reducida?, 2) ¿es la estructura del VI normal o anormal?, y 3) ¿hay otras anomalías estructurales como anomalías valvulares, pericárdicas o del ventrículo derecho que podrían ser responsables de la presentación clínica? Esta información debe cuantificarse con una estimación numérica de EF, la medición de las dimensiones y/o volúmenes ventriculares, medición del espesor de la pared, y la evaluación de la geometría de la cámara y el movimiento de la pared regional. El tamaño del ventrículo derecho y el funcionamiento sistólico deben evaluarse. También se debe determinar semicuantitativamente el tamaño auricular y medir las dimensiones y/o volúmenes auriculares izquierdos.

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

El volumen de bombeo se puede determinar con la combinación de las dimensiones medidas y el Doppler pulsado en el tracto de salida del ventrículo izquierdo. Sin embargo, pueden estar presentes anomalías en cualquiera de estos parámetros en ausencia de IC. Ninguno de estos se correlaciona necesariamente de forma específica con la IC, sin embargo, un patrón totalmente normal de llenado argumenta en contra de una IC clínica.

Desde un punto de vista clínico, la enfermedad es clínicamente asintomática en las fase compensatoria y de descompensación temprana (completamente asintomáticas en la fase A y con cardiopatía estructural, pero sin signos y síntomas de IC en la etapa B, véanse las guías de práctica de la AHA/ ACC). Los signos externos de la enfermedad (como la falta de aire) no aparecen hasta bien entrada la fase de descompensación (es decir, las etapas C y D de acuerdo con las guías de la AHA/ ACC). Actualmente, el diagnóstico se basa en los síntomas externos de los pacientes en las etapas C y D.

Típicamente los pacientes con insuficiencia cardíaca reciben un tratamiento estándar con fármacos que interactúan con los mecanismos específicos implicados en la insuficiencia cardíaca. No hay pruebas de diagnóstico que reflejen esos mecanismos específicos de forma fiable y ayudan al médico a escoger el medicamento correcto (y su dosis) para el paciente adecuado (por ejemplo, los inhibidores ACE, AT II, bloqueadores beta, etc.).

Diagnóstico previo de la IC con marcadores

La evaluación temprana de pacientes con riesgo de insuficiencia cardíaca parece ser posible sólo mediante marcadores bioquímicos ya que el individuo en riesgo de desarrollar una insuficiencia cardíaca en esa etapa todavía está libre de síntomas de IC clínica. Actualmente no hay marcadores bioquímicos establecidos para la evaluación pre-sintomática fiable de la enfermedad. En la actualidad, en el momento en el que se establece el diagnóstico de IC, la enfermedad ya está muy avanzada.

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

Pronóstico de IC y necesidades

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

Una mejora en la evaluación precoz de individuos con riesgo de insuficiencia cardíaca, es decir, de las personas que son clínicamente asintomáticas para la insuficiencia cardíaca, está garantizada.

Se ha establecido en los últimos años que los marcadores péptido natriurético de tipo B representan una excelente herramienta para controlar la progresión de la enfermedad en pacientes con IC y para evaluar su riesgo de complicaciones cardiovasculares, como el infarto de miocardio.

5 Sin embargo, como en muchas otras áreas de diagnóstico, un solo marcador no es suficiente.

Mientras que un bajo valor de NT-proBNP tiene un alto valor predictivo negativo para descartar IC o DVI, el valor predictivo positivo para la insuficiencia cardíaca en los estudios anteriores y otros (véase Triepels RH, et al., Clin. Chem. 49, Supl. A (2003) 37-38) se ha encontrado que está en el rango del 50-60%. Por lo tanto, un marcador útil en la evaluación de individuos en riesgo de insuficiencia cardíaca que en sí mismo, por ejemplo, tenga un alto valor, o en combinación con NT-proBNP, y en comparación con NT-proBNP solamente, tenga un valor predictivo positivo mejorado para IC, es de alta 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 mayor progreso técnico en esta área de diagnóstico clínico tan importante y exigente.

Resumen de la invención

20 Recientemente se ha encontrado y establecido que el marcador proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP-7) puede ayudar en la evaluación de la insuficiencia cardíaca. En una realización, puede ayudar a determinar si una persona está en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. En un aspecto adicional, puede ayudar en la evaluación de la progresión de la enfermedad.

25 En otra realización, se puede ayudar a predecir la aparición de insuficiencia cardíaca. En otra realización, puede ayudar en la evaluación y selección de un régimen de tratamiento adecuado para prevenir o tratar la insuficiencia cardíaca. En su sentido más amplio, la invención se refiere al objeto-materia tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas.

30 Se describe aquí un método *in vitro* para evaluar la insuficiencia cardíaca en un individuo que comprende las etapas de medir en una muestra obtenida del individuo la concentración de la proteína marcadora IGFBP-7, de opcionalmente medir en la muestra la concentración de una o más proteína(s) marcadora(s) de la insuficiencia cardíaca adicionales, y de evaluar la insuficiencia cardíaca mediante la comparación de la concentración de IGFBP-7 y opcionalmente la(s) concentración(es) de una o más proteína(s) marcadora(s) con la concentración de esta proteína marcadora la o estas proteínas marcadoras según lo establecido en una muestra de control, en la que un aumento del valor de IGFBP-7 y, opcionalmente, de la(s) otra(s) proteína(s) marcador es indicativa de insuficiencia cardíaca, que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.

40 La invención también se refiere al uso de la proteína IGFBP-7 como una molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

También se describe el uso de una combinación de marcadores que comprende IGFBP-7 y uno o más marcadores de la insuficiencia cardíaca distintos, en la evaluación de la insuficiencia cardíaca, como se describe en las reivindicaciones.

45 También se describe un equipo para realizar el método para evaluar la insuficiencia cardíaca *in vitro* que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador de IGFBP-7, de opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más marcadores de insuficiencia cardíaca, y de evaluar la insuficiencia cardíaca mediante la comparación de la concentración de IGFBP-7 y opcionalmente la(s) concentración(es) de uno o más marcadores distintos, con la concentración de este marcador o estos marcadores según se establece en una población de referencia, y el equipo comprende los reactivos necesarios para medir específicamente IGFBP-7 y opcionalmente, de uno o más marcadores de insuficiencia cardíaca adicionales.

55 Los aspectos adicionales y las ventajas de la presente invención serán evidentes a la vista de la descripción que sigue. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

60 Descripción detallada de la invención

En una primera realización, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para evaluar la insuficiencia cardíaca en un individuo que comprende las etapas de a) medir en una muestra obtenida del individuo la concentración de la proteína marcadora IGFBP-7, b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más proteína(s) marcadora(s) de la insuficiencia cardíaca adicionales, y c) la evaluación de la insuficiencia cardíaca mediante la comparación de la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente la(s) concentración(es)

determinada(s) en la etapa (b), con la concentración de esta proteína marcadora o estas proteínas marcadoras según lo establecido en una muestra de control, en donde un aumento del valor de IGFBP y, opcionalmente, de la(s) proteína(s) marcadora(s) adicionales es indicativa de insuficiencia cardiaca, y que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.

Como se utiliza en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado que se le asocia en esta sección.

Los artículos "un" y "una" se utilizan aquí para referirse a uno o a más (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un anticuerpo" se refiere a un anticuerpo o más de un anticuerpo.

La expresión "uno o más" denota de 1 a 50, preferiblemente de 1 a 20, también preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 15.

El término "marcador" o "marcador bioquímico" tal como se utiliza aquí, se refiere a una molécula que se va a utilizar como diana para el análisis de una muestra de prueba de un paciente. En la presente invención, tales dianas moleculares son proteínas o polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcadores en la presente invención se contempla que puedan incluir fragmentos de origen natural de dicha proteína, en particular, fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables comprenden preferiblemente al menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. Un experto en la técnica reconocerá que las proteínas que son liberadas por las células o presentes en la matriz extracelular pueden resultar dañadas, por ejemplo, durante la inflamación, y podrían degradarse o escindirse en tales fragmentos. Ciertos marcadores se sintetizan en una forma inactiva, que se puede activar posteriormente por proteólisis. Como el experto en la técnica apreciará, las proteínas o fragmentos de los mismos también pueden estar presentes como parte de un complejo. Tal complejo también puede utilizarse como marcador en el sentido de la presente invención. Además o como alternativa, un polipéptido marcador puede llevar una modificación post-traducciona. Ejemplos de modificaciones post-traduccionales, entre otros, son la glicosilación, acilación y/ o fosforilación.

El término "evaluación de la insuficiencia cardíaca" se utiliza para indicar que el método según la presente invención ayudará al médico a evaluar si un individuo está en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca, o ayudará al médico en su evaluación de un paciente de IC en una o varias otras áreas de importancia diagnóstica en la IC. Las áreas preferibles de importancia diagnóstica en la evaluación de un individuo con IC son el estadiaje de la insuficiencia cardíaca, juzgar el riesgo de progresión de la enfermedad, guiar la selección de un medicamento apropiado, el control de la respuesta al tratamiento y el seguimiento de los pacientes con IC. También se describe el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardiaca aguda y crónica.

Un "marcador de insuficiencia cardíaca" en el sentido de la presente invención es un marcador que si se combina con el marcador de IGFBP-7 añade información relevante en la evaluación de la IC en la cuestión diagnóstica bajo investigación. La información se considera relevante o de valor añadido, si para la evaluación de IC se puede mejorar la especificidad dada la sensibilidad, o si la sensibilidad dada la especificidad, respectivamente, mediante la inclusión de dicho marcador en una combinación de marcadores que comprende el marcador IGFBP-7. Preferiblemente, 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. Preferiblemente, se selecciona uno o más marcadores de la insuficiencia cardíaca adicionales de entre el grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de la troponina cardíaca y un marcador de la inflamación.

El término "muestra" se refiere a una muestra biológica obtenida con el propósito de su evaluación *in vitro*. Generalmente, una muestra o muestra del paciente preferiblemente comprende cualquier fluido corporal. Muestras bien conocidas incluyen la sangre, suero, plasma, orina, saliva y líquido sinovial. En la presente invención, la muestra es sangre total, suero o plasma.

Como el experto en la materia apreciará, cualquiera de tales evaluaciones se realiza *in vitro*. La muestra del paciente se descarta posteriormente. La muestra del paciente se utiliza únicamente para el método *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere de nuevo en el cuerpo del paciente.

La expresión "comparando la concentración... con la concentración establecida en una muestra de control" se utiliza simplemente para ilustrar adicionalmente lo que de todos modos es evidente para el experto en la materia. La muestra de control puede ser una muestra de control interna o externa. En una realización, se usa una muestra de control interno, es decir el nivel de los marcadores se evalúa en la muestra de prueba, así como en una o más muestras adicionales tomadas del mismo sujeto para determinar si hay algún cambio en los niveles de dichos marcadores. En otra realización, se usa una muestra de control externo. Para una muestra de control externo, se compara la presencia o cantidad de un marcador en una muestra derivada del individuo con su presencia o cantidad en un individuo que se conoce que sufre de, o está en riesgo de una afección dada; o con un individuo que se sabe está libre de una enfermedad determinada, es decir, una "persona normal". Por ejemplo, un nivel de marcador en una muestra de paciente se puede comparar con un nivel conocido que se asocia con un curso específico de la enfermedad en IC. Por lo general, el nivel de marcador de la muestra se correlaciona directa o indirectamente con

un diagnóstico y el nivel del marcador, por ejemplo se utiliza para determinar si una persona está en riesgo de insuficiencia cardíaca. Alternativamente, el nivel de marcador de la muestra puede, por ejemplo, compararse con un nivel conocido del marcador asociado con una respuesta a la terapia en pacientes con IC, para el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica, para una guía para la selección de un medicamento apropiado para el tratamiento de la IC, para un juicio del riesgo de progresión de la enfermedad, o para el seguimiento de los pacientes con IC. Dependiendo del uso diagnóstico previsto se elegirá una muestra de control apropiada y un valor del control o de la referencia para el marcador establecido en la misma. El experto en la materia apreciará que dicha muestra de control en una realización se obtiene de una población de referencia que debe ser del mismo rango de edad y libre de enfermedades de confusión. También será obvio para el experto en la materia, que los valores absolutos de los marcadores establecidos en una muestra de control dependerán de ensayo utilizado. Preferiblemente, las muestras de 100 individuos bien caracterizados de una población de referencia apropiada se utilizan para establecer un valor control (de referencia). También preferiblemente la población de referencia se puede elegir que consista en 20, 30, 50, 200, 500 o 1000 individuos. Los individuos sanos representan una población de referencia preferible para establecer un valor control.

Un valor aumentado de IGFBP-7 tal y como se mide a partir de una muestra derivada de un individuo es indicativa de insuficiencia cardíaca.

Los valores de IGFBP-7, medido en un grupo control o población control, por ejemplo, se utilizan para establecer un valor de corte o un rango de referencia. Un valor por encima de dicho valor de corte o fuera del rango de referencia y su extremo más alto se considera elevado.

En una realización, se establece un solo valor de corte fijo. Tal valor de corte se elige para que coincida con la cuestión diagnóstica de interés.

En una forma de realización, los valores de IGFBP-7 según se mide en un grupo de control o población de control se utilizan para establecer un rango de referencia. En una realización preferible, una concentración de IGFBP-7 se considera elevada si el valor medido está por encima del percentil 90% del rango de referencia. En otras realizaciones preferidas una concentración de IGFBP-7 se considera elevada si el valor medido está por encima del percentil 95%, el percentil 96%, el percentil 97% o el percentil 97,5% del rango de referencia.

En una realización, la muestra de control será una muestra de control interno. En esta realización, se obtienen muestras en serie de la persona objeto de investigación y los niveles de los marcadores se comparan. Esto puede ser por ejemplo útil para evaluar la eficacia de la terapia.

El método de acuerdo con la presente invención se basa en una muestra líquida que se obtiene de un individuo y en la medición de IGFBP-7 en dicha muestra. Un "individuo" como se utiliza aquí se refiere a un solo organismo humano o no humano. Por lo tanto, los métodos y composiciones descritos en este documento son aplicables tanto a la enfermedad humana como veterinaria. Preferiblemente, el individuo es un ser humano.

