

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 440**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010 E 10778586 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2491400**

54 Título: **Biomarcador para el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de insuficiencia cardiaca aguda y usos del mismo**

30 Prioridad:

21.10.2009 EP 09173601

21.10.2009 US 253658 P

23.10.2009 US 254537 P

17.03.2010 EP 10156705

17.03.2010 US 314789 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2016

73 Titular/es:

MYCARTIS N.V. (100.0%)

Technologiepark 4

9052 Gent, BE

72 Inventor/es:

KAS, KOEN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 558 440 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

Biomarcador para el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de insuficiencia cardiaca aguda y usos del mismo

Campo de la invención

5 La invención se refiere a biomarcadores basados en proteínas y/o péptidos y a agentes que se unen específicamente a los mismos, para usar en la predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de enfermedades o afecciones en sujetos. Más en particular, la solicitud describe determinadas proteínas y/o péptidos como nuevos biomarcadores para la insuficiencia cardiaca aguda; métodos para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la insuficiencia cardiaca aguda basados en la medición de dichas proteínas y/o péptidos biomarcadores; y kits y dispositivos para medir dichas proteínas y/o péptidos y/o para llevar a cabo dichos métodos.

10 Antecedentes de la invención

En muchas enfermedades y afecciones, un resultado favorable de tratamientos profilácticos y/o terapéuticos está fuertemente correlacionado con la predicción, diagnóstico y/o pronóstico tempranos y/o precisos de la enfermedad o afección. Por lo tanto, existe una necesidad continua de formas adicionales y preferiblemente mejoradas para la predicción, diagnóstico y/o pronóstico tempranos y/o precisos de enfermedades y afecciones para guiar las elecciones de tratamiento.

15 La insuficiencia cardiaca es un problema de salud pública principal en los países desarrollados y es la causa de considerable morbilidad y mortalidad entre los adultos mayores. Normalmente es una enfermedad crónica caracterizada por la frecuente descompensación recurrente que lleva al empeoramiento de problemas respiratorios. Además, 5 años después del diagnóstico 50% de los pacientes de insuficiencia cardiaca habrán muerto por la enfermedad.

20 La insuficiencia cardiaca aguda (ICA) es una incapacidad repentina del corazón para bombear de forma eficaz y donde ya no puede prever las demandas corporales de oxígeno. La ICA es la causa de alrededor de 2 millones de hospitalizaciones anualmente en EE.UU. y Europa, y presenta una tasa de mortalidad de aproximadamente 20-40% en el espacio de un año del alta del hospital en muchas poblaciones. Aproximadamente 90% de los ingresos de ICA son típicamente de pacientes con insuficiencia cardiaca crónica, el resto aproximadamente 10% son pacientes nuevos. Las señales clínicas de la enfermedad cardiaca y la ICA a menudo no son específicas lo que puede hacer exigente el diagnóstico inequívoco.

25 Un síntoma común de la ICA es la dificultad para respirar (disnea). Sin embargo, normalmente solo una fracción de las personas que presentan disnea tras el ingreso en el médico o en clínica, padecen ICA. Por lo tanto, un tratamiento rápido, adecuado y eficaz de la ICA requiere distinguir adecuadamente los pacientes con ICA de pacientes que tienen disnea debido a otras causas.

30 Actualmente, el diagnóstico de la ICA se hace principalmente basándose en signos clínicos, tales como ECG, radiografía de tórax, etc. Un biomarcador usado con frecuencia para complementar estos criterios de diagnóstico de ICA tal como en situaciones de urgencias, es el péptido natriurético tipo B (BNP). Típicamente, el BNP menor que 100 pg/ml se considera como un criterio para “descartar” la insuficiencia cardiaca, mientras que el BNP mayor que 400 pg/ml se ve como un criterio de “inclusión” para la ICA. Aunque el BNP es sensible, su especificidad es relativamente baja, y es especialmente problemático debido a la “zona gris” entre 100-400 pg/ml. Por ejemplo, Chung et al. 2006 (*Am Heart J* 152(5): 949-55) han determinado que el punto de corte de BNP de 100 pg/ml tiene 100% de sensibilidad, pero solo 41% de especificidad para diagnosticar la ICA, mientras que el punto de corte de 400 pg/ml tiene 87% de sensibilidad y 76% de especificidad. Clerico et al (*Clinical Chemistry* (2007) 53(5) pág. 813-822) compara la precisión del diagnóstico de los inmunoensayos del BNP y de la parte N-terminal del propéptido de BNP en la insuficiencia cardiaca crónica y aguda, y concluye que tanto los ensayos de BNP como de NT-proBNP tienen un grado alto de precisión del diagnóstico y de importancia clínica tanto para la insuficiencia cardiaca aguda como la crónica.

35 40 45 50 Los niveles de BNP también varían con la edad, sexo, peso y otras afecciones médicas, haciendo de esta forma confuso el diagnóstico. Es notable que los niveles de BNP tienden a ser elevados en pacientes con antecedentes médicos de insuficiencia cardiaca e insuficiencia renal. Por ejemplo, Chung et al. 2006 (véase antes) han mostrado que el rendimiento del BNP para el diagnóstico de la ICA en pacientes que presentan disnea, es significativamente reducido en pacientes con antecedentes de insuficiencia cardiaca. En particular, aproximadamente 40% de los pacientes que presentan disnea no causada por la ICA, que tenían antecedentes de insuficiencia cardiaca, presentaron valores de BNP por encima de 400 pg/ml, el punto de corte de ICA usado actualmente en clínica. Por consiguiente, las directrices de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) de 2008 también caracterizan el BNP como un biomarcador de la insuficiencia cardiaca en general más que de la insuficiencia cardiaca aguda.

55 El documento WO 2008/131039 describe un método para evaluar el estado de la enfermedad cardiovascular usando una variedad de biomarcadores, incluyendo el BNP, mientras que el documento US 6.812.339 describe una serie de secuencias y polimorfismos de un solo nucleótido, incluyendo MCAM (SEQ ID NO: 11206).

En vista de esto existe una necesidad constante de biomarcadores adicionales y preferiblemente específicos para la ICA. Dichos nuevos marcadores de ICA pueden ser comparables o mejores frente a los marcadores previamente existentes, tal como frente al BNP, en una o más de sus características, tales como, por ejemplo, en su sensibilidad y/o especificidad, en su fiabilidad en pacientes que presentan un síntoma que indica potencialmente ICA tal con disnea, en su fiabilidad en pacientes con antecedentes de insuficiencia cardiaca y otras comorbilidades frecuentes de la insuficiencia cardiaca tales como la insuficiencia renal, obesidad, enfermedad arterial coronaria, etc.

Además, subyacen varias causas en la insuficiencia cardiaca (aguda). Específicamente, la disfunción sistólica y disfunción diastólica conducen al remodelado cardiaco y función cardiaca alterada, produciendo una disminución del gasto cardiaco. Ambas disfunciones se caracterizan por defectos en la función de bombeo del corazón. La disfunción sistólica se produce por una pérdida de inotropía intrínseca (contractilidad), lo más probablemente debido a alteraciones en los mecanismos de transducción de señales responsables de regular la inotropía, y se caracteriza por defectos en el vaciado del corazón, en particular del ventrículo, de sangre durante la contracción (es decir, la sístole). La disfunción diastólica se produce cuando el ventrículo se hace menos adaptable (es decir, "más rígido"), lo que dificulta el llenado ventricular y como tal se caracteriza por defectos en el llenado del corazón, en particular el ventrículo, con sangre durante la relajación (es decir, la diástole).