IGFBP-7

Factores de crecimiento tipo insulina (IGF) y proteínas de unión correspondientes (BP)

El sistema de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) juega un papel importante en el crecimiento y la diferenciación celular. Se compone de dos ligandos, IGF-I e IGF-II, dos receptores, los receptores de IGF tipo 1 y tipo 2, y desde 1.995 de seis proteínas de unión a IGF (IGFBP), las IGFBP-1 a -6 (Jones, JI, et al., *Endocr. Rev.* 16 (1995) 3-34). Recientemente la familia IGFBP se ha ampliado para incluir las proteínas relacionadas con IGFBP (IGFBP-RPS), que tienen similitudes estructurales significativas con las IGFBP (Hwa, V., et al., *Endocr. Rev.* 20 (1999) 761-787). Por lo tanto, la superfamilia IGFBP incluye los seis IGFBP convencionales, que tienen alta afinidad por los IGF, y al menos 10 IGFBP-RPS, que no sólo comparten el dominio amino-terminal conservado de las IGFBP sino que también muestran un cierto grado de afinidad por los IGF y la insulina. Las IGFBP-RPS son un grupo de proteínas ricas en cisteína que controlan diversas funciones celulares, tales como el crecimiento celular, la adhesión celular y la migración, y la síntesis de la matriz extracelular. Además, estas proteínas podrían estar implicadas en procesos biológicos como la proliferación y la diferenciación de tejidos, la reproducción, la angiogénesis, la reparación de heridas, la inflamación, fibrosis y la tumorigénesis (Hwa, V., et al., *Endocr. Rev.* 20 (1999)).

La proteína de unión a IGF 7 (= IGFBP-7) es una glicoproteína modular de 30 kDa que se conoce es secretada por las células endoteliales, células musculares lisas vasculares, fibroblastos y células epiteliales (Ono, Y., et al., *Biochem Biophys Res Comm* 202 (1994) 1490 - 1496). En la literatura esta molécula también se ha denominado FSTL2, IBP 7, proteína de unión a IGF relacionada con la proteína 1, IGFBP 7, IGFBP 7v, IGFBP rP1, IGFBP7, IGFBPRP1, proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7, precursor de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7, MAC25, proteína MAC25, factor estimulante PGI2 y PSF o factor estimulante de prostaciclina. Los estudios de transferencia Northern revelaron una amplia expresión de este gen en

los tejidos humanos, incluyendo corazón, cerebro, placenta, hígado, músculo esquelético y páncreas (Oh, Y., et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 30322- 30325).

IGFBP-7 fue inicialmente identificado como un gen expresado diferencialmente en leptomeníngeo normal y las células epiteliales mamarias, en comparación con sus respectivas células tumorales, y se nombró cDNA asociado a meningioma (MAC25) (Burger, AM, et al., Oncogene 16 (1998) 2459-2467). La proteína expresada se purificó de forma independiente como un factor de adhesión derivado de tumores (más tarde renombrado angiomodulina) (Sprenger, CC, et al., Cancer Res 59 (1999) 2370-2375) y como un factor estimulante de la prostaciclina (Akaogi, K., et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 93 (1996) 8384-8389). Además, se ha reportado como T1A12, un gen infraregulado en los carcinomas de mama (StCroix, B., et al., Science 289 (2000) 1197-1202).

Las funciones biológicas de IGFBP-7 todavía no se han establecido claramente. Los datos experimentales preliminares son algo controvertidos y se refieren a diversas acciones para la IGFBP-7, tales como la supresión de tumores (Sprenger, CC, et al., Cancer Res 59 (1999) 2370-2375), la promoción del crecimiento tumoral (López-Bermejo, A., et al., J. Clinical Endocrinology and Metabolism 88 (2003) 3401-3408), la estimulación de la prostaciclina (Akaogi, K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 8384-8389) y participación en la angiogénesis (Yamauchi, T., et al., Biochem J. 303 (1994) 591-598) y la senescencia (López-Bermejo, A., et al., Endocrinology 141 (2000) 4072-4080).

La expresión diferencial del mRNA de IGFBP-7 se midió en pacientes que sufrían diversas enfermedades incluyendo la enfermedad cardíaca, enfermedad renal, enfermedades inflamatorias (US 6.709.855 de Scios Inc.) y la enfermedad del injerto vascular (US 2006/0003338).

Se han descrito una serie de diferentes ensayos y se han utilizado para probar las propiedades de IGFBP-7. La unión a IGF de baja afinidad se analizó mediante ensayos de enlace cruzado de afinidad competitiva. La proteína recombinante humana mac25 se une específicamente a IGF-I y -II (Oh, Y., et al, J. Biol. Chem. 271 (1996) 30322-20325; Kim, HS, et al, Proc Natl Acad. Sci USA 94 (1997) 12981-12986). La actividad IGFBP también puede detectarse mediante la medición de la capacidad de la proteína para unirse a un IGF marcado radiactivamente en una transferencia Western del ligando.

Recientemente se ha realizado la determinación inmunológica de IGFBP-7 en circulación. Se detectaron niveles bajos de este analito en suero humano al azar y se han visto una asociación del aumento de los niveles séricos con la resistencia a la insulina (López-Bermejo, A., et al., J. Clinical Endocrinology and Metabolism 88 (2.003) 3401-3408, López-Bermejo, A., et al., Diabetes 55 (2006) 2333-2339).

Varias solicitudes de patentes se ocupan de la utilidad potencial de las IGFBP como agentes de diagnóstico, agentes preventivos y agentes terapéuticos para una amplia variedad de enfermedades.

La patente US 2003/0186308 describe un polipéptido humano denominado factor estimulante de prostaciclina-2 (PSF-2; = IGFBP-7) y su aplicación diagnóstica opcional para detectar una condición patológica.

La patente WO 2003/54004 especula que IGFBP-7 puede utilizarse para el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades. Se afirma que se puede usar para diagnosticar un trastorno proliferativo celular, un trastorno autoinmune/ inflamatorio, un trastorno cardiovascular, un trastorno neurológico, un trastorno del desarrollo, un trastorno metabólico, un trastorno reproductivo, una infección, un trastorno del crecimiento tal como deficiencia de la hormona de crecimiento, la acromegalia, IUGR, macrosomía, tumorigénesis y cáncer (por ejemplo, cáncer de mama), la diabetes y sus complicaciones (por ejemplo, enfermedad renal diabética), insuficiencia renal crónica, enfermedad vascular, asma, aterosclerosis y restenosis, y otras condiciones patológicas.

La patente US 2004/0072238 se refiere a la detección de proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina expresado diferencialmente o mutado, para el diagnóstico de: enfermedades que acompañan el crecimiento celular anormal, enfermedades que acompañan a la angiopatía, las enfermedades que acompañan a un metabolismo óseo anormal, enfermedades que acompañan a trastornos de los factores de crecimiento similares a la insulina o de la acción de la hormona de crecimiento, enfermedades que acompañan a la diferenciación o el crecimiento anormal de las células de músculo liso, enfermedades que acompañan a la diferenciación anormal o crecimiento de las células del músculo esquelético, enfermedades que acompañan a una secreción de ácido gástrico anormal y las enfermedades inflamatorias. Casi cualquier condición médica relevante se menciona a continuación, en una lista adicional, de la que se dice que comprende las enfermedades que acompañan a uno u otro trastorno como se ha mencionado anteriormente.

La patente WO 2004/042000 describe la aplicación terapéutica de más de 150 proteínas secretadas para diversas indicaciones médicas. Una de las secuencias mencionadas es la secuencia de IGFBP-7.

La patente WO 1994/029448 describe la utilización de una proteína que promueve la producción de PGI2 (factor estimulante de PGI2) para la terapia de varias enfermedades como el síndrome urémico hemolítico, púrpura trombocitopénica trombótica, embolia periférica, isquemia cardíaca, isquemia cerebral, arteriosclerosis, infarto

cerebral, hiperlipemia, diabetes, insuficiencia cardiaca, angina de pecho, enfermedad isquémica del corazón, enfermedad cardiaca congestiva, trastornos circulatorios coroideos, enfermedad bronquial, úlcera gástrica y eclampsia del embarazo en base a la actividad del inhibidor de la agregación plaquetaria, la actividad relajante del músculo liso y la secreción gástrica.

5 La patente WO 00/35473 se refiere a métodos y composiciones para la detección, el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de una enfermedad. Específicamente, una enfermedad cardiaca, renal o inflamatoria, y los trastornos relacionados.

10 Preferiblemente, el marcador IGFBP-7 se mide específicamente a partir de una muestra (como se define anteriormente mediante el uso de un agente de unión específico).

15 Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor para IGFBP-7, una lectina de unión a IGFBP-7 o un anticuerpo contra IGFBP-7. 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 preferiblemente una afinidad de 10^8 L/mol o incluso más preferiblemente 10^9 L/mol por su molécula diana. Como el experto en la materia apreciará, el término específico se utiliza para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para IGFBP-7. Preferiblemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que es sólo el 10% o menos, más preferiblemente sólo un 5% o menos de la afinidad a la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específico preferible cumplirá tanto los criterios mínimos anteriores tanto para la afinidad como para la especificidad.

20 Un agente de unión específico es preferiblemente un anticuerpo reactivo con IGFBP-7. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, así como construcciones genéticas que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

25 Cualquier fragmento de anticuerpo que conserva los criterios anteriores de un agente de unión específico se puede utilizar. Los anticuerpos son generados mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam (1990), todo el libro, especialmente las páginas 43-78). Además, el experto en la materia será consciente de que los métodos basados en inmunosorbentes se pueden utilizar para el aislamiento específico de anticuerpos. Mediante estos métodos, se puede mejorar la calidad de los anticuerpos policlonales y por lo tanto su rendimiento en inmunoensayos (Tijssen, P., supra, págs. 108-115).

30 Para los logros descritos en la presente invención pueden utilizarse anticuerpos policlonales obtenidos de cabra. Sin embargo, claramente también se pueden utilizar anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo, ratas, conejos o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Dado que los anticuerpos monoclonales se pueden producir en cualquier cantidad requerida y con propiedades constantes, representan las herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica.

35 La generación y el uso de anticuerpos monoclonales frente a IGFBP-7 en un método de acuerdo con la presente invención, respectivamente, representan otras realizaciones aun más preferibles.

40 No es fácil purificar IGFBP-7 de una fuente natural. La producción recombinante de IGFBP-7 es un método de elección para obtener mayores cantidades de IGFBP-7. En una realización preferible se produce IGFBP-7 mediante la expresión recombinante usando un sistema de expresión eucariota. Ejemplos de sistemas de expresión eucariotas son la expresión en baculovirus, la expresión en levadura y la expresión en un sistema de expresión de mamífero. En una realización preferible, la expresión de IGFBP-7 se lleva a cabo en un sistema de expresión de mamífero. Ejemplos de sistemas de expresión de mamífero son las células CHO, células HEK, células de mieloma, etc. En una realización preferible adicional se utiliza la IGFBP-7 producida de forma recombinante como antígeno en la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales contra IGFBP-7. También puede ser preferible para purificar anticuerpos policlonales mediante la inmunoadsorción sobre una superficie de inmunoadsorción de IGFBP-7 hacer uso de una IGFBP-7 producida de forma recombinante como se ha descrito aquí anteriormente.

45 Como el experto en la materia apreciará ahora, que la IGFBP-7 se ha identificado como un marcador que es útil en la evaluación de la IC, pueden utilizarse formas alternativas para llegar a un resultado comparable a los logros de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Dichas estrategias comprenden entre otras cosas el uso de péptidos sintéticos o recombinantes, que representen un epítipo clínicamente relevante de IGFBP-7 para la inmunización. Alternativamente, puede utilizarse la inmunización con DNA también conocida como vacuna de DNA.

50 Para la medición, la muestra líquida obtenida de un individuo se incuba con el agente de unión específico de IGFBP-7 bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo del agente de unión - IGFBP-7. Tales condiciones no necesitan especificarse, ya que el experto en la materia sin ningún esfuerzo inventivo puede identificar fácilmente tales condiciones de incubación apropiadas. La cantidad de complejo agente de unión - IGFBP-7 se mide y se utiliza

en la evaluación de la IC. Como el experto en la técnica apreciará que hay numerosos métodos para medir la cantidad del complejo agente de unión específico - IGFBP-7, todos ellos descritos en detalle en los libros de texto pertinentes (véase, por ejemplo, Tijssen P., supra, o Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (Eds.), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996)).

Preferiblemente, IGFBP-7 se detecta en un formato de ensayo tipo sándwich. En tal ensayo, un primer agente de unión específica se utiliza para capturar IGFBP-7 en un lado y un segundo agente de unión específica, que está marcado para ser detectado directa o indirectamente, se usa en el otro lado. Preferiblemente, se utiliza un anticuerpo contra IGFBP-7 en un inmunoensayo cualitativo (presencia o ausencia de IGFBP-7) o cuantitativo (se determina la cantidad de IGFBP-7).

Como se describe en detalle en la sección de Ejemplos, se han utilizado dos modelos de ratón para identificar polipéptidos que se encuentran en el tejido del corazón de animales de experimentación mediante métodos de proteómica avanzada. Sin embargo, estos modelos dieron lugar, al menos parcialmente, a datos contradictorios, y, por supuesto, los datos en tejido de los polipéptidos no son representativos de la presencia o ausencia de estos polipéptidos en la circulación. Un marcador que se haya encontrado que se expresa de forma diferencial en un modelo puede no expresarse diferencialmente en un segundo modelo, o incluso mostrar datos contradictorios en otro modelo adicional. Incluso si una proteína puede expresarse diferencialmente en el tejido, esta proteína en la mayoría de los casos no es de ninguna importancia diagnóstica si se mide a partir de un fluido corporal, porque puede no liberarse a la circulación, puede fragmentarse o modificarse, por ejemplo, tras su liberación desde una célula o tejido, puede no ser estable en la circulación, puede no ser medible en circulación, puede que no sea específico para una enfermedad determinada, etc.

Los inventores de la presente invención sorprendentemente son capaces de detectar la proteína IGFBP-7 en una muestra de fluido corporal. Aún más sorprendentemente son capaces de demostrar que la presencia de IGFBP-7 de tal muestra líquida obtenida de un individuo puede correlacionarse con la IC. No se requiere ninguna muestra de tejido y biopsia para hacer uso del marcador de IGFBP-7 en la evaluación de la IC. La medición del nivel de la proteína IGFBP-7 se considera muy ventajosa en el campo de la IC.

En una realización preferible del método según la presente invención, se practica con suero como material de muestra líquida. En una realización preferible adicional, el método de acuerdo con la presente invención se practica con plasma como material de muestra líquida. En una realización preferible adicional, el método de acuerdo con la presente invención se practica con sangre total como material de muestra líquida.

En una realización preferible adicional, la presente invención se refiere al uso de la proteína IGFBP-7 como una molécula marcadora en la evaluación *in vitro* de la insuficiencia cardíaca, en la que la detección de un aumento del nivel de IGFBP-7 a partir de una muestra obtenida de un individuo en comparación con una muestra control es indicativa de la insuficiencia cardíaca, y que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.