Como tal, la fisiopatología de la disfunción sistólica y diastólica difiere, puesto que los mecanismos compensatorios intrínsecos que manejan ambas disfunciones difieren. Aunque la disfunción sistólica y diastólica comparten síntomas comunes, la naturaleza del tratamiento difiere al menos parcialmente. Aunque tanto los beta bloqueantes como los inhibidores de ACE están indicados para el tratamiento tanto de la disfunción sistólica como de la diastólica, posiblemente en combinación con diuréticos, los fármacos inotrópicos, por ejemplo, tales como la digoxina están específicamente indicados para el tratamiento de la disfunción sistólica (y contraindicados para el tratamiento de la disfunción diastólica) y, por ejemplo, los bloqueadores de canales de calcio están específicamente indicados para el tratamiento de la disfunción diastólica (y contraindicados para el tratamiento de la disfunción sistólica).

Puede estar claro que para el tratamiento adecuado es necesario el diagnóstico, predicción, pronóstico y/o seguimiento precisos y fiables de la disfunción sistólica y/o diastólica, así como la diferenciación entre ambas disfunciones. La presente invención se dirige a las necesidades anteriores en la técnica identificando biomarcadores para la ICA y más preferiblemente la disfunción sistólica, y parámetros asociados con los mismos, y proporcionando usos de los mismos.

Resumen de la invención

Habiendo llevado a cabo experimentos y ensayos extensos, los autores de la invención han puesto de manifiesto que la molécula de adhesión celular del melanoma (MCAM, también conocida como CD146 o MUC18), representa un nuevo biomarcador particularmente ventajoso para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la insuficiencia cardiaca aguda (ICA).

En particular, en un estudio de 3 centros que implica la recogida de muestras prospectiva de sujetos que presentan disnea tras ingreso en urgencias, los autores de la invención han identificado primero y posteriormente han validado la MCAM como un biomarcador que presenta un nivel significativamente alterado en pacientes disneicos que tienen ICA, cuando se comparan con pacientes disneicos que no tienen ICA. Además, los autores de la invención también se han dado cuenta de que la MCAM puede ser un biomarcador útil para el seguimiento del progreso de la ICA y/o se puede usar para predecir un suceso agudo, puesto que la cantidad de MCAM difería significativamente entre pacientes disneicos con ICA tras el ingreso (es decir, antes del tratamiento) y tras el alta (es decir, después de tratamiento).

Los datos actuales indican que el rendimiento del marcador MCAM es al menos equivalentes con el del BNP.

Además, para diferenciar entre pacientes disneicos con y sin ICA, el valor de la AUC (área bajo la curva de ROC; "ROC" significa características operativas del receptor) es ligeramente mayor para la MCAM (0,91) que para cada uno del BNP (0,88) y NT-proBNP (0,85). El valor de AUC es una medida combinada de sensibilidad y especificidad y un valor más alto de AUC (es decir, que se aproxima a 1) en general indica un rendimiento mejorado del ensayo.

Además, como se ha mencionado antes, el marcador BNP de diagnóstico tiene una "zona gris" problemática entre los valores de 100-400 pg/ml, en la que no se puede establecer un diagnóstico exacto de ICA. El uso del nivel del marcador de MCAM en dichas muestras de la "zona gris" del BNP dio como resultado una clara distinción entre los pacientes disneicos con ICA y sin ICA.

Este rendimiento diagnóstico general de la MCAM es, dependiendo del conjunto de datos usado, mejor o al menos equivalente al BNP y NT-proBNP, el patrón referencial actual de biomarcadores para el diagnóstico de la ICA en una población con disnea aguda. En un solo punto de corte de concentración o proporción, la MCAM alcanza una precisión de diagnóstico de 84%, mientras que el BNP en su punto de corte de descarte (100 pg/ml) tiene solo una precisión de 71%.

Considerado en conjunto, los autores de la invención han identificado y validado la MCAM (CD146 o MUC-18) como un biomarcador adicional y mejorado para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA, en particular en pacientes

con antecedentes de insuficiencia cardiaca, o que padecen de otros trastornos que no son ICA, que producen disnea.

5 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la insuficiencia cardiaca aguda (ICA) en un sujeto, caracterizado porque la fase de examen del método comprende medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto. Se entiende que los métodos de predicción, diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades o afecciones en general comprenden una fase de examen en la que se recogen los datos de y/o sobre el sujeto.

Por lo tanto, se proporciona un método para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA en un sujeto que puede comprender las etapas de:

- 10 (i) medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto;
- (ii) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia una predicción, diagnóstico y/o pronóstico conocido de ICA;
- (iii) encontrar una desviación o ausencia de desviación de la cantidad de MCAM medida en (i) respecto al valor de referencia;
- 15 (iv) atribuir dicha desviación o ausencia de desviación encontrada a una predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA en el sujeto.

La MCAM proporciona una diferenciación mejorada o incluso sustancialmente completa de fenotipos de ICA de disneicos sin ICA. Por lo tanto, los autores de la invención contemplan que la MCAM también puede ser beneficiosa para establecer cribados de poblaciones para seleccionar sujetos que tienen o tienen riesgo de tener ICA. El uso de BNP para dicho cribado de población es complicado en especial por el efecto de confusión de los antecedentes cardiacos (p. ej., patología de ICC) en la lectura del BNP, por lo tanto el BNP falla en el cribado debido a la falta de especificidad. Por lo tanto, en una realización, los métodos presentes de predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA en un sujeto se pueden usar para el cribado de poblaciones (tal como, p. ej., el cribado en una población general o en una población estratificada basada en uno o más criterios, p. ej., edad, género, ascendencia, ocupación, presencia o ausencia de factores de riesgo de ICA, etc.).

Como se demuestra en la sección experimental, los autores de la invención han mostrado que la predicción o diagnóstico de ICA o un mal pronóstico de ICA se pueden asociar en particular con un nivel elevado de MCAM. Por lo tanto, en una realización de los métodos de predicción, diagnóstico y/o pronóstico como se enseñan en la presente memoria, una cantidad elevada de MCAM en la muestra del sujeto comparada con un valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de ausencia ICA o representa un buen pronóstico para la ICA respectivamente, indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener ICA o indica un mal pronóstico para la ICA en el sujeto.

Además, los autores de la invención han hecho ensayos con pacientes a los que se diagnosticó insuficiencia cardiaca aguda tanto en el ingreso en el servicio de urgencias (SU) como en el alta del hospital, es decir, cuando se consideró que los pacientes se habían recuperado y estaban estables. La mayoría de los pacientes mostraron una disminución significativa de la MCAM tras el alta, comparados con los niveles en la etapa de ingreso. Se obtiene un cuadro similar cuando se comparan los niveles de BNP en el ingreso frente al alta. Estos datos apoyan la idea de que los niveles de MCAM son un reflejo del estado de la enfermedad y por lo tanto se podrían usar para el seguimiento y/o predicción de un suceso agudo. Los autores de la invención también han observado y verificado que los métodos que usan MCAM como un biomarcador, y en particular, pero sin la limitación, los métodos para diferenciar entre pacientes disneicos con y sin ICA, pueden lograr una sensibilidad de 80% o más y/o una especificidad de 80% o más. Por lo tanto, en una realización de los métodos de predicción, diagnóstico y/o pronóstico como se enseñan en la presente memoria, la sensibilidad y/o especificidad (y preferiblemente, la sensibilidad y especificidad) de los métodos es al menos 50%, al menos 60%, al menos 70% o al menos 80%, p. ej., $\geq 81\%$, $\geq 82\%$, $\geq 83\%$, $\geq 84\%$, $\geq 85\%$, $\geq 86\%$, $\geq 87\%$, $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ (el símbolo " \geq " es sinónimo de las expresiones "al menos" o "igual o más"), p. ej., entre 80% y 100%, o entre 81% y 95%, o entre 83% y 90%, o entre 84% y 89%, o entre 85% y 88%.