El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un único evento o proceso cause la enfermedad respectiva, tal como, por ejemplo, en las enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, el diagnóstico correcto puede ser muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se entiende completamente como es el caso de IC. Como el experto en la materia apreciará, ningún marcador bioquímico en el campo de la IC es diagnóstico con un 100% de especificidad y al mismo tiempo un 100% de sensibilidad para una cierta cuestión diagnóstica. Más bien, los marcadores bioquímicos se usan para evaluar con una determinada probabilidad o valor predictivo una cuestión diagnóstica subyacente. El experto en la materia está totalmente familiarizado con los métodos matemáticos/ estadísticos que habitualmente se utilizan para calcular el riesgo relativo o la probabilidad de la pregunta diagnóstica a evaluar. En la práctica clínica habitual, generalmente un médico considera conjuntamente los diversos síntomas clínicos y los marcadores biológicos para el diagnóstico, tratamiento y manejo de la enfermedad subyacente.

Preferiblemente, en una realización adicional preferida de la presente invención, el método para la evaluación de la IC se lleva a cabo mediante la medición de la concentración de IGFBP-7 y de uno o más marcadores adicionales, y mediante el uso de la concentración de IGFBP-7 y de uno o más marcadores adicionales en la evaluación de la IC.

En la evaluación de la IC, el marcador IGFBP-7 será de ayuda para el médico en uno o varios de los siguientes aspectos: para evaluar el riesgo de un individuo de sufrir la insuficiencia cardíaca o para evaluar un paciente con insuficiencia cardíaca, por ejemplo, con la intención de identificar el estadio de la insuficiencia cardíaca, para diferenciar entre insuficiencia cardíaca aguda y crónica, para juzgar el riesgo de progresión de la enfermedad, para proporcionar orientación en la selección de una terapia apropiada, para controlar la respuesta de un paciente a la terapia, y para vigilar el curso de la enfermedad, es decir, para el seguimiento de pacientes con IC.

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

En una realización preferible, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para evaluar si un individuo está en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca y que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración de la proteína marcadora IGFBP-7, opcionalmente medir en la muestra de la concentración de uno o más de otras proteínas marcadoras de insuficiencia cardíaca, y de evaluar dicho riesgo del individuo de desarrollar insuficiencia cardíaca mediante la comparación de la concentración de IGFBP-7, y opcionalmente, de la(s) concentración(es) determinada(s) para una o más proteínas marcadoras adicionales opcionales, con la concentración de esta proteína marcadora o estas proteínas marcadoras en sus valores de referencia, en el que un aumento del valor de IGFBP y, opcionalmente, de las otras proteínas marcadoras es indicativa de insuficiencia cardíaca, y que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.

Un cribaje en el sentido de la presente invención se refiere a la evaluación imparcial de los individuos con respecto a su riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Aunque esta selección puede, en teoría, realizarse en cualquier muestra, en la práctica clínica por lo general se le dará la opción de dicho examen a las personas que de alguna manera se encuentren en riesgo de desarrollo de insuficiencia cardíaca. Como se ha mencionado anteriormente, estos individuos pueden ser asintomáticos clínicamente, es decir, no tienen signos o síntomas de IC. En una realización preferible, el cribaje de IC se le ofrecerá a personas en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, por ejemplo, que puedan estar en la fases A o B según lo definido por las guías de práctica AHA/ACC.

Como se ha mencionado 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 su larga fase asintomática, la identificación de las personas en riesgo de desarrollar IC sería de suma importancia para intervenir, y si es posible, interrumpir el curso de la enfermedad. Sin una evaluación de riesgos muy temprana, parece imposible la prevención de la progresión de la enfermedad desde el estado asintomático hacia la fase sintomática de la IC.

El riesgo de insuficiencia cardíaca se evalúa mediante métodos matemáticos /estadísticos extensamente conocidos y entendidos por el experto en la materia. Preferiblemente, el riesgo de un individuo de sufrir insuficiencia cardíaca se expresa en términos relativos y se da en el denominado riesgo relativo (=RR). Con el fin de calcular tal RR de insuficiencia cardíaca, se compara el valor de IGFBP-7 de un individuo con los valores establecidos para IGFBP-7 en una población de referencia, preferiblemente de individuos sanos que no han desarrollado insuficiencia cardíaca. También es preferible que la evaluación de tales RR de insuficiencia cardíaca se base en un grupo de individuos que han desarrollado insuficiencia cardíaca durante el periodo de estudio, preferiblemente a lo largo de uno o también preferible de dos años, y un grupo de individuos que no desarrollaron insuficiencia cardíaca en el mismo período de estudio.

En otra realización preferible, la presente invención se refiere al uso del marcador IGFBP-7 en el cribaje de la insuficiencia cardíaca. Como el experto en la materia conocerá, el término "uso como marcador" implica que la concentración de una molécula marcadora se cuantifica mediante los medios apropiados y que el valor medido de dicho marcador se utiliza como indicador, es decir, marca la presencia o ausencia de una enfermedad o condición clínica. Los medios apropiados para la cuantificación son, por ejemplo, agentes de unión específicos como los anticuerpos.

Preferiblemente, la detección de la IC se llevará a cabo en individuos de los que se sospecha que están en riesgo de sufrir una insuficiencia cardíaca en el futuro. Los pacientes en riesgo de futura insuficiencia cardíaca en este sentido son pacientes con un diagnóstico de hipertensión, enfermedad aterosclerótica, diabetes, obesidad y síndrome metabólico. Preferiblemente, el riesgo de futura insuficiencia cardíaca se evalúa en individuos que sufren hipertensión, enfermedad aterosclerótica, diabetes, y / o síndrome metabólico.

También se prefiere el uso del marcador IGFBP-7 en la evaluación del riesgo de una futura insuficiencia cardíaca en un individuo en la etapa B de acuerdo con la guías de práctica de la ACC/ AHA, es decir, un individuo que exhibe cambios estructurales en el corazón pero que no muestra síntomas de insuficiencia cardíaca.

En una realización preferible adicional, la presente invención se refiere al uso de IGFBP-7 como un marcador de una combinación de marcadores de IC con el propósito de detectar la IC, tal como se define en las reivindicaciones.

En el caso del cribaje, un nivel elevado de IGFBP-7 es un indicador positivo de riesgo aumentado de un individuo de desarrollar una insuficiencia cardíaca.

Estadificación de los pacientes

En una realización preferible, la presente invención se refiere a un método *in vitro* que ayuda en la estadificación de los pacientes con insuficiencia cardíaca, y que comprende las etapas de a) medir en una muestra la concentración de la proteína marcadora IGFBP-7, de b) opcionalmente medir en la muestra de la concentración de una o más proteínas marcadoras adicionales de insuficiencia cardíaca, y establecer el estadio de la insuficiencia cardíaca mediante la comparación de la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente las concentraciones

determinadas en la etapa (b) con la concentración de esta proteína marcadora o estas proteínas marcadoras en sus valores de referencia, en el que un aumento del valor de IGFBP y, opcionalmente, de las otras proteínas marcadoras es indicativa de insuficiencia cardíaca, y que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total. Preferiblemente el nivel del marcador IGFBP-7 se utiliza como una ayuda en la clasificación de los individuos investigados en los grupos de individuos que son clínicamente "normales" (es decir, los individuos en la etapa A de acuerdo con la clasificación ACA/ACC), los pacientes asintomáticos que tienen enfermedad estructural cardíaca (estadio B de acuerdo con la clasificación ACA/ACC) y el grupo de pacientes que tienen insuficiencia cardíaca (es decir, los pacientes en la etapa C o etapa D de acuerdo con la clasificación ACA/ACC).

La diferenciación entre un episodio cardíaco agudo y enfermedad cardíaca crónica

También se describe un método *in vitro* para ayudar en el diagnóstico diferencial entre un evento cardíaco agudo y una enfermedad cardíaca crónica, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración de la proteína marcadora IGFBP-7, opcionalmente de medir en la muestra la concentración de una o más proteínas adicionales marcadoras de insuficiencia cardíaca, y el establecimiento de un diagnóstico diferencial entre un evento cardíaco agudo y una enfermedad cardíaca crónica mediante la comparación de la concentración determinada en la etapa (a), y opcionalmente las concentraciones determinadas en la etapa (b) con la concentración de esta proteína marcadora o estas proteínas marcadoras en sus valores de referencia, en el que un aumento del valor de IGFBP y, opcionalmente, de las otras proteínas marcadoras es indicativa de insuficiencia cardíaca, y que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.

El experto en la materia estará familiarizado con el significado de "episodio cardíaco agudo" y "enfermedad cardíaca crónica".

Preferiblemente, un "episodio cardíaco agudo" se refiere a una afección, enfermedad o disfunción aguda del corazón, en particular a la insuficiencia cardíaca aguda, por ejemplo, un infarto de miocardio (IM) o arritmia. Dependiendo de la extensión de un IM, puede ir seguido de DVI e ICC.

Preferiblemente, una "enfermedad cardíaca crónica" es un debilitamiento de la función del corazón, por ejemplo, debido a una isquemia del corazón, enfermedad de la arteria coronaria, o uno o varios infartos de miocardio anteriores particularmente leves (posiblemente seguido por DVI en progresión). También puede ser un debilitamiento debido a enfermedades inflamatorias, defectos de las válvulas del corazón (por ejemplo, defectos de la válvula mitral), miocardiopatía dilatativa, miocardiopatía hipertrófica, defectos del ritmo cardíaco (arritmias) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Por lo tanto, es evidente que una enfermedad cardíaca crónica también puede incluir pacientes que habían sufrido de un síndrome coronario agudo, por ejemplo, IM, pero que actualmente no sufren un evento cardíaco agudo.

Es importante diferenciar entre un evento cardíaco agudo y enfermedad cardíaca crónica, debido a que un evento cardíaco agudo y la enfermedad cardíaca crónica pueden requerir regímenes de tratamiento bastante diferentes. Por ejemplo, para un paciente que presenta un infarto agudo de miocardio, un tratamiento temprano con reperfusión puede ser de suma importancia. Por otro lado, un tratamiento de reperfusión realizado en un paciente con insuficiencia cardíaca crónica, en el mejor de los casos no causa o causa pocos daños en este paciente.

El marcador IGFBP-7 se utiliza en el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica.

Evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad

En una realización preferible, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad de un paciente de IC, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración de la proteína marcadora IGFBP-7, opcionalmente de medir en la muestra la concentración de una o más proteínas adicionales marcadoras de la insuficiencia cardíaca, y de establecer dicho riesgo del individuo de progresión de la enfermedad mediante la comparación de la concentración de IGFBP-7, y opcionalmente las concentraciones determinadas para las una o más proteínas marcadoras adicionales opcionales, con la concentración de esta proteína marcadora o estas proteínas marcadoras en sus valores de referencia, en el que un aumento del valor de IGFBP, y opcionalmente de las otras proteínas marcadoras, es indicativa de insuficiencia cardíaca, que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.

En la actualidad es muy difícil evaluar o predecir incluso con una probabilidad razonable si un paciente que se ha diagnosticado de IC está en un estado más o menos estable, o si la enfermedad progresará y por lo tanto es probable que como resultado el estado de salud del paciente empeore. La severidad y la progresión de la insuficiencia cardíaca generalmente se establecen clínicamente mediante la evaluación de los síntomas clínicos o por la identificación de cambios adversos mediante el uso de técnicas de la imagen como la ecocardiografía. En una realización, el empeoramiento de la insuficiencia cardíaca se establece mediante el control de la fracción de

eyección ventricular izquierda (FEVI). Un deterioro de la FEVI en un 5% o más se considera como progresión de la enfermedad.

5 En una realización preferible adicional, la presente invención por lo tanto se refiere al uso del marcador IGFBP-7 en la evaluación del riesgo de progresión de enfermedad en un paciente que sufre de IC. En la evaluación de la progresión de la enfermedad de los pacientes que sufren IC, un nivel elevado de IGFBP-7 es indicador de un mayor riesgo de progresión de la enfermedad.

10 Orientación en la selección de una terapia apropiada para la IC

10 En una realización preferible, la presente invención se refiere a un método *in vitro*, que ayuda en la selección de una terapia apropiada para la IC, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración de la proteína marcadora IGFBP-7, opcionalmente la medición en la muestra de la concentración de una o más proteínas adicionales marcadoras de insuficiencia cardíaca, y de la selección de una terapia apropiada mediante la comparación de la concentración de IGFBP-7, y opcionalmente, las concentraciones determinadas para una o más proteínas marcadoras opcionales con la concentración de esta proteína marcadora o estas proteínas marcadoras en sus valores de referencia, en el que un aumento del valor de IGFBP y, opcionalmente, de las otras proteínas marcadoras es indicativa de insuficiencia cardíaca, y que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.

20 Se espera que el marcador IGFBP-7 será de ayuda en la evaluación del médico para seleccionar el régimen de tratamiento más adecuado de entre los diversos regímenes de tratamiento disponibles en el área de la insuficiencia cardíaca. En una realización preferible adicional, por lo tanto se refiere al uso del marcador IGFBP-7 en la selección de un régimen de tratamiento para un paciente que sufre IC.

25 Monitorizar la respuesta de un paciente a la terapia

30 En una realización preferible, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para monitorizar la respuesta de un paciente a la terapia de IC, que comprende las etapas de a) medir en una muestra la concentración de la proteína marcadora IGFBP-7, de b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de una o más proteínas adicionales marcadoras de la insuficiencia cardíaca, y de monitorizar la respuesta de un paciente a la terapia de la IC mediante la comparación de la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente las concentraciones determinadas en la etapa (b) con la concentración de esta proteína marcadora o estas proteínas marcadoras en sus valores de referencia, en el que un aumento del valor de IGFBP y, opcionalmente, de las otras proteínas marcadoras es indicativa de insuficiencia cardíaca, y que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.

40 Alternativamente, el método anterior para monitorizar la respuesta del paciente a la terapia se puede poner en práctica al establecer el nivel pre y post-terapéutico del marcador IGFBP-7 y de los otros marcadores opcionales adicionales, y comparando los niveles de los marcadores antes y después de la terapia.

45 El diagnóstico de la insuficiencia cardíaca se establece clínicamente. De acuerdo con la presente invención, la IC se considera establecida clínicamente si el paciente cumple con los criterios de las fases C o D según la definición de las guías de práctica de la ACC/ AHA. De acuerdo con estas directrices, la etapa C se refiere a pacientes con cardiopatía estructural y con síntomas previos o actuales de insuficiencia cardíaca. Los pacientes en estadio D son aquellos pacientes con insuficiencia cardíaca refractaria que requieren intervenciones especializadas.

50 Como se ha indicado anteriormente, los valores medidos de NT-proBNP están altamente correlacionados con la gravedad de la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, tanto BNP como NT-proBNP parecen no ser ideales para el seguimiento de la respuesta del paciente a la terapia, véase por ejemplo, Beck-da-Silva, L., et al., Congest. Heart Fail. 11 (2005) 248-253, quiz 254-255.

55 El marcador IGFBP-7 parece ser apropiado para controlar la respuesta de un paciente a la terapia. La presente invención por lo tanto también se refiere al uso de IGFBP-7 en el seguimiento de la respuesta del paciente a la terapia. En esa área diagnóstica el marcador IGFBP-7 también se puede utilizar para establecer un valor basal previo a la terapia y para medir IGFBP-7 en uno o varios puntos temporales después de la terapia. En el seguimiento de los pacientes con IC, un nivel elevado de IGFBP-7 es un indicador positivo de un tratamiento eficaz de la IC.

60 Combinación de marcadores

60 Los marcadores bioquímicos pueden determinarse individualmente, o bien en una realización preferible de la invención, pueden medirse simultáneamente utilizando un chip o una tecnología de chip basada en cuentas. Las concentraciones de los biomarcadores se interpretan entonces de forma independiente mediante un valor umbral individual para cada marcador o se combinan para la interpretación, es decir, forman una combinación de marcadores.

65

Como el experto en la materia apreciará, el paso de correlacionar el nivel de un marcador con una cierta probabilidad o riesgo puede realizarse y lograrse de diferentes maneras.

5 Preferiblemente, los valores medidos para el marcador IGFBP-7 y uno o más marcadores adicionales se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión de diagnóstico subyacente. Los valores de los marcadores se pueden combinar con la medida de IGFBP-7 mediante cualquier método matemático adecuado actual.

10 Preferiblemente, el algoritmo matemático aplicado en la combinación de marcadores es una función logística. El resultado de aplicar tal algoritmo matemático o tal función logística preferiblemente es un solo valor. Dependiendo de la cuestión diagnóstica subyacente, dicho valor puede correlacionarse fácilmente, por ejemplo, con el riesgo de un individuo de sufrir insuficiencia cardíaca o cualquier otro propósito de diagnóstico que pueda ser de utilidad en la evaluación de los pacientes con IC. En una forma preferible, tal función logística se obtiene mediante a) la clasificación de los individuos en grupos, por ejemplo, en individuos normales, en situación de riesgo de insuficiencia cardíaca, pacientes con insuficiencia cardíaca aguda o crónica, etc., b) la identificación de marcadores que difieren significativamente entre estos grupos mediante un análisis univariado, c) el análisis de regresión logística para evaluar los valores discriminatorios independientes de los marcadores útiles en la evaluación de los diferentes grupos y d) la construcción de una función logística para combinar los valores discriminatorios independientes. En este tipo de análisis los marcadores ya no son independientes, sino que representan una combinación de marcadores.

20 En una realización preferible, la función logística que se utiliza para combinar los valores de IGFBP-7 y el valor de al menos otro marcador se obtiene mediante a) la clasificación de los individuos en grupos de individuos normales y en riesgo de insuficiencia cardíaca, respectivamente, b) el establecimiento de los valores de IGFBP-7 y el valor de al menos otro marcador, c) la realización de un análisis de regresión logística y d) la construcción de la función logística para combinar los valores del marcador IGFBP-7 y el valor de al menos un marcador adicional.

30 Una función logística para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad emplea preferentemente un algoritmo desarrollado y obtenido mediante métodos estadísticos. Los métodos estadísticos apropiados son por ejemplo el análisis discriminante (DA) (es decir, DA lineal, cuadrático, regularizado), métodos Kernel (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores al vecino más próximo k), PLS (cuadrados mínimos parciales), métodos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, método de bosques al azar, métodos de impulso/ empaquetado), modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística), métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica difusa, redes neurales y métodos basados en algoritmos genéticos. El experto no tendrá problemas en seleccionar un método estadístico apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención y por lo tanto para obtener un algoritmo matemático apropiado. Preferiblemente el método estadístico utilizado para obtener el algoritmo matemático utilizado en la evaluación de la insuficiencia cardíaca se selecciona de entre DA (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrático, regularizado), métodos Kernel (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores al vecino más próximo k), PLS (cuadrados mínimos parciales), métodos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, método de bosques al azar, métodos de impulso/ empaquetado), o modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística). Los detalles relacionados con estos métodos 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); and Duda, R.O., et al., *Pattern Classification*, John Wiley & Sons, Inc., 2ª Ed. (2001).

40 Es una forma de realización preferible de la invención la utilización de un punto de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo, individuos normales y en riesgo de insuficiencia cardíaca, pacientes de IC que responden a la terapia y que fracasan en la terapia, pacientes que tienen una insuficiencia cardíaca aguda y pacientes con IC que tienen insuficiencia cardíaca crónica, pacientes con IC que muestran progresión de la enfermedad y pacientes con IC no muestran progresión de la enfermedad, respectivamente.

50 El área bajo la curva operador receptor (=AUC) es un indicador del funcionamiento o exactitud de un procedimiento de diagnóstico. La exactitud de un método diagnóstico se describe mejor por sus características del receptor operacional (ROC) (ver especialmente Zweig, MH, y Campbell, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC es un gráfico de todos los pares sensibilidad/ especificidad resultantes de variar de forma continua el umbral de decisión en toda la gama de datos observados.

60 El funcionamiento clínico de una prueba de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica, o la capacidad para clasificar correctamente a los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad de la prueba de distinguir correctamente dos condiciones diferentes en los sujetos investigados. Tales

condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad, o progresión de la enfermedad frente a ninguna progresión de la enfermedad.

5 En cada caso, el gráfico ROC representa la superposición de las dos distribuciones al representar la sensibilidad frente a 1 - especificidad para la gama completa de umbrales de decisión. El eje y es la sensibilidad, o la fracción de verdaderos positivos (definida como (número de resultados de la prueba positivos verdaderos) / (número de resultados de la prueba verdaderos positivos + falsos negativos)). Esto también se denomina positividad de presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. El eje x es la fracción de falsos positivos, o 1 - especificidad (definida como (número de resultados falsos positivos) / (número de resultados de la prueba negativos verdaderos + falsos positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula enteramente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de positivos verdaderos y falsos positivos se calculan completamente por separado mediante el uso de los resultados de la prueba de dos subgrupos diferentes, el diagrama ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto de la gráfica ROC representa un par de sensibilidad / 1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. 10 Una prueba con discriminación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene una gráfica ROC que pasa a través de la esquina izquierda superior, donde la fracción verdadera positiva es 1,0 o 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). El argumento teórico para una prueba sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se ubican entre estos dos extremos (si la gráfica ROC cae completamente por debajo de la diagonal a 45°, es fácil remediarlo invirtiendo el criterio de "positividad" por "mayor que" a "menor que" o viceversa). Cualitativamente, cuanto más cerca está el gráfico de la esquina izquierda superior, mayor es la exactitud global de la prueba.

25 Un objetivo conveniente para cuantificar la exactitud diagnóstica de una prueba de laboratorio es la de expresar su funcionamiento con un solo número. La medida global más común es el área bajo el gráfico ROC (AUC). Por convención, esta área siempre es $\geq 0,5$ (si no lo es, se puede invertir la regla de decisión para que así sea). Los valores oscilan entre 1,0 (separación perfecta de los valores de prueba de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia de distribución aparente entre los valores de la prueba en los dos grupos). El área no depende sólo de una parte determinada del gráfico, como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad a un 90% de especificidad, sino de todo el gráfico. Esta es una expresión cuantitativa descriptiva de lo cercano que está el gráfico ROC de la perfección (área = 1,0).

35 La sensibilidad general del ensayo dependerá de la especificidad requerida para la práctica el método descrito aquí. En ciertas realizaciones preferibles, una especificidad del 75% puede ser suficiente para los métodos estadísticos y los algoritmos resultantes pueden basarse en este requisito de especificidad. En una realización preferible, el método utilizado para evaluar los individuos en riesgo de insuficiencia cardíaca se basa en una especificidad del 80%, del 85%, o también preferiblemente del 90% o del 95%.

40 Como se ha discutido anteriormente, el marcador IGFBP-7 ayuda en la evaluación del riesgo de los individuos de desarrollar una insuficiencia cardíaca, así como en la evaluación adicional por diagnóstico in vitro de un paciente que tiene insuficiencia cardíaca. Una realización preferible de acuerdo con esto es el uso de IGFBP-7 como una molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca, tal y como se define en las reivindicaciones.

45 El uso de una combinación de marcadores que comprende IGFBP-7 y uno o más marcadores adicionales de IC en la evaluación de pacientes con IC o en la evaluación de individuos en riesgo de IC representa una forma de realización preferible adicional de la presente invención. En tal combinación de marcadores, el marcador o marcadores adicionales se seleccionan preferiblemente de entre el grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca, y un marcador de inflamación.

50 El marcador o marcadores adicionales de IC preferibles seleccionados con los que puede combinarse la medición de IGFBP-7 preferiblemente son o se seleccionan de entre el grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación. Estos otros marcadores preferibles cuya medida preferiblemente se combinan con la medición de IGFBP-7 o que forman parte de la combinación de marcadores de IC que comprende IGFBP-7, respectivamente, se discuten con más detalle a continuación.

55 Marcador de péptido natriurético

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

Los marcadores polipeptídicos, ya sea en la familia del péptido natriurético atrial o en la familia del péptido natriurético cerebral se derivan de la preproformas de las correspondientes hormonas activas.

65 Los marcadores de péptido natriurético preferibles de acuerdo con la presente invención son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP y los fragmentos fisiológicos inmunológicamente detectables de los mismos. Como el experto en la

materia apreciará fácilmente, el fragmento inmunológicamente detectable tiene que comprender al menos un epítipo que permita la detección específica de tales fragmentos fisiológicos. Un fragmento es un fragmento fisiológico como se presenta de forma natural en la circulación de un individuo.

5 Los marcadores de ambas familias de péptidos natriuréticos representan fragmentos de las correspondientes pro-hormonas, es decir, proANP y proBNP, respectivamente. Como se aplican consideraciones similares para ambas familias, sólo la familia de marcadores BNP se describirá en detalle. La pro-hormona de la familia BNP, es decir, proBNP se compone de 108 aminoácidos. proBNP se escinde en los 32 aminoácidos en C-terminal (77-108), que representan la hormona BNP biológicamente activa, y los aminoácidos 1-76 en N-terminal, llamados proBNP N-terminal (o NT-proBNP). BNP, proBNP N-terminal (1-76), así como otros productos de descomposición (Hunt, PJ, et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995) 1175-1183) circulan en la sangre. Si la molécula precursora completa (proBNP 1-108) también se encuentra en el plasma no se ha podido aclarar completamente. Sin embargo, se ha descrito (Hunt, PJ, et al., Peptides 18 (1997) 1475-1481) que se puede detectar una baja liberación de proBNP (1 a 108) en plasma, pero que debido a una descomposición parcial muy rápida en el extremo N-terminal algunos aminoácidos están ausentes. Actualmente se acepta que en general, por ejemplo, para NT-proBNP la porción central de la molécula, que se encuentra 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 descripción detallada relativa a los métodos basados en la detección inmunológica de esta parte central de la molécula de NT-proBNP se encuentra en el documento WO 00/45176 y se dirige al lector a la misma para más detalles. Puede ser más ventajoso medir sólo una cierta subfracción de NT-proBNP para la que se ha propuesto el término NT-proBNP nativo. Una descripción detallada relacionada con esta subfracción de NT-proBNP se encuentra en los documentos WO 2004/099253 y WO 00/45176. El experto encontrará todas las instrucciones necesarias allí. Preferiblemente, el NT-proBNP medido es o se corresponde con el NT-proBNP medido por el ensayo Elecsys® NT-proBNP de Roche Diagnostics, Alemania.

25 Las preanalíticas son robustas con NT-proBNP, que permite un fácil transporte de la muestra a un laboratorio central (Mueller, T., et al., Clin. Chem. Lab. Med. 42 (2004) 942 a 944). Las muestras de sangre se pueden almacenar a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o transportadas sin pérdida de recuperación. Por el contrario, el almacenamiento del BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4° Celsius conduce a una pérdida de concentración de al menos un 20% (Mueller, T., et al, supra; Wu, AH, et al, Clin Chem. 50 (2004) 867-873).

35 La familia del péptido natriurético derivado del cerebro (especialmente BNP y NT-proBNP) se ha investigado a fondo para el cribaje de ciertas poblaciones de IC. Los hallazgos con estos marcadores, especialmente con NT-proBNP son bastante alentadores. Los valores elevados de NT-proBNP, incluso en "pacientes" asintomáticos son claramente indicativos de "problemas de corazón" (Gremmler, B., et al., Exp. Clin. Cardiol. 8 (2003) 91-94). Estos autores mostraron que un valor elevado de NT-proBNP indica la presencia de sufrimiento cardio-renal y debe impulsar la derivación para una investigación más extensa. De acuerdo con varios grupos de distintos investigadores, Gremmler, et al., también describieron que una concentración de NT-proBNP anormal es una prueba diagnóstica precisa, tanto para la exclusión de IC en la población como para descartar la disfunción ventricular izquierda (= DVI) en pacientes con falta de aliento. El papel de los valores negativos de NT-proBNP o BNP para descartar la IC o DVI ha sido corroborado por otros grupos de investigadores, véase por ejemplo, McDonagh, TA, et al., Eur. J. Heart Fail. 6 (2004) 269-273; y Gustafsson, F., et al., J. Card. Fail. 11, Supl. 5 (2005) S15-20.

45 BNP se produce predominantemente (aunque no exclusivamente) en el ventrículo y se libera tras el aumento de la tensión de la pared. Por lo tanto, un aumento de liberación del BNP refleja predominantemente disfunciones del ventrículo o disfunciones que se originan en las aurículas, pero que afectan al ventrículo, por ejemplo, a través de un flujo de entrada deteriorado o una sobrecarga de volumen de sangre. En contraste con BNP, ANP se produce y se libera predominantemente en la aurícula. El nivel de ANP puede, por tanto, reflejar principalmente la función auricular.

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

Por lo tanto, dependiendo del curso a lo largo del tiempo o las propiedades de interés, puede ser ventajosa la medición de la forma activa o la forma inactiva del péptido natriurético.

60 En la evaluación de un individuo en riesgo de insuficiencia cardíaca el valor medido de IGFBP-7 se combina preferentemente con el valor de NT-proANP y/ o NT-proBNP. Preferiblemente, el valor de NT-proBNP se combina con el valor de IGFBP-7. Consideraciones similares se aplican para la selección de una terapia apropiada, para juzgar el riesgo de progresión de la enfermedad y para el seguimiento de la evolución de la enfermedad.