En otra realización de los métodos de predicción, diagnóstico y/o pronóstico como se enseñan en la presente memoria, el sujeto puede presentar uno o más síntomas y/o signos potencialmente indicativos de ICA. Por ejemplo, en una realización, el sujeto puede presentar disnea. Por lo tanto, en una realización, los métodos pueden ser para diferenciar entre sujetos que presentan disnea debido a la ICA y sujetos que presentan disnea debido a causas distintas o no relacionadas con ICA (tales como, p. ej., debido a la EPOC o neumonía).

En una realización adicional de los métodos de predicción, diagnóstico y/o pronóstico como se enseñan en la presente memoria, el sujeto puede presentar uno o más factores de riesgo para la ICA, tales como, por ejemplo, una predisposición genética o uno o más factores de riesgo de desarrollo, medioambientales o conductuales, tales como p. ej., resistencia a la insulina (glucosa en sangre alterada), obesidad troncal, niveles altos en el suero de colesterol lipoproteínas de baja densidad (LDL), niveles bajos en el suero de colesterol lipoproteínas de alta densidad (HDL),

niveles altos de triglicéridos en el suero y presión arterial alta (hipertensión), infarto de miocardio previo, y/o una o más comorbilidades tales como diabetes, enfermedad arterial coronaria, asma, EPOC y/o enfermedad renal crónica.

5 Por lo tanto, en diferentes realizaciones, los métodos presentes para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA se pueden usar en individuos a los que todavía no se les ha diagnosticado que tengan ICA (por ejemplo, cribado preventivo), o a los que se ha diagnosticado que tienen ICA o ICC, o que se sospecha que tienen ICA o ICC (por ejemplo, presentan uno o más síntomas característicos de la ICA o ICC), o que tienen riesgo de desarrollar ICA o ICC (por ejemplo, predisposición genética; presencia de uno o más factores de riesgo de desarrollo, medioambientales o conductuales). Los métodos también se pueden usar para detectar diferentes etapas del progreso o gravedad de la ICA. Los métodos también se pueden usar para detectar la respuesta de la ICA a los tratamientos profilácticos o terapéuticos y otras intervenciones. Los métodos se pueden usar además para ayudar al médico a decidir sobre el empeoramiento, estado existente, recuperación parcial o recuperación completa del paciente del suceso agudo (ICA), que da lugar al tratamiento adicional o a la observación o al alta del paciente del SU. Los métodos de la presente invención permiten al médico seguir el progreso de la enfermedad midiendo el nivel de MCAM en una muestra del paciente, en donde una disminución del nivel de MCAM comparado con un nivel de MCAM previo (p. ej., en el momento del ingreso en el SU) indica que la afección del sujeto está mejorando o ha mejorado, mientras que un aumento del nivel de MCAM comparado con el nivel de MCAM medido tras el ingreso en el SU indica que la afección del sujeto ha empeorado o está empeorando y posiblemente podría dar como resultado un nuevo suceso de insuficiencia cardiaca aguda. La invención proporciona además un método para el seguimiento de un cambio en la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de la ICA en un sujeto, que comprende:

20 (i) aplicar el método de predicción, diagnóstico y/o pronóstico como se ha enseñado antes en la presente memoria al sujeto en uno o más tiempos de medición sucesivos, de modo que se determina la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de la ICA en el sujeto en dichos tiempos de medición sucesivos;

(ii) comparar la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA en el sujeto en dichos tiempos de medición sucesivos determinados en (i); y

25 (iii) encontrar la presencia o ausencia de un cambio entre la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA en el sujeto en dichos tiempos de medición sucesivos determinados en (i).

Este aspecto permite el seguimiento de la afección del sujeto a lo largo del tiempo. Esto puede permitir, entre otros, predecir la aparición de un suceso de ICA, o el seguimiento en dicho sujeto del progreso de la enfermedad, agravamiento de la enfermedad o alivio, reaparición de la enfermedad, respuesta al tratamiento, respuesta a otros factores externos e internos, afecciones o factores estresantes, etc. Ventajosamente, el cambio en la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de la ICA en el sujeto se puede seguir en el transcurso de un tratamiento médico de dicho sujeto, preferiblemente un tratamiento médico dirigido a tratar la ICA. Dicha vigilancia puede estar comprendida, por ejemplo, en tomar la decisión de si a un paciente (p. ej., un paciente disneico o con ICA) se le puede dar el alta o necesita más hospitalización.

35 Típicamente, esto se hace midiendo el nivel de MCAM en un sujeto en diferentes tiempos de medición durante la estancia en el SU, en donde una disminución del nivel de MCAM en función del tiempo indica que la afección del sujeto está mejorando o ha mejorado, mientras que un aumento del nivel de MCAM en función del tiempo indica que la afección del sujeto ha empeorado o está empeorando y posiblemente podría dar como resultado un nuevo suceso de insuficiencia cardiaca.

40 Hay que indicar que en los presentes métodos de predicción, diagnóstico y/o pronóstico, la medición de la MCAM también se puede combinar con la evaluación de uno o más biomarcadores relevantes para la ICA.

Por consiguiente, también se describen en la presente memoria métodos en donde la fase de examen de los métodos comprende además medir la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros marcadores útiles para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA en la muestra del sujeto. En relación con esto, se podría usar cualquier marcador de ICA adecuado conocido o todavía desconocido. En una realización preferida, dicho marcador adicional de ICA se selecciona del grupo que consiste en: péptido natriurético tipo B (BNP), propéptido natriurético tipo B (proBNP), fragmento N-terminal del propéptido natriurético tipo B (NTproBNP), y fragmentos de uno cualquiera de los mismos.

50 Por consiguiente, se describe un método para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA en un sujeto, que comprende las etapas de:

(i) medir la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores en una muestra del sujeto;

(ii) usar las mediciones de (i) para establecer un perfil del sujeto de la cantidad MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores;

55 (iii) comparar dicho perfil del sujeto de (ii) con un perfil de referencia de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores, representando dicho perfil de referencia una

predicción, diagnóstico y/o pronóstico conocido de ICA;

(iv) encontrar una desviación o ausencia de desviación del perfil del sujeto de (ii) respecto al perfil de referencia;

(v) atribuir dicha desviación o ausencia de desviación encontrada a una predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA en el sujeto.

- 5 En una realización, dicho otro marcador útil para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA se elige del grupo que consiste en el péptido natriurético tipo B (BNP), propéptido natriurético tipo B (proBNP), fragmento N-terminal del propéptido natriurético tipo B (NTproBNP), y fragmentos de uno cualquiera de los mismos.

10 En realizaciones preferidas de los métodos de la presente invención, la detección de la proteína MCAM se hace en una muestra de plasma (es decir, una fracción de muestra de sangre que no contiene células sanguíneas), lo que implica que se detecta la proteína MCAM circulante, independientemente de si esta forma circulante corresponde o no a la forma soluble procesada por MMP o a un producto de degradación de la forma de longitud completa o de dicha forma soluble de MCAM. En una realización preferida, la proteína MCAM detectada no está unida a membrana o a célula, independientemente de cómo se logra la liberación de la MCAM en el plasma o suero in vivo.

15 Como se ha indicado antes, los presentes métodos pueden usar valores de referencia para la cantidad de MCAM que se pueden establecer de acuerdo con procedimientos conocidos previamente usados para otros biomarcadores. Dichos valores de referencia se pueden establecer dentro (es decir, constituyendo una etapa de) o externamente a (es decir, no constituyendo una etapa de) los métodos de la presente invención como se definen en la presente memoria. Por consiguiente, cualquiera de los métodos enseñados en la presente memoria puede comprender una etapa de establecer un valor de referencia para la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia (a)

20 una predicción o diagnóstico de ausencia de ICA o un buen pronóstico para la ICA, o (b) una predicción o diagnóstico de ICA o un mal pronóstico para la ICA.