65 En el caso de que se utilice la IGFBP-7 en la evaluación de la respuesta de un paciente a la terapia, su medición se combina preferiblemente con la medición de ANP o BNP.

En el caso de que se utilice la IGFBP-7 para diferenciar entre insuficiencia cardíaca aguda y crónica, la combinación de marcadores preferible comprende IGFBP-7, ANP o proANP y BNP o proBNP.

5 Marcador de troponina cardíaca

El término troponina cardíaca se refiere a las isoformas cardíacas de la troponina I y la troponina T. Como ya se ha indicado anteriormente el término marcador se refiere también a las variantes fisiológicas de una molécula marcadora, como los fragmentos o complejos fisiológicos. Para los marcadores de troponina cardíaca, es conocido que sus complejos fisiológicos son de importancia diagnóstica y se incluyen aquí expresamente.

La troponina T tiene un peso molecular de aproximadamente 37.000 Da. La isoforma de la troponina T que se encuentra en el tejido cardíaco (cTnT) es lo suficientemente divergente de la de músculo esquelético TnT para permitir la producción de anticuerpos que distinguen estas dos isoformas de TNT. La TnT se considera un marcador de daño agudo de miocardio, 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 la EP 0 394 819.

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

Las isoformas cardíacas únicas de la troponina I y T permiten distinguirlas inmunológicamente de las otras troponinas de músculo esquelético. Por lo tanto, la liberación en sangre de troponina I y T a partir de músculo cardíaco dañado puede relacionarse específicamente con daño del tejido cardíaco. Actualmente también es apreciado por los expertos en la materia que las troponinas cardíacas pueden detectarse en la circulación, ya sea en su forma libre o como una parte de un complejo (véase, por ejemplo, las patentes US 6.333.397, US 6.376.206 y US 6.174.686).

En la evaluación de un individuo en riesgo de sufrir insuficiencia cardíaca, así como en la evaluación de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, el valor medido de IGFBP-7 se combina preferentemente con el valor de la isoforma cardíaca de la troponina T y/ o troponina I. Una troponina cardíaca preferible para su utilización en combinación con el marcador IGFBP-7 es la troponina cardíaca T.

40 Marcador de inflamación

El experto en la materia está familiarizado con el término marcador de inflamación. Los marcadores de inflamación preferidos son la interleuquina-6, la proteína C-reactiva, amiloide A sérico y una proteína S100.

La interleuquina-6 (IL-6) es una proteína secretada de 21 kDa que tiene numerosas actividades biológicas que pueden dividirse en aquellas que participan en la hematopoyesis y en las que participan en la activación de la respuesta inmune innata. La IL-6 es un reactante de fase aguda y estimula la síntesis de una variedad de proteínas, incluyendo moléculas de adhesión. Su función principal es mediar en la producción en fase aguda de las proteínas hepáticas, y su síntesis es inducida por las citoquinas IL-1 y TNF- α . La IL-6 normalmente es producida por macrófagos y linfocitos T. La concentración normal en suero de IL-6 es <5 pg/ml.

La proteína C reactiva (PCR) es una proteínas de fase aguda homopentamérica de unión al Ca^{2+} con subunidades de 21 kDa que está involucrada en la defensa del huésped. La síntesis de CRP está inducida por la IL-6, e indirectamente por la IL-1, ya que la IL-1 puede desencadenar la síntesis de IL-6 por las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. La concentración normal en plasma de la PCR es <3 μ g / ml (30 nM) en el 90% de la población sana, y <10 μ g / ml (100 nM) en el 99% de los individuos sanos. Las concentraciones plasmáticas de PCR pueden, por ejemplo, medirse mediante amiloide A sérico (= SAA) es una proteína de fase aguda de bajo peso molecular de 11,7 kDa. Se sintetiza predominantemente por el hígado en respuesta a estimulación por IL-1, IL-6 o TNF- α y está implicada en la regulación de la respuesta inmune dependiente de células T. Tras eventos agudos la concentración de SAA aumenta hasta 1000 veces alcanzando un miligramo por mililitro. Se utiliza para monitorizar la inflamación en enfermedades como la fibrosis quística, reflejo del injerto renal, traumatismos o infecciones. En la artritis reumatoide se utiliza tiene en ciertos casos como sustituto de la PCR, pero, SAA no está todavía tan ampliamente aceptada.

Las proteínas S100 forman una familia de proteínas de unión al Ca^{2+} en constante aumento que hoy en día cuenta con más de 20 miembros. La estructura fisiológicamente relevante de las proteínas S100 es un homodímero pero algunas pueden formar también heterodímeros con otras, por ejemplo, S100A8 y S100A9. Las funciones

intracelulares van desde la regulación de la fosforilación de proteínas, de actividades enzimáticas, o de la dinámica del citoesqueleto a la implicación en la proliferación celular y la diferenciación. Como algunas proteínas S100 también son liberadas de las células, también se han descrito funciones extracelulares, por ejemplo, la supervivencia neuronal, la proliferación de astrocitos, la inducción de apoptosis y la regulación de los procesos inflamatorios. S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12 se han encontrado en la inflamación con S100A8 que responde a la inflamación crónica, mientras que S100A9, S100A8/A9 y S100A12 aumentan en la inflamación aguda. S100A8, S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se han relacionado con diferentes enfermedades con componentes inflamatorios, incluyendo algunos tipos de cáncer, el rechazo de aloinjerto renal, colitis y lo más importante a AR (Burmeister, G., y Gallacchi, G., *Inflammopharmacology* 3 (1995) 221-230; Foell, D., et al, *Rheumatology* 42 (2003) 1383/89). Los marcadores S100 más preferidos para la evaluación de un individuo en riesgo de IC o de un paciente que tiene IC por ejemplo, para su uso en una combinación de marcadores de acuerdo con la presente invención son S100A8, S100A9, heterodímero S100A8/A9 y S100A12.

La selectina sE (molécula-1 soluble de adhesión leucocitaria endotelial, ELAM-1) es una glicoproteína transmembrana de tipo I de 115 kDa, expresada sólo en las células endoteliales y sólo después de la activación por citoquinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α) o endotoxina. La selectina E de superficie celular es un mediador de la unión por rodadura de leucocitos al endotelio, un paso esencial en la extravasación de leucocitos en el sitio de la inflamación, por lo tanto juega un papel importante en la respuesta inflamatoria localizada. La selectina E soluble se encuentra en la sangre de individuos sanos, probablemente derivada de la escisión proteolítica de la molécula expresada en la superficie. Los niveles elevados de selectina sE en el suero han sido descritos en una variedad de condiciones patológicas (Gearing, A.J. y Hemingway, I., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 667 (1992) 324 a 331).

En una realización preferible, la presente invención se refiere al uso de IGFBP-7 como una molécula marcadora para IC en combinación con una o más moléculas marcadoras de IC en la evaluación de IC a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo como se define en las reivindicaciones.

Como se indicó anteriormente, en un método preferido según la presente invención, el valor medido para IGFBP-7 se combina con al menos el valor de al menos otro marcador seleccionado del grupo que consiste de un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca, y un marcador de la inflamación.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de la combinación de marcadores IGFBP-7 y NT-proBNP en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de la combinación de marcadores IGFBP-7 y la troponina T en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de la combinación de marcadores IGFBP-7 y la PCR en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere al uso de una combinación de marcadores que comprende los marcadores IGFBP-7, la troponina T, NT-proBNP y PCR.

En otra forma de realización preferida adicional, la presente invención se refiere al uso de un panel de marcadores en un método para evaluar la IC in vitro mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de IGFBP-7 y de uno o más marcadores diferentes de IC y el uso de las concentraciones determinadas en la evaluación de la IC.

Un panel de marcadores se mide preferiblemente mediante una técnica de array de proteínas. Un array es una colección de marcadores individuales direccionables. Tales marcadores pueden estar direccionados espacialmente, tales como los arrays contenidos en placas de microtitulación o impresas sobre superficies planas donde cada marcador está presente en distintas coordenadas X e Y. Alternativamente, los marcadores pueden ser direccionables en base a etiquetas, cuentas, nanopartículas, o propiedades físicas. Los microarrays se pueden preparar según los métodos conocidos por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, 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). El array tal como se utiliza aquí se refiere a cualquier ensayo inmunológico con múltiples marcadores direccionables. Los marcadores direccionables pueden ser antígenos y los elementos direccionables pueden ser autoanticuerpos. Un microarray es una forma miniaturizada de un array. Un antígeno como se usa aquí se refiere a cualquier molécula que puede unirse específicamente a un anticuerpo. El término autoanticuerpo está bien definido en la técnica.

La descripción describe un array de proteínas que comprende el marcador IGFBP-7 y opcionalmente uno o más marcadores diferentes de IC, un array de proteína que comprende los marcadores IGFBP-7 y NT-proBNP, un array de proteína que comprende los marcadores IGFBP-7 y troponina T, un array de proteína que comprende los marcadores IGFBP-7 y CRP, y un array de proteína que comprende los marcadores IGFBP-7, troponina T, NT-proBNP y CRP, así como un equipo que comprende los reactivos necesarios para medir específicamente IGFBP-7. También se describe un equipo que comprende los reactivos necesarios para medir específicamente IGFBP-7 y los

reactivos necesarios para medir el uno o más otros marcadores de la insuficiencia cardíaca que se usan juntos en una combinación de marcadores de IC.

5 Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del alcance de la invención.

Descripción de las figuras

10 Figura 1 análisis fenotípico de ratones R9c y de tipo salvaje. (A) Curvas de supervivencia para los ratones de tipo salvaje (n = 79) y ratones R9c (n = 44) generadas después de un período de 24 semanas. (B) Acortamiento cardíaco evaluado por ecocardiografía (=acortamiento fraccional). El deterioro funcional significativo en los animales transgénicos R9c comienza a las 8 semanas de edad.

15 Figura 2 parámetros ecocardiográficos y hemodinámicos en ratones tipo salvaje y BA. (A) Cambios en la presión máxima en mmHg a las 2, 4, y 8 semanas después de la cirugía. (B) Cambio en el % de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) a las 2, 4 y 8 semanas después de la cirugía. (Los círculos cerrados indican los datos de operación simulada ratones y los círculos abiertos indican los datos de ratones con unión aórtica (AB)).

20 Figura 3 datos Western Blot como se obtiene con el tejido cardíaco de R9c y ratones control, respectivamente. Una fuerte sobreexpresión de IGFBP-7 se observa en muestras de tejido derivados de animales experimentales (R9c) que padecen insuficiencia cardíaca en comparación con muestras de tejido procedentes de ratones sanos (= + / +). Los números por debajo de las bandas teñidas indican los niveles de expresión relativos determinados por el número de espectros de masa registrados.

25 Figura 4 IGFBP-7 medido en 10 muestras de IC y de control, respectivamente. Las densidades ópticas (DO) en el ensayo de IGFBP-7 para las muestras derivadas de pacientes con insuficiencia cardíaca están etiquetados (IC = rombos), y para los controles sanos (suero humano normal = SHN = cuadrados), respectivamente.

30 La Figura 5 valores IGFB-7 tal como se detecta en muestras de IC de rutina clínica y en un panel de control ampliado, respectivamente. Las concentraciones calculadas se dan para IGFBP-7 como se mide en muestras derivadas de pacientes con insuficiencia cardíaca marcada (IC) y en muestras de controles sanos (suero humano normal = SHN), respectivamente. El diagrama de caja-bigotes muestra los cuartiles inferior y superior (cajas), así como los valores más altos y más bajos (bigotes).

35 Ejemplo 1

Modelos de ratón de insuficiencia cardíaca

40 1.1 El modelo de ratón R9c

Se ha descrito que una miocardiopatía dilatada humana heredada resulta de la conversión de Arg9 a Cys en el gen fosfolamban humano (PLN) (PLN-R9c) (Schmitt, J.P., et al., Science 299 (2003) 1410-1,413). El inicio de la miocardiopatía dilatada en los pacientes afectados por lo general se inicia en la adolescencia, seguido por el deterioro progresivo de la función cardíaca que conduce a la crisis y la mortalidad. Un modelo de ratón transgénico de esta mutación mostró un fenotipo cardíaco similar al de los pacientes afectados y presentado con miocardiopatía dilatada, disminución de la contractilidad cardíaca, y muerte prematura (Schmitt et al., 2003, supra).

50 Se estableció una curva de supervivencia de los ratones transgénicos. Los ratones PLN-R9C tenían una supervivencia media de sólo ~ 20 semanas con menos de un 15% que persiste pasadas 24 semanas (Figura 1 A): Las primeras muertes registradas en la línea PLN-R9C se observan a las 12 semanas de edad, mientras que sólo un ratón control de tipo salvaje murió durante el período de 24 semanas. Se ha seleccionado ocho semanas como el punto de tiempo representativo de estadio de enfermedad "temprana" antes de la primera mortalidad registrada, mientras que se selecciona 16 semanas, como el punto medio entre 8 y 24 semanas (DCM clásico). Un análisis detallado de la patología en corazones aislados muestra evidencias de ampliación de ventrículo y aurícula incluso a las 8 semanas de edad en los ratones PLN-R9C. Las secciones transversales de músculo cardíaco aislado (obtenido a partir de ratones de tipo salvaje y PLN-R9C seguido por tinción con hematoxilina y eosina también muestra evidencias de la dilatación ventricular izquierda, o adelgazamiento de la pared ventricular, en los animales transgénicos a partir de las 8 semanas, con la continuación de la progresión de la dilatación con la edad.

60 Las mediciones cardíacas funcionales se realizan por ecocardiografía en los ratones machos de 8, 16 y 24 semanas de edad (resumidos en la Tabla 1). Las mediciones por ecocardiografía del espesor de la pared anterior y posterior muestra que los ratones R9C tienen dilatación significativa a las 8 semanas, que continúa deteriorándose durante toda la vida de los ratones. La contractilidad, según la evaluación de acortamiento cardíaco (Fig. 1 B), también se reduce ligeramente, pero significativamente a las 8 semanas, mientras que una disminución más pronunciada es

65

claramente evidente a las 16 semanas. Los ratones hembra analizados muestran resultados idénticos a los machos (datos no mostrados).

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

	WT	R9C	WT	R9C	WT	R9C
Edad	8 semanas	8 semanas	16 semanas	16 semanas	24 semanas	24 semanas
Género	M	M	M	M	M	M
FC (lpm)	560±6	567±5	569±5	552±15	565±9	502±15
PA (mm)	0,66±0,01	0,60±0,01*	0,70±0,01	0,58±0,01*	0,71±0,01	0,57±0,01*
PP (mm)	0,66±0,01	0,61±0,01*	0,70±0,01	0,59±0,01*	0,71±0,01	0,57±0,01*
DDFVI (mm)	3,82±0,05	4,01±0,03*	3,92±0,07	5,01±0,06*	3,99±0,05	5,48±0,08*
DSFVI (mm)	1,82±0,05	2,13±0,04*	1,84±0,06	3,36±0,09*	1,89±0,03	4,23±0,09*
AF (%)	52,7±0,9	47,6±1,2*	53,1±0,7	32,9±1,9*	52,9±0,5	22,6±2,1*
VACc (circ / s)	10,5±0,2	9,1±0,2*	10,5±0,1	7,0±0,5*	10,9±0,3	5,1±0,5 *
VPAc (cm / s)	102,4±2,4	110,1±3,7	97,8±2,6	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 la media ± EEM, Símbolos utilizados en la Tabla 1: FC = frecuencia cardíaca; PA, PP = Espesor de la pared anterior y posterior (ventrículo izquierdo); DSFVI, DDFVI= diámetro sistólico y diastólico final del ventrículo izquierdo, respectivamente; AF = acortamiento fraccionado = (DDFVI - DSFVI) / DDFVI x100%; TEC = Tiempo de eyección corregido por la frecuencia cardíaca; VACc = velocidad de acortamiento circunferencial corregido por FC= AF/ TEC; VPAc = velocidad de pico aórtico corregido por FC; onda E = onda diastólica transmitral de llenado rápido inicial; PSFVI, PDFVI = presión sistólica y diastólica final del ventrículo izquierdo; + dP / dtmax = primer derivado positivo máximo de la presión ventricular izquierda; -dP / dtmax = primer derivado negativo máximo de la presión ventricular izquierda; AVA = aceleración de velocidad aórtica (VPAc / tiempo de aceleración); *P <0,05 en comparación con WT,

1.2 Modelo de ratón de bandeo aórtico (BA)

En este modelo de ratón de sobrecarga de presión provocado por bandeo aórtico (BA) induce hipertrofia cardíaca.

Mediante intervención quirúrgica se realiza la sobrecarga de presión en ratones C57BL. La coartación de la aorta ascendente (conocido como bandeo aórtico) induce hipertrofia cardíaca y el crecimiento del músculo miocárdico, especialmente en el ventrículo izquierdo como una respuesta primaria a la coartación de la aorta. En las últimas etapas de este modelo de ratón el corazón se convierte en hipertrófico y finalmente dilatado. Este modelo está bien caracterizado y ha demostrado ser altamente reproducible con una baja tasa de mortalidad de 10 a 15% o menos basado en la experiencia. Después de la coartación este modelo animal permite evaluar el progreso del desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda e insuficiencia cardíaca en respuesta al estrés hemodinámico.

Brevemente los ratones C57BL se anestesian con Ketamina mezclada (90 mg / kg) y Rompun (10 mg / Kg) y la aorta se liga utilizando aguja de calibre 25. Los ratones con operación simulada se someten al mismo procedimiento quirúrgico, excepto que la ligadura no se aprieta frente a la aguja.

Puntos de tiempo experimentales

Para examinar la respuesta hipertrófica, los animales bandeados y los controles de operación simulada se sacrifican a una, dos, cuatro y ocho semanas después de la intervención. La función cardíaca y el desarrollo de la hipertrofia son evaluados por análisis ecocardiográfico y confirmado post mortem al examinar la histología. La Tabla 2 muestra una visión general de la función cardíaca evaluada en los diversos puntos temporales por ecocardiografía. Los detalles sobre los parámetros ecocardiográficos dados en la Tabla 2 son conocidos por el experto y pueden, por ejemplo, encontrarse 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 control	2 sem BA	4 sem control	4 sem BA	8 sem control	8 sem BA
Frecuencia cardíaca (lpm)	271,6 ± 31,2	286,3 ± 39,1	275,3 ± 25,8	276,5 ± 28,1	255,5 ± 23,9	310,8 ± 18,0
Volumen máximo (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

ES 2 548 009 T3

Parámetro	2 sem control	2 sem BA	4 sem control	4 sem BA	8 sem control	8 sem BA
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 (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 diastólico final (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 sistólica final (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 diastólica final (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 eyección (%)	58,7 ± 5,1	57,9 ± 4,5	60,0 ± 5,3	36,8 ± 1,9	51,5 ± 1,6	25,8 ± 2,0
Gasto cardíaco (uL / min)	5113,5 ± 819,2	5879,1 ± 714,0	6114,8 ± 897,0	4108,6 ± 310,3	5066,0 ± 653,3	3893,8 ± 466,1
Trabajo sistólico (mmHg * uL)	1339,6 ± 134,0	2196,3 ± 94,6	1577,8 ± 134,4	1477,8 ± 99,6	1451,8 ± 130,4	1179,2 ± 104,1
Elastancia arterial (Ea) (mmHg / 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 max (mmHg/seg)	5481,6 ± 491,1	6785,3 ± 434,2	6036,0 ± 352,9	5133,2 ± 621,4	5755,8 ± 652,9	6454,4 ± 712,0
dPdt min (mmHg/seg)	-5049,6 ± 426,9	-7427,5 ± 685,3	-4743,3 ± 287,7	-5484,75 ± 412,2	-4564,5 ± 525,8	-7625 ± 586,5
dVdt max (uL/seg)	883,0 ± 61,2	758,0 ± 29,8	856,5 ± 627,4	1152,8 ± 206,3	1188,0 ± 114,1	1041,2 ± 109,6
dVdt min (uL/seg)	-679,6 ± 71,4	-696,3 ± 30,6	-703,5 ± 52,2	-921,0 ± 158,0	-1000,5 ± 76,8	-938,4 ± 126,2
P @ dVdt max (mmHg)	9,0 ± 2,5	7,4 ± 2,6	4,6 ± 0,4	10,3 ± 3,4	6,2 ± 1,0	13,3 ± 4,5
P @ dPdt max (mmHg)	44,1 ± 2,1	46,3 ± 3,5	49,0 ± 2,6	47,1 ± 2,8	49,6 ± 5,6	52,8 ± 3,6
V @ dPdt max (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 @ dPdt min (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
máxima potencia (m Watts)	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 precargada (mWatts/-N5L ²)	74,8 ± 16,5	85,0 ± 12,9	55,5 ± 2,4	57,3 ± 67,4	53,6 ± 3,0	46,1 ± 11,5

Además de los parámetros funcionales se realiza histología por tinción de hematoxilina / eosina (HE) en tejido cardíaco de ratones BA y ratones de control a las 2, 4, y 8 semanas. La histología confirma los procesos necróticos esperados y de remodelación para los ratones BA, mientras que el tejido cardíaco en ratones con operación simulada no muestra cambios significativos. A las dos semanas después de la cirugía del ventrículo de un ratón ligado muestra hipertrofia ventricular izquierda significativa que después de cuatro semanas ha progresado y a las ocho semanas después de la cirugía se parece mucho a la fase final de miocardiopatía dilatada.

5

Ejemplo 2

10

Preparación de muestras y espectroscopia de masa

Homogeneización del corazón y aislamiento de orgánulos

Los corazones se aíslan, las aurículas se retiran, los ventrículos se pican cuidadosamente con una cuchilla de afeitar y se enjuagan largamente con PBS helado (tampón fosfato salino) para eliminar el exceso de sangre. El tejido se homogeneizó durante 30 s utilizando un homogeneizador de vidrio manual en 10 ml de tampón de lisis (sacarosa 250 mM, Tris = HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂ 1 mM, DDT 1 mM (ditiotreitól) y PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Todos los pasos posteriores se realizaron a 4 °C. El lisado se centrifuga en una centrifuga de sobremesa a 800 x g durante 15 min; el sobrenadante sirve como una fuente para las fracciones de citosol, mitocondrias y microsomal. Los botones que contienen los núcleos se diluyen en 8 ml de tampón de lisis y se estratificaron sobre 4 ml de tampón de sacarosa 0,9 M (sacarosa 0,9 M, Tris = HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂ 1 mM, DDT 1 mM y PMSF 1 mM) y se centrifugó a 1000 xg durante 20 min a 4 °C. El sedimento resultante se resuspendió en 8 ml de un tampón de sacarosa 2 M (sacarosa 2 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, 1 mM DTT, y PMSF 1 mM), en capas de 4 ml de tampón de sacarosa 2 M y se sedimentaron por ultracentrifugación a 150.000 xg durante 1 h (rotor Beckman SW40.1). Los núcleos se recuperan como un botón de sedimento. Las mitocondrias se aíslan del sobrenadante por recentrifugación a 7500 x g durante 20 min a 4 °C; el sedimento resultante se lavó dos veces en tampón de lisis. Los microsomas se sedimentaron por ultracentrifugación del citoplasma post-mitocondrial 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 mediante la incubación de las mitocondrias en un tampón de lisis hipotónica (HEPES 10 mM, pH 7,9, DTT 1 mM, PMSF 1 mM), durante 30 min en hielo. La suspensión se sometió a ultrasonidos brevemente y los restos se eliminaron por centrifugación a 13.000 x g durante 30 min. El sobrenadante sirve como la fracción "Mito 1". El sedimento insoluble resultante se resuspendió en tampón de extracción con detergente de membrana (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 0,4 M, glicerol 15%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 1,5% de Triton-X-100) y se agitó suavemente durante 30 min seguido por centrifugación a 13.000 x g durante 30 min; el sobrenadante sirvió como fracción "mito 2".

Las proteínas de membrana asociadas se extraen resuspendiendo los microsomas en tampón de extracción con detergente de membrana. La suspensión se incubó con agitación suave durante 1 h y los restos insolubles se eliminaron por centrifugación a 13.000 x g durante 30 min. El sobrenadante sirve como fracción "micro".

Digestión de extractos de orgánulos y análisis MudPIT

Una alícuota de aproximadamente 100 µg de proteína total (tal como se determina mediante el ensayo de Bradford) de cada fracción se precipita durante la noche con 5 volúmenes de acetona enfriada con hielo a aproximadamente 20 °C, seguido por centrifugación a 13.000 x g durante 15 min. El sedimento de proteína se solubiliza en un pequeño volumen de urea 8 M, mM Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, DTT 1 mM, durante 1 hora a 37 °C, seguido por carboxiamidometilación con yodoacetamida 5 mM durante 1 hora a 37 °C durante la noche. Las muestras se diluyeron a continuación con urea 4 M con un volumen igual de bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8,5, y se digirieron con una relación 1:150 veces de endoproteinasa Lys-C (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canadá) a 37 °C durante la noche. El día siguiente, las muestras se diluyen en urea 2 M con un volumen igual de bicarbonato de amonio 50 mM de pH 8,5, suplementado con CaCl₂ a una concentración final de 1 mM, y se incubó durante la noche con cuentas de tripsina Poroszyme (Applied Biosystems, Streetsville, Ontario, Canadá) a 30 °C con rotación. Las mezclas de péptidos resultantes se extraen en fase sólida con cartuchos SPEC-Plus PT C18 (Ansyl Diagnostics, Lake Forest, CA) según las instrucciones del fabricante y se almacena a -80 °C hasta su uso posterior. Un procedimiento MudPIT de múltiples ciclos totalmente automatizado de 12 pasos y 20 h se configura como se describe (Kislinger, T., et al., Mol. Cell. Proteom 2 (2003) 96-106). Brevemente, una bomba cuaternaria de HPLC se interconecta con un espectrómetro de masas de trampa de iones LCQ DECA XP (Thermo Finnigan, San Jose, CA). Una microcolumna capilar de sílice fusionada i.d. 100 µm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) se presiona a través de una punta fina usando un láser P-2000 (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 individuales se cargan manualmente en columnas separadas utilizando un recipiente a presión. Las condiciones de disolvente de cromatografía son exactamente como se describe en Kislinger, T., et al., Mol. Cell. Proteom. 2 (2003) 96-106.

Identificación de proteínas y validación

El algoritmo de búsqueda de base de datos SEQUEST se utiliza para buscar coincidencias con espectros de masas de péptidos en tándem con secuencias de péptidos en una base de datos con formato FASTA mínimamente redundante mantenida localmente con datos de secuencias de proteínas de ratón y humanas obtenidas de las bases de datos Swiss-Prot / TrEMBL e IPI. Para evaluar estadísticamente la proporción esperada de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas para controlar, y por lo tanto, reducir al mínimo las identificaciones de falsos positivos, todos los espectros se buscan contra secuencias de proteínas, tanto en las orientaciones de aminoácidos directas (Forward) como inversas (Reverse) (Kislinger, T., et al., Mol. Cell. Proteom. 2 (2003) 96-106). El algoritmo de filtrado STATQUEST se aplica entonces a todos los resultados de búsqueda putativos para obtener una medida de la fiabilidad estadística (puntuación de confianza) para cada identificación de candidatos (valor de corte del valor p ≤ 15, correspondiente a un 85% o mayor probabilidad de ser una coincidencia correcta). Las coincidencias de alta

confianza se analizan en una base de datos de tipo SQL casera utilizando un gui3n basado en Perl. La base de datos est3 dise1ada para dar cabida a los resultados de b3squeda de base de datos y la informaci3n espectral (cabeceras de escaneo) para m3ltiples p3ptidos que coinciden con una prote3na determinada, junto con informaci3n sobre el nombre de la muestra, el n3mero de experimento, paso MudPIT, fuente de org3nulo, secuencia de amino3cidos, masa molecular, punto isoel3ctrico, carga, y el nivel de confianza. S3lo aquellas prote3nas con un valor de confianza p predicho de 95% o m3s, y para el cual al menos dos espectros son detectados colectivamente, se conservan para su posterior an3lisis.

Ejemplo 3

Evaluaci3n estadística de los datos obtenidos en los sistemas modelo

3.1 M3todos estadísticos utilizados para generar los valores de p de la expresi3n diferencial para el modelo de rat3n R9C

Los datos brutos obtenidos con los m3todos como se describe en el Ejemplo 2 se compone de 6190 prote3nas cada una con recuentos espectrales, la suma de todos los espectros asociada con la prote3na, para cada uno de los 137 experimentos diferentes. Los datos en bruto, 6190 subconjuntos de prote3nas, se someten a la normalizaci3n global que primero separa los datos dentro de cada serie en el mismo n3mero de grupos, fijado en 100 para nuestro an3lisis, basado en sus recuentos espectrales. Se lleva a cabo a continuaci3n un LOESS (Cleveland, WS y Devlin, SJ, Journal of the American Statistical Association 83 (1988) 596-610), en cada grupo (1 a 100) ajustado para las diferencias en los recuentos espectrales a trav3s de un conjunto de genes con recuentos espectrales similares.