Un aspecto adicional proporciona un método para establecer un valor de referencia para la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia:

(a) una predicción o diagnóstico de ausencia de ICA o un buen pronóstico para la ICA, o

25 (b) una predicción o diagnóstico de ICA o un mal pronóstico para la ICA,

que comprende:

(i) medir la cantidad de MCAM en:

(i a) una o más muestras de uno o más sujetos que no tienen ICA o que no están en riesgo de tener ICA o que tienen un buen pronóstico para la ICA, o

30 (i b) una o más muestras de uno o más sujetos que tienen ICA o que están en riesgo de tener ICA o que tienen un pronóstico malo para la ICA, y

(ii) almacenar la cantidad de MCAM

(ii a) como medición en (i a) como el valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de ausencia de ICA o que representa el pronóstico bueno para la ICA, o

35 (ii b) como medición en (i b) como el valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de ICA o que representa el pronóstico malo para la ICA.

Los métodos presentes pueden de otro modo usar perfiles de referencia para la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores útiles para predecir, diagnosticar y/o pronosticar ICA, que se pueden establecer de acuerdo con procedimientos conocidos previamente usados para otros biomarcadores.

40 Dichos perfiles de referencia se pueden establecer dentro (es decir, constituyendo una etapa de) o externamente a (es decir, no constituyendo una etapa de) los presentes métodos. Por consiguiente, los métodos enseñados en la presente memoria pueden comprender una etapa de establecer un valor de referencia para la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores, representando dicho perfil de referencia (a) una predicción o diagnóstico de ausencia de ICA o un buen pronóstico para la ICA, o (b) una

45 predicción o diagnóstico de ICA o un mal pronóstico para la ICA.

Un aspecto adicional proporciona un método para establecer un perfil de referencia para la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores útiles para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA, representando dicho perfil de referencia:

(a) una predicción o diagnóstico de ausencia de ICA o un buen pronóstico para la ICA, o

50 (b) una predicción o diagnóstico de ICA o un mal pronóstico para la ICA,

que comprende:

(i) medir la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores en:

5 (i a) una o más muestras de uno o más sujetos que no tienen ICA o no están en riesgo de tener ICA o que tienen un buen pronóstico para la ICA; o

(i b) una o más muestras de uno o más sujetos que tienen ICA o están en riesgo de tener ICA o tienen mal pronóstico para la ICA;

(ii)

10 (ii a) usar las mediciones de (i a) para crear un perfil de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores; o

(ii b) usar las mediciones de (i b) para crear un perfil de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores;

(iii)

15 (iii a) almacenar el perfil de (ii a) como el perfil de referencia que representa la predicción o diagnóstico de ausencia de ICA o que representa el pronóstico bueno para la ICA; o

(iii b) almacenar el perfil de (ii b) como el perfil de referencia que representa la predicción o diagnóstico de ICA o que representa el pronóstico malo para la ICA.

20 En una realización, dicho otro biomarcador útil para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA se puede elegir del grupo que consiste en el péptido natriurético tipo B (BNP), propéptido natriurético tipo B (proBNP), fragmento amino terminal del propéptido natriurético tipo B (NTproBNP), y fragmentos de cualquiera de los mismos.

La invención proporciona además un método para establecer un valor base o de referencia de MCAM en un sujeto, que comprende:

(i) medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto en diferentes tiempos de medición, en donde el sujeto no padece ICA, y

25 (ii) calcular el intervalo o valor medio del sujeto, que es el valor base o de referencia de MCAM para dicho sujeto.

30 En realizaciones preferidas de los métodos de la presente invención, la detección de la proteína MCAM se hace en una muestra de plasma, lo que implica que se detecta la proteína MCAM circulante, independientemente de si esta forma circulante corresponde o no a la forma soluble o a un producto de degradación de la forma de longitud completa o soluble. En una realización preferida, la proteína MCAM detectada en los métodos de acuerdo con la presente invención no está unida a membrana o a célula, sino que es la forma de MCAM circulante plasmática.

35 En realizaciones preferidas de uno cualquiera de los métodos anteriores, el sujeto puede ser humano. En realizaciones preferidas adicionales, el sujeto padece ICA que implica disfunción sistólica. En realizaciones incluso más preferidas, dicha disfunción sistólica se caracteriza por una disminución de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI), preferiblemente en donde dicha FEVI es menor que 55% o menor que 50% o menor que 45%, y/o por aumento de la presión de llenado cardíaco.

40 Los autores de la invención han encontrado además que los niveles de MCAM se correlacionan con la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI). Se ha mostrado que los sujetos con una FEVI reducida tienen niveles de MCAM alterados (en especial aumentados), comparado con sujetos con la FEVI normal. Puesto que la FEVI reducida es una característica de la disfunción sistólica, los niveles de MCAM se pueden usar para la predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la disfunción sistólica.

45 En particular, en un estudio de 3 centros que implica la recogida de muestras prospectiva de sujetos que presentan disnea tras ingreso en urgencias, la MCAM estaba significativamente aumentada en pacientes disneicos (en especial en pacientes con ICA) que mostraban FEVI reducida indicativa de disfunción sistólica, comparado con pacientes disneicos con FEVI y función sistólica conservada. La función sistólica puede indicar preferiblemente disfunción sistólica del ventrículo izquierdo.

En otro aspecto, la invención se refiere, por lo tanto, a un método para la predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la disfunción sistólica en un sujeto, que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra de dicho sujeto.

50 Además, en la población anterior de pacientes de ICA con un predominio de pacientes con insuficiencia cardíaca con disfunción sistólica, el valor del AUC (área bajo la curva de ROC; "ROC" significa características operativas del

receptor) para diferenciar entre pacientes disneicos con y sin ICA, es ligeramente mayor para la MCAM (0,91) que para cada uno del BNP (0,88) y NT-proBNP (0,85). El valor de AUC es una medida combinada de sensibilidad y especificidad y un valor más alto de AUC (es decir, que se aproxima a 1) en general indica un rendimiento mejorado de la prueba.

5 Los autores de la invención han encontrado además que los niveles de MCAM se correlacionan con el estado de llenado cardiaco. En particular, los autores de la invención han encontrado que los niveles de MCAM son mayores en sujetos con un aumento de la presión de llenado cardiaco, comparado con sujetos con presión de llenado cardiaco normal.

10 Tanto la disfunción sistólica como la diastólica pueden producir acumulación de líquidos en un sujeto. Sin embargo, los sujetos con una disfunción sistólica, son más resistentes a la acumulación de líquidos y por lo tanto acumularán más volumen comparado con pacientes con disfunción diastólica antes de que se aparezcan síntomas como la disnea. Los autores de la invención han encontrado que los niveles de MCAM se correlacionan con la acumulación de líquidos, y en particular el estado de llenado vascular o volumen o presión de llenado vascular como una medida de la homeostasis de líquidos. En particular, los autores de la invención encontraron que los niveles de MCAM son más altos en sujetos con aumento de volumen o presión de llenado vascular y por lo tanto la MCAM es un marcador para la acumulación de líquidos en un sujeto. Como corolario, los niveles de MCAM están asociados con la ganancia de peso debido al sobrellenado o con la pérdida de peso debido al llenado menor o contracción de volumen de un sujeto. Como tal, los autores de la invención han encontrado que la MCAM es un marcador para determinar edema, cambios en el estado de volumen o deshidratación de un sujeto. En particular, los niveles de MCAM están correlacionados con el estado de llenado de un sujeto con defectos en la circulación sanguínea, tal como los causados por insuficiencia cardiaca, y defectos en la secreción, tal como causados por disfunción renal o insuficiencia renal. Por consiguiente, en una realización, la descripción se refiere a un método como se describe en la presente memoria para la predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de una homeostasis de líquidos deteriorada en un sujeto, en donde al sujeto que la presenta, se le ha diagnosticado o tiene antecedentes médicos de insuficiencia cardiaca, en particular disfunción sistólica.