En base a nuestros datos en bruto se construyen dos modelos lineales, el primer modelo utiliza control / enfermedad, tiempo (8 semanas, 16 semanas, final) y la ubicaci3n (cito, macro, mito 1, mito 2) como factores y se describe utilizando:

$$\text{Contaje} = \beta_0 + \text{tiempo} \beta_1 + \text{tiempo}^2 \beta_2 + \text{localizaci3n} \beta_3 + \text{control} \beta_4$$

El segundo modelo utiliza s3lo el tiempo (8 semanas, 16 semanas, final) y la ubicaci3n (cito, micro, mito 1, mito 2) como factores y se describe utilizando:

$$\text{Contaje} = \beta_0 + \text{tiempo} \beta_1 + \text{tiempo}^2 \beta_2 + \text{localizaci3n} \beta_3$$

donde β_0 es el t3rmino de intersecci3n y β_1 , β_2 , β_3 y β_4 son las estimaciones de la pendiente para las variables tiempo, l tiempo al cuadrado, la localizaci3n y control / enfermedad.

Los dos modelos se compararon mediante Anova, siendo la hip3tesis nula que no hay diferencia entre los dos modelos. Un valor de p bajo, indica que no hay pruebas suficientes para decir que los dos modelos son los mismos. La informaci3n adicional indica el estado (es decir, control / enfermedad) parece ser un componente importante del modelo. Con el fin de extraer las prote3nas que tienen un cambio significativo en la abundancia relativa de prote3nas entre nuestros modelos de control y enfermedad y nuestra lista de 6190 prote3nas se clasifica en base a sus valores de p calculados. Esto genera un conjunto de 593 prote3nas con valores de p <0,05.

Con el fin de contar m3ltiples pruebas de hip3tesis a partir del modelo anterior, a continuaci3n los valores de p se corrigen utilizando la correcci3n de tasa de falso descubrimiento (FDR), espec3ficamente la correcci3n FDR de Benjamini-Hochberg (Benjamini, Y., y Hochberg, Y., Journal of the Royal Statistical Society B. 57 (1995) 289-300). Esto genera un conjunto de 40 prote3nas con valores p corregidos <0,05 para el modelo de rat3n R9C.

3.2 M3todos estadísticos utilizados para generar los valores de p de la expresi3n diferencial para el modelo de rat3n de bandeo a3rtico

A partir de 68 experimentos en el modelo de rat3n de bandeo a3rtico se identificaron 3152 prote3nas con recuentos espectrales. El mismo an3lisis de los datos se aplica a los conjuntos de datos para el modelo de bandeo a3rtico de rat3n como se ha descrito anteriormente para el modelo de rat3n R9C.

Ejemplo 4

Detecci3n del marcador IGFBP-7 mediante el ensayo Western Blot

Lisados brutos de tejido se obtienen de muestras de tejido card3aco de ratones R9C. En resumen, el tejido del coraz3n se pica, se muele en un homogeneizador Dounce y se somete a centrifugaci3n de 8000 g durante 30 min para eliminar los n3cleos y restos celulares. El sobrenadante se utiliza para la transferencia Western.

Se lleva a cabo un SDS-PAGE y transferencia de Western utilizando reactivos y equipos de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Para cada muestra de tejido analizado, 10 μ g de la fracci3n citos3lica se diluye en la reducci3n de

NuPAGE® (Invitrogen) tampón de muestra SDS y se calienta durante 10 min a 95 °C. Las muestras corren en geles NuPAGE® al 4-12% (Tris-glicina) en el sistema de transferencia MES. La mezcla de proteínas separada en gel se transfirió a membranas de nitrocelulosa utilizando el Módulo de Invitrogen XCell II™ Blot (Invitrogen) y el sistema tampón de transferencia NuPAGE®. Las membranas se lavaron 3 veces en PBS / 0,05% de Tween-20 y se bloquearon con tampón de bloqueo Roti®-Block (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) durante 2 h. El anticuerpo primario, policlonal de conejo contra Calreticulina (PA1-903, Affinity Bioreagents (ABR), Golden, CO) se diluye 1:500 en tampón de bloqueo Roti®-Block y se incubó con la membrana durante 1 h. Las membranas se lavan 6 veces en PBS / 0,05% de Tween-20. El anticuerpo primario unido específicamente IGFBP-7 se marca con un anticuerpo policlonal conjugado POD anti IgG de conejo, diluido a 10 mU / ml en 0,5 x Roti®-Block tampón de bloqueo. Después de la incubación durante 1 h, las membranas se lavan 6 veces en PBS / 0,05% de Tween-20. Para la detección del anticuerpo conjugado POD anti-conejo unido, la membrana se incubó con el sustrato de Western Blotting Lumi-LightPLUS (Nº de orden 2015196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se expuso a una película autorradiográfica.

Los resultados de un experimento típico se muestran en la Figura 3. Una fuerte sobreexpresión de IGFBP-7 se observó en las muestras de tejido derivadas de animales experimentales R9c que sufren de insuficiencia cardiaca en comparación con muestras de tejido derivadas de un ratón sano en los mismos puntos temporales.

Ejemplo 5

5.1. ELISA para la medición de IGFBP-7 en muestras de suero y plasma humanos

Para la detección de IGFBP-7 en suero o plasma humano, se desarrolló un ELISA en sándwich. Para la captura y detección del antígeno, se conjugaron alícuotas de un anticuerpo policlonal anti-IGFBP-7 de R&D Systems (número de catálogo: AF 1334) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

Se incuban placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-IGFBP-7 biotinilado durante 60 min a 1 µg / ml en solución 1x PBS. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + 0,02% Tween-20, se bloquearon con PBS + 1% de BSA (albúmina de suero bovino) y luego se lavaron de nuevo tres veces con 1x PBS + 0,02% Tween-20. Los pocillos se incubaron a continuación durante 1,5 h, ya sea con una dilución en serie del antígeno recombinante como estándar IGFBP-7 o con muestras de suero o plasma diluido (1:50) de los pacientes o individuos de control, respectivamente. Después de la unión de IGFBP-7, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + 0,02% Tween-20. Para la detección específica de IGFBP-7 unido, los pocillos se incuban con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-IGFBP-7 digoxigenilado durante 60 min a 1 µg / ml en 1X PBS + 1% de BSA. A partir de entonces, las placas se lavaron tres veces para eliminar el anticuerpo no unido. En una etapa posterior, los pocillos se incuban con conjugados anti-digoxigenina-POD 75 mU / ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Nº de Catálogo 1633716) durante 60 min en 1 x PBS + 1% de BSA: Las placas se lavaron posteriormente seis veces con el mismo tampón. Para la detección de complejos antígeno-anticuerpo, los pocillos se incuban con 100 µl de solución ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Nº de Catálogo 11685767) y la densidad óptica (DO) se mide después de 15 min a 405 y 492 nm con un lector ELISA.

5.2. Prueba del ELISA de IGFBP7 en muestras procedentes de pacientes con insuficiencia cardiaca y donantes aparentemente sanos, respectivamente.

Para la creación y optimización del ELISA de IGFBP-7 se analizaron 10 muestras de suero obtenidos de diferentes pacientes con insuficiencia cardíaca (muestras IC) y 10 sueros de donantes sanos normales (NHS). Después de realizar el procedimiento de ensayo como se describe en 5.1 se obtuvieron los siguientes resultados (ver Tabla 3) con estas muestras:

Tabla 3: Resultados del ELISA de IGFBP7 (muestras de desarrollo del ensayo)

Delta DO		Conc [ng / ml] *50									
IC 5078	0,351	0,108	5,4	Mediana Min Max PM	Delta DO Conc Conc. calculada	ng / mL	Conc. calculada				
5084	0,582	0,231	11,55								
5085	0,435	0,154	7,7								
5100	0,304	0,080	4								
5101	0,537	0,208	10,4								
5104	0,556	0,218	10,9								
5107	0,407	0,139	6,95								
5112	0,287	0,070	3,5								
5113	0,957	0,420	21								
5144	0,229	0,031	1,55								
NHS 34	0,372	0,120	6					Mediana Min Max PM	Delta DO Conc Conc. calculada	ng / mL	Conc. calculada
35	0,254	0,048	2,4								
36	0,254	0,048	2,4								
37	0,288	0,070	3,5								
38	0,258	0,051	2,55								
39	0,234	0,035	1,75								
40	0,263	0,055	2,75								
41	0,214	0,019	0,95								
42	0,204	0,011	0,55								
43	0,377	0,122	6,1								

5 Como es obvio a partir de la Figura 4, los niveles de IGFBP-7 son de promedio mucho mayores en los sueros obtenidos de pacientes con IC en comparación con los niveles encontrados en las muestras obtenidas de individuos control.

5.3. ELISA de IGFBP7 con sueros de los pacientes de IC, obtenidos fuera de la rutina clínica y donantes aparentemente sanos, respectivamente.

10 Con el fin de seguir evaluando la utilidad de los ensayos IGFBP-7 en condiciones clínicas de rutina se investigó un panel de sueros de pacientes con IC (n = 45) y 35 sueros de pacientes control aparentemente sanos. Como se mencionó anteriormente, los sueros se diluyen 1:50 en 1 x PBS + 1% de BSA. La Tabla 4 muestra el resultado para estos paneles extendidos:

15 Tabla 4: Resultados del ELISA de IGFBP7 (Panel ampliado con muestras de IC de la rutina clínica)

Sueros de Insuficiencia Cardíaca (Panel IC)				Controles normales			
n = 45		Conc [ng / ml]		n = 35		Conc [ng / ml]	
Muestra N°	Delta DO	medida	calculada (*50)	Muestra N°	Delta DO	medida	calculada (* 50)
4143	0,236	0,07	3,40	31	0,172	0,02	0,95
4144	0,236	0,07	3,35	32	0,334	0,13	6,65
4145	0,223	0,06	2,90	33	0,21	0,05	2,45
4146	0,244	0,07	3,65	44	0,257	0,08	4,10
4150	0,35	0,14	7,20	45	0,489	0,23	11,55
4151	0,347	0,14	7,10	46	0,224	0,06	2,95
4152	0,437	0,20	9,95	47	0,226	0,06	3,00
4153	0,235	0,07	3,35	48	0,183	0,03	1,40
4154	0,253	0,08	4,00	49	0,171	0,02	0,90
4155	0,271	0,09	4,60	50	0,29	0,11	5,25
4157	0,615	0,31	15,45	51	0,314	0,12	6,00
4158	0,419	0,19	9,40	52	0,301	0,11	5,60
4159	0,36	0,15	7,55	53	0,232	0,07	3,25
4161	0,232	0,07	3,25	54	0,235	0,07	3,35
4162	0,345	0,14	7,05	55	0,222	0,06	2,90
4163	0,27	0,09	4,55	56	0,43	0,14	7,00
4164	0,402	0,18	8,85	57	0,214	0,05	2,60
4170	0,833	0,44	22,20	58	0,27	0,08	3,95
4171	0,625	0,32	15,75	59	0,389	0,15	7,65
4172	0,56	0,28	13,75	60	0,214	0,04	2,05
4173	0,396	0,17	8,70	61	0,252	0,07	3,35
4174	0,52	0,25	12,55	62	0,183	0,02	0,90

4175	0,251	0,08	3,90	63	0,204	0,03	1,70
4176	0,352	0,13	6,55	64	0,208	0,04	1,85
4178	0,224	0,05	2,40	65	0,228	0,05	2,55
4181	0,491	0,21	10,70	66	0,337	0,12	6,05
4182	0,352	0,13	6,55	67	0,239	0,06	2,95
4187	0,766	0,38	18,80	68	0,235	0,06	2,80
4189	0,578	0,27	13,25	69	0,163	0,01	0,55
4190	0,28	0,09	4,30	70	0,224	0,05	2,40
4191	0,297	0,10	4,85	71	0,214	0,04	2,05
4192	0,317	0,11	5,45	72	0,265	0,08	3,80
4193	0,476	0,21	10,25	73	0,231	0,05	2,65
4194	0,428	0,18	8,85	74	0,25	0,07	3,30
4196	0,236	0,06	2,80	75	0,281	0,09	4,35
4198	0,333	0,12	5,95	Min	0,163	0,01	0,55
4199	0,342	0,13	6,25	Max	0,489	0,23	11,55
4200	0,298	0,10	4,90	PM	0,252	0,07	3,57
4202	0,556	0,25	12,60	Mediana	0,232	0,06	2,95
4203	0,895	0,45	22,65				
4204	0,52	0,23	11,60				
4205	0,463	0,20	9,85				
4206	0,333	0,12	5,95				
4212	0,267	0,08	3,85				
4,213	0,754	0,37	18,45				
Min	0,223	0,05	2,40				
Max	0,895	0,45	22,65				
PM	0,405	0,17	8,43				
Mediana	0,350	0,14	7,05				

Los datos resumidos en la Tabla 4 se han utilizado para calcular los gráficos de caja que se muestran en la Figura 5. La Figura 5 demuestra que hay una gran diferencia en los valores medios de IGFBP-7 medidos en sueros derivados de pacientes con insuficiencia cardíaca en comparación con los valores de IGFBP-7 medidos en sueros derivados de los individuos de control aparentemente sanos.

Ejemplo 6

Combinaciones de marcadores que comprenden el marcador IGFBP-7 en la evaluación de la insuficiencia cardíaca

Ejemplo 6.1 La combinación de marcadores NT-proBNP e IGFBP-7

La combinación de marcadores NT-proBNP e IGFBP-7 se evaluó para la diferenciación de los pacientes en la etapa B y las etapas C más D, respectivamente. La precisión diagnóstica se evaluó mediante el análisis de muestras líquidas individuales obtenidas de grupos bien caracterizados de individuos, es decir, de 50 individuos en la etapa b de acuerdo con los criterios de la ACC/ACA para la clasificación de la IC y de 50 pacientes que sufren de IC y que están en la etapa C de acuerdo con los criterios de la ACA/ACC para la clasificación de la IC. El NT-proBNP se mide mediante un ensayo disponible a nivel comercial (Roche Diagnostics, NT-proBNP-assay (Nº Cat. 03 121 640 160 para sistemas analizadores de inmunoensayo Elecsys®) e IGFBP-7 se mide como se ha descrito anteriormente, se cuantifican en una muestra de suero obtenida de cada uno de estos individuos. El análisis ROC se realiza de acuerdo con Zweig, MH, y Campbell, G., supra. El poder discriminatorio para diferenciar los pacientes en la etapa C de individuos en la etapa B con la combinación de IGFBP-7 con el marcador establecido NT-proBNP se calcula mediante un análisis discriminante regularizado (Friedman, JH, Regularized Discriminant Analysis, Journal of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175).

Ejemplo 6.2 La combinación de marcadores troponina T e IGFBP-7

La combinación de marcadores troponina T e IGFBP-7 se evaluó para la diferenciación de pacientes que sufren de un evento cardíaco agudo de pacientes que sufren enfermedad cardíaca crónica, respectivamente. La precisión diagnóstica se evaluó mediante el análisis de muestras líquidas individuales obtenidas a partir de grupos bien caracterizados de individuos, es decir, de 50 individuos diagnosticados de un evento cardíaco agudo y de 50 personas con diagnóstico de enfermedad cardíaca crónica. La troponina T se mide mediante un ensayo disponible de nivel comercial (Roche Diagnostics, troponin T-assay (Nº Cat. 201 76 44 para sistemas analizadores de inmunoensayo Elecsys®) e IGFBP-7 medido como se ha descrito anteriormente, se cuantifican en una muestra de suero obtenida de cada uno de estos individuos. El análisis ROC se realizó de acuerdo con Zweig, MH, y Campbell, G., supra. El poder discriminatorio para diferenciar los pacientes en la etapa C de los individuos en la etapa B para la

combinación de IGFBP-7 con el marcador establecido NT-proBNP es calculado por el análisis discriminante regularizado (Friedman, JH, J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175).

Ejemplo 6.3 La combinación de marcadores NT-proBNP y PCR

5 La combinación de marcadores proteína C reactiva e IGFBP-7 se evalúa para la diferenciación de pacientes con diagnóstico de miocardiopatía frente a controles que no padecen ninguna enfermedad cardíaca que se pueda confundir, respectivamente. La precisión diagnóstica se evaluó mediante el análisis de muestras líquidas individuales obtenidas a partir de grupos bien caracterizados de 50 individuos con miocardiopatía y 50 individuos control sanos. 10 La CRP se midió mediante un ensayo disponible a nivel comercial (Roche Diagnostics, CRP-assay (Tina-quant C-reactive protein (látex) high sensitive assay – N° Cat. Roche N° 11972855 216) e IGFBP-7 se midió como se ha descrito anteriormente, y se cuantificaron en una muestra de suero obtenido a partir de cada uno de estos individuos. El análisis ROC se realizó de acuerdo con Zweig, MH, y Campbell, G., supra. El poder discriminatorio para diferenciar los pacientes en la etapa C de los individuos en la etapa B para la combinación de IGFBP-7 con el 15 marcador establecido NT-proBNP se calculó mediante análisis discriminante regularizado (Friedman, JH, J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175).

20 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle con el propósito de clarificar y mejorar la comprensión, un experto en la técnica apreciará a partir de una lectura de la descripción que se pueden hacer varios cambios en la forma y los detalles sin apartarse del verdadero alcance de la invención descrito en las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Roche Diagnostics GmbH
 University of Toronto
 F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Uso de IGFBP-7 en la evaluación de la insuficiencia cardíaca
 <130> 24093 WO
 <150> EP07001582.1
 30 <151> 2007-01 -25
 <160> 1
 <170> Versión PatentIn 3.2
 <210> 1
 <211> 282
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Glu Arg Pro Ser Leu Arg Ala Leu Leu Leu Gly Ala Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Thr Cys
 20 25 30

Gly Pro Cys Glu Pro Ala Ser Cys Pro Pro Leu Pro Pro Leu Gly Cys
 35 40 45

Leu Leu Gly Glu Thr Arg Asp Ala Cys Gly Cys Cys Pro Met Cys Ala
 50 55 60

Arg Gly Glu Gly Glu Pro Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gly Arg Gly Tyr
 65 70 75 80

Cys Ala Pro Gly Met Glu Cys Val Lys Ser Arg Lys Arg Arg Lys Gly
 85 90 95

Lys Ala Gly Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Val Ser Gly Val Cys Val
 100 105 110

Cys Lys Ser Arg Tyr Pro Val Cys Gly Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Pro
 115 120 125

Ser Gly Cys Gln Leu Arg Ala Ala Ser Gln Arg Ala Glu Ser Arg Gly
 130 135 140

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

Ser Ile Val Thr Pro Pro Lys Asp Ile Trp Asn Val Thr Gly Ala Gln
 165 170 175

Val Tyr Leu Ser Cys Glu Val Ile Gly Ile Pro Thr Pro Val Leu Ile
 180 185 190

Trp Asn Lys Val Lys Arg Gly His Tyr Gly Val Gln Arg Thr Glu Leu
 195 200 205

Leu Pro Gly Asp Arg Asp Asn Leu Ala Ile Gln Thr Arg Gly Gly Pro
 210 215 220

Glu Lys His Glu Val Thr Gly Trp Val Leu Val Ser Pro Leu Ser Lys
 225 230 235 240

Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Glu Cys His Ala Ser Asn Ser Gln Gly Gln
 245 250 255

Ala Ser Ala Ser Ala Lys Ile Thr Val Val Asp Ala Leu His Glu Ile
 260 265 270

Pro Val Lys Lys Gly Glu Gly Ala Glu Leu
 275 280

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para evaluar la insuficiencia cardíaca en un individuo que comprende las etapas de
- 5 a) medir en una muestra obtenida del individuo la concentración de la proteína marcadora proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP-7), y
- b) evaluar la insuficiencia cardíaca mediante la comparación de la concentración determinada en la etapa (a) con la concentración de esta proteína marcadora, establecida en una muestra control, en el que un
- 10 aumento del valor de IGFBP-7 es indicativa de insuficiencia cardíaca,
- que además se caracteriza porque dicha muestra se selecciona entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.
- 15 2. El método *in vitro* según la reivindicación 1, que comprende además la medición de una o más proteínas marcadoras de insuficiencia cardíaca adicionales, seleccionadas del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de la troponina cardíaca y un marcador de inflamación.
- 20 3. El método *in vitro* según la reivindicación 2, que se caracteriza además porque dicha una o más proteínas marcadoras adicionales es NT-proBNP.
4. El método *in vitro* según la reivindicación 2, que se caracteriza además porque dicha una o más proteínas marcadoras adicionales es la troponina T.
- 25 5. La utilización de la proteína IGFBP-7 como una molécula marcadora en la evaluación *in vitro* de la insuficiencia cardíaca, en la que la detección de un aumento del nivel de IGFBP-7 en una muestra obtenida de un individuo en comparación con una muestra de control es indicativa de insuficiencia cardíaca, y que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.
- 30 6. La utilización de una combinación de marcadores que comprende la proteína IGFBP-7 y una o más proteínas marcadoras de la insuficiencia cardíaca adicionales en la evaluación *in vitro* de la insuficiencia cardíaca, en la que la que la detección de un aumento del nivel de IGFBP-7 en una muestra obtenida a partir de una individuo en comparación con una muestra de control es indicativo de insuficiencia cardíaca, que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona entre el grupo que consiste en suero, plasma y sangre total.
- 35 7. La utilización de la combinación de marcadores de acuerdo con la reivindicación 6, en la que una o más de las proteínas marcadoras adicionales se seleccionan entre el grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de la troponina cardíaca y un marcador de inflamación.
- 40 8. La utilización de una combinación de marcadores de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende al menos IGFBP-7 y NT-proBNP.

Fig.1A

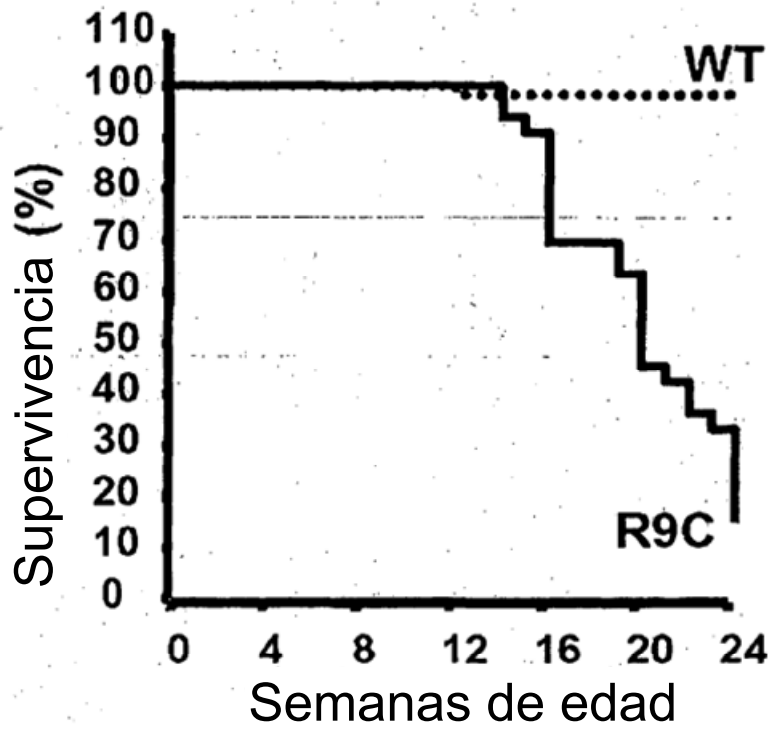
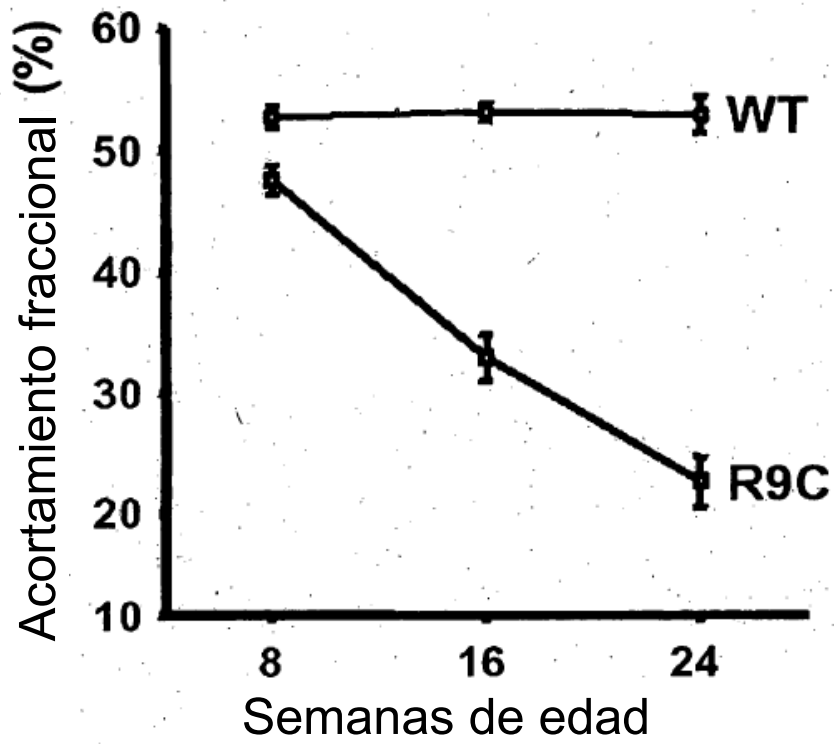


Fig.1B



Función cardiaca en ratones BA y controles

Fig.2

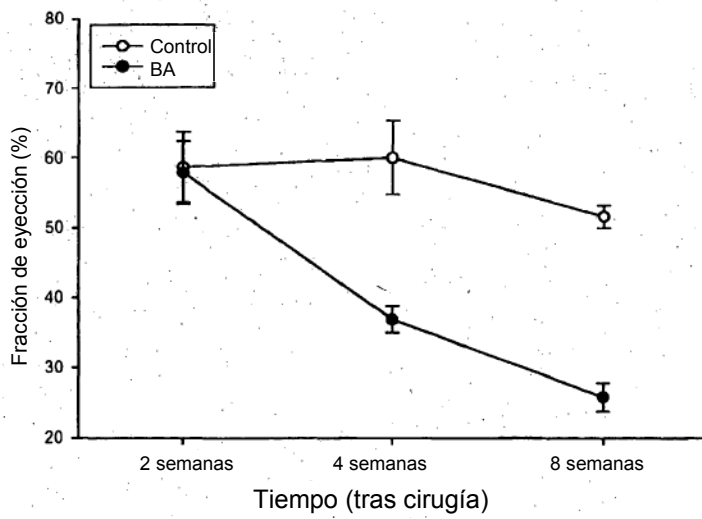
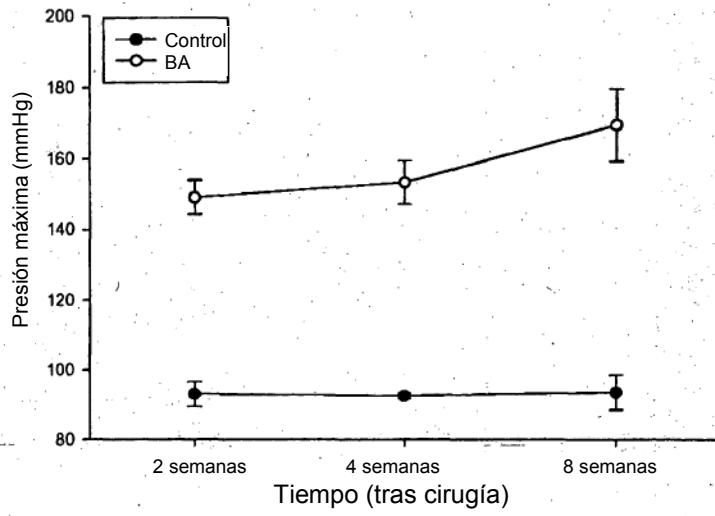


Fig.3

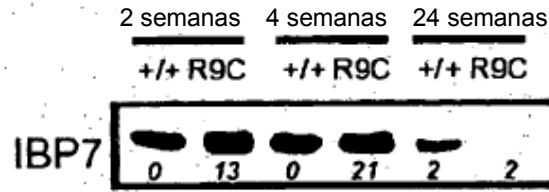


Fig.4

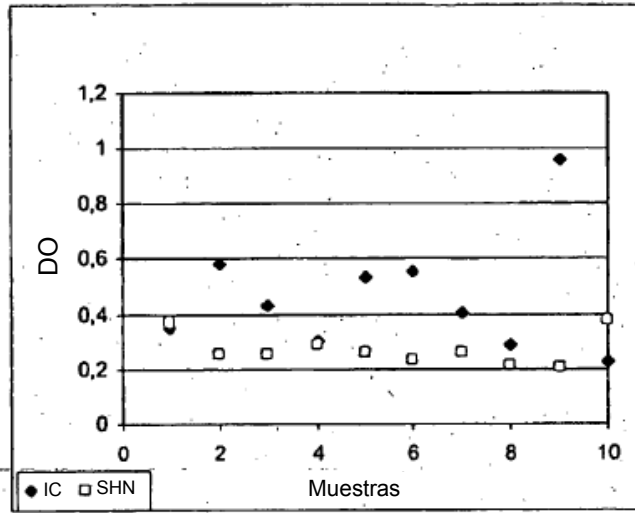


Fig.5