20 Por lo tanto, se proporciona un método para la predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la disnea asociada con o causada por sobrecarga de volumen, que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra de dicho sujeto. La sobrecarga de volumen puede ser indicativa de IC, preferiblemente IC debida a disfunción sistólica, y puede estar en riesgo de descompensación o estar descompensada en la ICA. El método puede diferenciar la disnea causada por sobrecarga de volumen tal como en la IC o ICA, de otras causas de disnea (p. ej., EPOC, neumonía).

25 También se describe un método para la predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la IC, preferiblemente ICA, asociada o causada por la sobrecarga de volumen en un sujeto, que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra de dicho sujeto. La sobrecarga de volumen puede ser debida a la disfunción sistólica.

30 Por lo tanto, también se describe un método para la predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la IC, preferiblemente la ICA, asociada o causada por la disfunción sistólica en un sujeto, que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra de dicho sujeto.

35 La disfunción sistólica se caracteriza por una disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y/o derecho, más en particular disminución de la FEVI. Los autores de la invención han encontrado que los niveles de MCAM están correlacionados con la fracción de eyección ventricular. Por lo tanto, se describe un método para la predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la fracción de eyección ventricular en un sujeto, que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra de dicho sujeto.

40 La fracción de eyección ventricular (p. ej., FEVI) en un sujeto se puede decir que se ha reducido comparado con la normal, si dicha fracción de eyección está por debajo de la normal en cualquier grado, p. ej., una fracción de eyección ventricular reducida puede significar menos de aproximadamente 45%, o menos de aproximadamente 50% o menos de aproximadamente 55%; por ejemplo, una fracción de eyección ventricular reducida puede indicar entre aproximadamente 40% y aproximadamente 70%, preferiblemente entre aproximadamente 45% y aproximadamente 65%, o entre aproximadamente 50% y aproximadamente 60%, p. ej., menos de aproximadamente 55%. En un experimento ilustrativo pero no limitante, los niveles de MCAM proporcionaron diferenciación particularmente satisfactoria entre la FEVI normal y reducida cuando el umbral entre dicha FEVI normal y reducida se estableció en 55%. Por lo tanto, en realizaciones, un umbral para la fracción de eyección ventricular normal frente a reducida, en particular la FEVI, se puede establecer en un nivel entre aproximadamente 50% y aproximadamente 60%, p. ej., en 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% o 60%, y preferiblemente en 55%, en donde un valor por encima de dicho umbral refleja la fracción de eyección normal y un valor por debajo de dicho umbral indica fracción de eyección reducida.

45 La caída o disminución del gasto cardiaco debido a una disminución de la fracción de eyección ventricular promueve la retención renal salina y de agua. Esta adaptación adecuada expande el volumen sanguíneo, elevando de esta forma la presión y volumen diastólico final. Por lo tanto, la disfunción sistólica también se caracteriza por un aumento de la presión de llenado cardiaco. Por lo tanto, se proporciona también un método para la predicción, diagnóstico,

pronóstico y/o seguimiento del estado del llenado cardiaco en un sujeto, que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra de dicho sujeto. El estado de llenado cardiaco puede estar representado por la presión de llenado cardiaco.

5 Por lo tanto, se proporciona un método para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la disfunción sistólica en un sujeto, que puede comprender las etapas de:

(i) medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto;

(ii) comparar la cantidad medida de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia una predicción, diagnóstico y/o pronóstico conocido de la disfunción sistólica;

10 (iii) encontrar una desviación o ausencia de desviación de la cantidad de MCAM medida en (i) respecto al valor de referencia;

(iv) atribuir dicha desviación o ausencia de desviación encontrada a una predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de disfunción sistólica en el sujeto.

15 Las etapas anteriores se pueden aplicar, cambiando lo que se deba cambiar, a la disnea asociada o causada por la sobrecarga de volumen; a la IC o ICA asociada o causada por la sobrecarga de volumen; a la IC o ICA asociada o causada por la disfunción sistólica; a la fracción de eyección ventricular; o al estado de llenado cardiaco.

20 La MCAM proporciona una diferenciación mejorada o incluso sustancialmente completa de la disnea causada por la sobrecarga de volumen tal como en la ICA, de otras causas de disnea. Por lo tanto, los autores de la invención contemplan que la MCAM puede ser beneficiosa también para establecer cribados de poblaciones para seleccionar sujetos que tienen o tienen riesgo de tener descompensación aguda. Se puede usar cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para el cribado de poblaciones (tal como, p. ej., el cribado en una población general o en una población estratificada basada en uno o más criterios, p. ej., edad, género, ascendencia, ocupación, presencia o ausencia de factores de riesgo de ICA, etc.). En cualquiera de los métodos anteriores de la presente descripción, el sujeto puede formar parte de una población de pacientes que muestra signos de disnea.

25 Los autores de la invención han encontrado que la MCAM se puede usar como un biomarcador específico para la disfunción sistólica. Por lo tanto, en un aspecto, la descripción se refiere al uso de los métodos como se describen en la presente memoria, para diferenciar entre disfunción sistólica y diastólica.

En una realización se proporciona un método para diferenciar entre la disfunción sistólica y la disfunción diastólica en un sujeto, que comprende:

30 (i) medir la cantidad de MCAM en una muestra de dicho sujeto;

(ii) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un umbral para el diagnóstico de la disfunción sistólica;

(iii) atribuir el diagnóstico de disfunción sistólica en dicho sujeto, si la cantidad de MCAM en dicha muestra de dicho sujeto supera dicho umbral.

35 Como se demuestra en la sección experimental, los autores de la invención han mostrado que la predicción o diagnóstico de disfunción sistólica o un mal pronóstico de la disfunción sistólica se pueden asociar en particular con un nivel elevado de MCAM. Por lo tanto, en una realización de los métodos de predicción, diagnóstico y/o pronóstico como se enseñan en la presente memoria, una cantidad elevada de MCAM en la muestra del sujeto comparada con un valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de ausencia de disfunción sistólica o representa un buen pronóstico para la disfunción sistólica respectivamente, indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener disfunción sistólica o indica un mal pronóstico para la disfunción sistólica en el sujeto. Los niveles elevados de MCAM también pueden ser indicativos de la predicción o diagnóstico o mal pronóstico de la disnea asociada con o causada por la sobrecarga de volumen; o de IC o ICA asociada o causada por la sobrecarga de volumen; o de IC o ICA asociada o causada por la disfunción sistólica; o de fracción de eyección ventricular reducida; o de aumento de presión de llenado cardiaco.

40 En una realización, el método para el seguimiento de la disfunción sistólica comprende las etapas de:

(i) medir la cantidad de MCAM en muestras del sujeto de dos o más tiempos de medición sucesivos;

(ii) comparar la cantidad medida de MCAM entre las muestras medidas en (i);

(iii) encontrar una desviación o ausencia de desviación de la cantidad de MCAM entre las muestras comparadas en (ii);

50 (iv) atribuir dicha desviación o ausencia de desviación encontrada a un cambio en la disfunción sistólica en el sujeto, entre dos o más tiempos de medición sucesivos.

Las etapas anteriores se pueden aplicar, cambiando lo que se deba cambiar, a la disnea asociada o causada por la sobrecarga de volumen; a la IC o ICA asociada o causada por la sobrecarga de volumen; a la IC o ICA asociada o causada por la disfunción sistólica; a la fracción de eyección ventricular; o al estado de llenado cardiaco.

El seguimiento se puede aplicar en el transcurso de un tratamiento médico del sujeto.

5 En una realización de los métodos de predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento como se enseñan en la presente memoria, la sensibilidad y/o especificidad (y preferiblemente, la sensibilidad y especificidad) de los métodos es al menos 50%, al menos 60%, al menos 70% o al menos 80%, p. ej., $\geq 81\%$, $\geq 82\%$, $\geq 83\%$, $\geq 84\%$, $\geq 85\%$, $\geq 86\%$, o $\geq 87\%$, o $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ (el símbolo " \geq " es sinónimo de las expresiones "al menos" o "igual o más"), p. ej., entre 80% y 100%, o entre 81% y 95%, o entre 83% y 90%, o entre 84% y 89%, o entre 85% y 88%.

10 En otra realización de los métodos de predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento como se enseñan en la presente memoria, el sujeto puede presentar uno o más síntomas y/o signos potencialmente indicativos de desequilibrio homeostático de líquidos, insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica, disfunción sistólica o disfunción o insuficiencia renal. Por ejemplo, en una realización el sujeto puede presentar disnea.

15 En una realización adicional de los métodos de predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento como se enseñan en la presente memoria, el sujeto puede presentar uno o más factores de riesgo para las afecciones, síntomas y/o valores de parámetros de acuerdo con la descripción, tales como, por ejemplo, una predisposición genética o uno o más factores de riesgo de desarrollo, medioambientales o conductuales, tales como p. ej., resistencia a la insulina (glucosa en sangre alterada), obesidad troncal, niveles altos en el suero de colesterol lipoproteínas de baja densidad (LDL), niveles bajos en el suero de colesterol lipoproteínas de alta densidad (HDL), niveles altos de triglicéridos en el suero y presión arterial alta (hipertensión), infarto de miocardio previo, y/o una o más comorbilidades tales como diabetes, enfermedad arterial coronaria, asma, EPOC y/o enfermedad renal crónica.

20 Por ejemplo, en pacientes que padecen llenado en exceso (sobrecarga de volumen) una disminución del nivel de MCAM comparado con un nivel de MCAM previo (p. ej., en el momento del ingreso en el SU) indica que la afección del sujeto está mejorando o ha mejorado, mientras que un aumento del nivel de MCAM comparado con un nivel de MCAM previo (p. ej., en el momento de ingreso en el SU) indica que la afección del sujeto ha empeorado o está empeorando. Dicho empeoramiento podría dar como resultado posiblemente la recaída de las afecciones, síntomas y/o valores de parámetros de acuerdo con la descripción, tal como un nuevo suceso de insuficiencia cardiaca aguda.

25 En otro ejemplo, en pacientes que padecen llenado menor (contracción de volumen), tal como por ejemplo pacientes en la unidad de cuidados intensivos, un aumento del nivel de MCAM comparado con un nivel de MCAM previo (p. ej., en el momento del ingreso en la UCI) indica que la afección del sujeto está mejorando o ha mejorado, mientras que una disminución del nivel de MCAM comparado con un nivel de MCAM previo (p. ej., en el momento de ingreso en la UCI) indica que la afección del sujeto ha empeorado o está empeorando.

30 Por consiguiente, se proporciona además un método para el seguimiento de un cambio en la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de las afecciones, síntomas y/o valores de parámetros de acuerdo con la descripción en un sujeto, que comprende:

35 (i) aplicar el método de predicción, diagnóstico y/o pronóstico como se ha enseñado antes en la presente memoria al sujeto en uno o más tiempos de medición sucesivos, de modo que se determina la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de las afecciones, síntomas y/o valores de parámetros de acuerdo con la descripción en el sujeto en dichos tiempos de medición sucesivos;

40 (ii) comparar la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de las afecciones, síntomas y/o valores de parámetros de acuerdo con la descripción en el sujeto, en dichos tiempos de medición sucesivos determinados en (i); y

(iii) encontrar la presencia o ausencia de un cambio entre la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de las afecciones, síntomas y/o valores de parámetros de acuerdo con la descripción en el sujeto en dichos tiempos de medición sucesivos determinados en (i).

45 Este aspecto permite el seguimiento de la afección del sujeto a lo largo del tiempo. Esto puede permitir, entre otros, predecir la aparición de las afecciones, síntomas y/o valores de parámetros de acuerdo con la descripción, o hacer el seguimiento en dicho sujeto del progreso de la enfermedad, agravamiento de la enfermedad o alivio, reaparición de la enfermedad, respuesta al tratamiento, respuesta a otros factores externos e internos, afecciones o factores estresantes, etc. Ventajosamente, el cambio en la predicción, diagnóstico y/o pronóstico en el sujeto se puede seguir
50 en el transcurso de un tratamiento médico de dicho sujeto. Dicho seguimiento puede estar comprendido, por ejemplo, en tomar la decisión de si a un paciente se le puede dar el alta, necesita un cambio de tratamiento o necesita más hospitalización.

55 Debe apreciarse que en los presentes métodos de predicción, diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento, la medición de la MCAM también se puede combinar con la evaluación de uno o más biomarcadores adicionales o parámetros clínicos relevantes para las afecciones, síntomas y/o parámetros de acuerdo con la descripción.

Por consiguiente, también se describen en la presente memoria métodos en donde la fase de examen de los métodos comprende además medir la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de dichos otros biomarcadores en la muestra del sujeto. En relación con esto, se podría usar cualquier marcador adecuado conocido o todavía desconocido.

- 5 La disnea puede ser causada por la ICA, pero también está presente en otros pacientes debido a causas distintas o no relacionadas con la ICA, tales como la EPOC o neumonía. Los métodos de diagnóstico de acuerdo con la descripción, funcionan particularmente bien en una población de pacientes que muestra signos de disnea, que permiten el diagnóstico específico de ICA basado en el nivel de MCAM. En una realización preferida de uno cualquiera de los métodos anteriores de la presente descripción, el sujeto forma parte, por lo tanto, de una población de pacientes que muestra signos de disnea.

10 En los métodos enseñados en la presente memoria, la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores se puede medir por cualquier técnica adecuada, tales como las conocidas en la técnica.

- 15 En una realización, la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores se pueden medir usando, respectivamente, un agente de unión capaz de unirse específicamente a la MCAM y/o a fragmentos de la misma, y un agente de unión capaz de unirse específicamente a dicho uno o más de otros biomarcadores.

En una realización, el agente de unión puede ser un anticuerpo, un aptámero, fotoaptámero, proteína, péptido, peptidomimético o una molécula pequeña.

- 20 En una realización adicional, la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores se miden usando una tecnología de inmunoensayo, tales como tecnologías de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA multiplexado, radioinmunoensayo (RIA), ELISPOT, o usando un método de análisis de espectrometría de masas o usando un método de cromatografía, o usando una combinación de dichos métodos.

- 25 Otro aspecto describe el uso de un kit para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA en un sujeto, comprendiendo el kit medios para medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto.

Una realización proporciona el uso de un kit para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA en el sujeto, comprendiendo el kit:

(i) medios para medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto; y

- 30 (ii) un valor de referencia de la cantidad de MCAM o medios para establecer dicho valor de referencia, en donde dicho valor de referencia representa una predicción, diagnóstico y/o pronóstico conocido de ICA.

El kit permite por lo tanto: medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto por el medio (i); comparar la cantidad de MCAM medida por el medio (i) con un valor de referencia de (ii) o establecido por el medio (ii); encontrar una desviación o ausencia de desviación de la cantidad de MCAM medida por el medio (i) respecto al valor de referencia de (ii); y por consiguiente atribuir dicha desviación o ausencia de desviación encontrada a una predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA en el sujeto.

- 35 Una realización adicional proporciona el uso de un kit para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA en un sujeto, comprendiendo el kit medios para medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto y medios para medir la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores útiles para predecir, diagnosticar y/o pronosticar ICA en la muestra del sujeto.

40 Una realización proporciona el uso de un kit para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA en el sujeto, comprendiendo el kit:

(i) medios para medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto;

- 45 (ii) medios para medir la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores útiles para predecir, diagnosticar y/o pronosticar ICA en la muestra del sujeto;

(iii) opcionalmente, medios para establecer un perfil del sujeto de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores; y

- 50 (iv) un perfil de referencia de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores, o medios para establecer dicho perfil de referencia, representando dicho perfil de referencia una predicción, diagnóstico y/o pronóstico conocido de ICA.

Por lo tanto, dicho kit permite: medir la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores en la muestra del sujeto, respectivamente por los medios (i) y (ii); establecer (p. ej., usando

- medios incluidos en el kit o usando medios externos adecuados) un perfil del sujeto de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores basado en dichas mediciones; comparar el perfil del sujeto con el perfil de referencia de (iv) o establecido por los medios de (iv); encontrar una desviación o ausencia de desviación de dicho perfil del sujeto respecto a dicho perfil de referencia; y en consecuencia atribuir dicha desviación o ausencia de desviación encontrada a una predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA en el sujeto.
- 5
- En una realización de los usos anteriores de los kits, dichos otros biomarcadores útiles para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA se pueden seleccionar del grupo que consiste en el péptido natriurético tipo B (BNP), propéptido natriurético tipo B (proBNP), fragmento amino terminal del propéptido natriurético tipo B (NTproBNP), y fragmentos de cualquiera de los mismos.
- 10
- En una realización adicional de los usos anteriores de los kits, los medios para medir la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores pueden comprender, respectivamente, uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a la MCAM y/o a fragmentos de la misma, y uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a dicho uno o más de otros biomarcadores.
- 15
- En una realización, uno cualquiera de dichos uno o más agentes de unión puede ser un anticuerpo, un aptámero, fotoaptámero, proteína, péptido, peptidomimético o una molécula pequeña.
- En una realización, uno cualquiera de dichos uno o más agentes de unión puede estar ventajosamente inmovilizado sobre una fase o soporte sólido.
- 20
- En una realización adicional de los usos anteriores de los kits, los medios para medir la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores pueden usar una tecnología de inmunoensayo, tales como tecnologías de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA multiplexado, radioinmunoensayo (RIA), ELISPOT, o pueden usar una tecnología de análisis de espectrometría de masas o pueden usar una tecnología de cromatografía, o pueden usar una combinación de dichas tecnologías.
- 25
- Por lo tanto, una realización describe el uso de un kit para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA que comprende:
- (a) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a la MCAM y/o a fragmentos de la misma;
- (b) preferiblemente, una cantidad o concentración conocida de MCAM y/o un fragmento de la misma (p. ej., para usar como controles, referencias y/o agentes de calibración);
- 30
- (c) preferiblemente, un valor de referencia de la cantidad de MCAM, o medios para establecer dicho valor de referencia.
- Dichos componentes en (a) y/o (c) se pueden marcar de forma adecuada como se enseña en otra parte en esta memoria descriptiva.
- Otra realización describe el uso de un kit para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA que comprende:
- 35
- (a) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a la MCAM y/o a fragmentos de la misma;
- (b) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a uno o más de otros biomarcadores útiles para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA, preferiblemente en donde dichos otros biomarcadores se eligen del grupo que consiste en BNP, proBNP, NTproBNP y fragmentos de uno cualquiera de los mismos;
- 40
- (c) preferiblemente, una cantidad o concentración conocida de MCAM y/o un fragmento de la misma y una cantidad o concentración conocida de dichos uno o más de otros biomarcadores (p. ej., para usar como controles, patrones y/o agentes de calibración);
- (d) preferiblemente, un perfil de referencia de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores, o medios para establecer dichos perfiles de referencia.
- Dichos componentes en (a), (b) y/o (c) se pueden marcar adecuadamente como se enseña en otra parte en esta memoria descriptiva.
- 45
- También se describen reactivos y herramientas útiles para medir la MCAM y opcionalmente uno o más de otros biomarcadores relacionados con la ICA a los que se hace referencia en la presente memoria.
- Por ejemplo, un aspecto adicional se refiere a una proteína, polipéptido o matriz o micromatriz de péptidos que comprende
- 50
- (a) MCAM y/o a fragmentos de la misma, preferiblemente, una cantidad o concentración conocida de dicha MCAM

y/o fragmento de la misma; y

- 5 (b) opcional y preferiblemente, uno o más de otros biomarcadores útiles para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA, preferiblemente una cantidad o concentración conocida de dichos uno o más biomarcadores, y en donde dichos otros biomarcadores preferiblemente se eligen del grupo que consiste en: BNP, proBNP, NTproBNP y fragmentos de uno cualquiera de los mismos.

Otro aspecto se refiere a una matriz o micromatriz de agentes de unión que comprende:

- (a) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a la MCAM y/o a fragmentos de la misma, preferiblemente, una cantidad o concentración conocida de dichos agentes de unión; y
- 10 (b) opcional y preferiblemente, uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a uno o más de otros biomarcadores útiles para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la ICA, preferiblemente una cantidad o concentración conocida de dichos agentes de unión, y preferiblemente en donde dichos otros biomarcadores preferiblemente se eligen del grupo que consiste en: BNP, proBNP, NTproBNP y fragmentos de uno cualquiera de los mismos.

15 También se describen kits como se ha enseñado antes aquí, configurados como dispositivos portátiles, tales como, por ejemplo, dispositivos clínicos, para usar en casa o en entornos clínicos.

Por lo tanto, un aspecto relacionado proporciona un dispositivo de ensayo portátil capaz de medir la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto, que comprende:

- (i) medios para obtener una muestra del sujeto,
- (ii) medios para medir la cantidad de MCAM en dicha muestra, y
- 20 (iii) medios para visualizar la cantidad de MCAM medida en la muestra.

En una realización, los medios de las partes (ii) y (iii) pueden ser los mismos, proporcionando así un dispositivo de ensayo portátil capaz de medir la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto, que comprende (i) medios para obtener una muestra del sujeto; y (ii) medios para medir la cantidad de MCAM en dicha muestra y visualizar la cantidad de MCAM medida en la muestra.

- 25 En una realización, dicho medio de visualización es capaz de indicar si la cantidad de MCAM en la muestra está por encima o por debajo de un determinado nivel umbral y/o si la cantidad de MCAM en la muestra se desvía o no de un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia una predicción, diagnóstico y/o pronóstico conocido de ICA (como se enseña en otra parte en esta solicitud). Por lo tanto, en una realización, el dispositivo de ensayo portátil puede comprender también de forma adecuada dicho valor de referencia o medios para establecer dichos valor de referencia.
- 30

En una realización, el nivel umbral se elige de modo que la cantidad de MCAM en la muestra por encima de dicho nivel umbral indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener ICA o indica un mal pronóstico para la ICA en el sujeto, y la cantidad de MCAM en la muestra por debajo de dicho nivel umbral indica que el sujeto no tiene o no está en riesgo de tener ICA o indica un buen pronóstico para la ICA en el sujeto.

- 35 En una realización, el dispositivo de ensayo portátil comprende un valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de ausencia de ICA o representa un buen pronóstico para la ICA, o comprende medios para establecer dicho valor de referencia, y una cantidad elevada de MCAM en la muestra del sujeto comparada con dicho valor de referencia indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener ICA o indica un mal pronóstico para la ICA en el sujeto.

40 En otra realización, el dispositivo de ensayo portátil comprende un valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de ICA o representa un mal pronóstico para la ICA, o comprende medios para establecer dicho valor de referencia, y una cantidad comparable de MCAM en la muestra del sujeto comparada con dicho valor de referencia indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener ICA o indica un mal pronóstico para la ICA en el sujeto.

En una realización adicional, los medios de medición (y opcionalmente de visualización) del dispositivo de ensayo portátil pueden comprender un soporte sólido que tiene un extremo proximal y distal, que comprende:

- 45 - una zona de aplicación de la muestra en la proximidad del extremo proximal;
- una zona de reacción distal a la zona de aplicación de la muestra; y
- una zona de detección distal a la zona de reacción;
- opcionalmente patrones de control que comprende la proteína MCAM o fragmentos peptídicos, en donde dicho soporte tiene una propiedad capilar que dirige un flujo de muestra fluida aplicado en la zona de aplicación en una
- 50 dirección desde el extremo proximal al extremo distal, y

- opcionalmente comprende una fuente de fluido que mejora el flujo capilar de una muestra más viscosa.

En una realización, la zona de reacción puede comprender una o más bandas de moléculas de unión específica a la MCAM conjugadas con un agente de detección, cuyo conjugado de molécula de unión específica a MCAM está dispuesto en el soporte sólido de modo que puede migrar con el flujo capilar de fluido;

5 y en donde la zona de detección comprende una o más bandas de captura que comprenden una población de moléculas específicas de MCAM inmovilizadas sobre el soporte sólido.

En una realización, la zona de reacción puede comprender adicionalmente una o más bandas de captura de moléculas de unión específica a MCAM en una cantidad suficiente para prevenir que una cantidad umbral de conjugados de moléculas de unión específica a MCAM migren a la zona de detección. En una realización alternativa, dicho dispositivo comprende adicionalmente medios para comparar la cantidad de conjugado de moléculas de unión específica a MCAM capturado con un valor umbral.

La descripción también proporciona un dispositivo de ensayo capaz de medir la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto que comprende:

(i) medios para medir la cantidad de MCAM en dicha muestra, y

15 (ii) medios para almacenar el valor de referencia en el dispositivo, y

(iii) medios de comparación de la cantidad obtenida con el valor de referencia almacenado, y

(iv) medios para visualizar la cantidad de MCAM medida en la muestra.

En realizaciones preferidas de los kits y dispositivos de la presente descripción, la detección de la proteína MCAM se hace en una muestra de plasma, que implica que se detecta la proteína MCAM circulante, independientemente de si esta forma en la circulación corresponde o no a la forma soluble o a un producto de degradación de la forma de longitud completa o soluble. En una realización preferida, la proteína MCAM detectada por dichos kits o dispositivos no está unida a membrana o a célula. Preferiblemente, el medio para detectar dicha proteína MCAM o fragmento, es capaz de detectar tanto la proteína de longitud completa, proteína madura o como proteína procesada o la forma de la misma circulante plasmática. Más preferiblemente, dicho medio para detectar la proteína MCAM es reconocer específicamente la forma circulante plasmática de la MCAM como se define en la presente memoria.

Estos y otros aspectos y realizaciones preferidas se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la secuencia de proteína del biomarcador MCAM, tomada de NP_006491 (SEQ ID NO: 1). La proteína se conoce como molécula de adhesión de células de melanoma (MCAM), o como MUC18 o CD146. El péptido señal y los dominios transmembrana y citoplasmático están indicados en letras minúsculas. También está indicado el péptido cuantificado MASsterclass seleccionado (pept25 - negrilla, subrayado: SEQ ID NO: 2). Este péptido MASsterclass puede cuantificar tanto la forma de longitud completa como la soluble escindida de MCAM.

La figura 2 ilustra las secuencias de preproBNP y péptidos derivados: preproBNP (SEQ ID NO: 3), proBNP (SEQ ID NO: 4), NT-pro-BNP (SEQ ID NO: 5) y BNP madura (SEQ ID NO: 6).

La figura 3 ilustra que la MCAM muestra rendimiento comparable a los péptidos natriuréticos tipo B en la diferenciación de pacientes con ICA de los disneicos sin insuficiencia cardíaca aguda. La curva de eficacia diagnóstica (características operativas del receptor) de BNP comparado con MCAM (A) y NT-proBNP comparado con MCAM (B) respectivamente para el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca causa de la disnea en el SU. En la tabla 1 más adelante se dan la mediana del área bajo la curva (AUC) calculada e intervalos de confianza (IC) al 95%.

La figura 4 ilustra el valor complementario de MCAM y BNP y el impacto de combinar estas dos proteínas marcadoras en la precisión del diagnóstico. Los niveles de BNP medidos por ELISA convencional se muestran en el eje X y los niveles de MCAM medidos por MASsterclass se representan en el eje Y. También se muestran el punto de corte mejor calculado para la MCAM (línea horizontal) y los puntos de corte usados habitualmente para la BNP (dos líneas verticales que abarcan la "zona gris"). La precisión calculada para los marcadores independientes y la combinación de ambos marcadores se dan en la tabla 2 más adelante.

La figura 5 ilustra los niveles de MCAM (A) y BNP (B) medidos en pacientes con ICA en el ingreso y en los mismos pacientes en el alta del hospital. La gráfica superior muestra valores sin procesar medidos por MASsterclass o ELISA, mientras que la gráfica inferior muestra valores normalizados que son el número de veces de cambio entre el ingreso y el alta.

Figura 6: Vista plana (A) y lateral (B) de una tira de ensayo de acuerdo con la descripción.

Figura 7: Vista plana de un cartucho de ensayo de acuerdo con la descripción.

Las figuras 8 A-B muestran una vista lateral y una vista superior, respectivamente, de una tira reactiva de acuerdo con la descripción, que comprende varias almohadillas de ensayo.

5 Figura 9: ilustra en gráficas de caja y bigotes la correlación entre la ganancia de peso y los niveles de MCAM en pacientes con ICA en el ingreso.

Figura 10: ilustra en gráficas de caja y bigotes la correlación entre la FEVI y niveles de MCAM en pacientes con ICA en el ingreso.

Descripción detallada de la invención

10 Como se usa en la presente memoria, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen tanto las referencias singulares como plurales, salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Los términos “que comprende”, “comprende” y “compuesto de” como se usan en la presente memoria, son sinónimos con “que incluye”, “incluye” o “que contiene”, “contiene”, y son inclusivos o no limitados y no excluyen miembros, elementos o etapas del método adicionales no citados.

15 La cita de intervalos numéricos y puntos finales incluye todos los números y fracciones abarcados dentro de los respectivos intervalos, así como los puntos finales citados.

20 El término “aproximadamente” como se usa en la presente memoria cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración de tiempo, y similares, se entiende que abarca variaciones de y desde el valor especificado, en particular variaciones de +/-10% o menos, preferiblemente +/-5% o menos, más preferiblemente +/-1% o menos, y todavía más preferiblemente +/-0,1% o menos de y desde el valor especificado, siempre que dichas variaciones sean adecuadas para la realización en la descripción. Debe entenderse que el valor al cual se refiere el modificador “aproximadamente” se describe el mismo también específicamente y preferiblemente.

25 Salvo que se especifique otra cosa, todos los términos usados en esta descripción, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Como guía adicional, las definiciones de términos pueden estar incluidas para apreciar mejor la enseñanza de la presente descripción.

La presente invención deriva del entendimiento muy innovador de los autores de la invención de que la MCAM es un biomarcador valioso para la insuficiencia cardíaca (aguda), en particular como un biomarcador para la disfunción sistólica como una causa subyacente de la insuficiencia cardíaca (aguda), incluyendo los parámetros asociados a la disfunción sistólica tales como la fracción de eyección (FE) y el volumen y presión de llenado cardíaco.

30 El término “biomarcador” está extendido en la técnica y puede indicar de forma amplia una molécula biológica y/o una parte detectable de la misma cuya evaluación cualitativa y/o cuantitativa en un sujeto es predictiva o informativa (p. ej., predicción, diagnóstico y/o pronóstico) con respecto a uno o más aspectos del fenotipo y/o genotipo del sujeto, tales como, por ejemplo, con respecto al estado del sujeto respecto a una enfermedad o afección dada.

35 Las expresiones “insuficiencia cardíaca”, “insuficiencia cardíaca aguda” e “insuficiencia cardíaca crónica” como se usan en la presente memoria, llevan sus respectivos significados establecidos en la técnica. Como guía adicional, la expresión “insuficiencia cardíaca” como se usa de forma amplia en la presente memoria se refiere a afecciones patológicas caracterizadas por la velocidad del flujo sanguíneo diastólico o sistólico alterada y por lo tanto insuficiente flujo de sangre desde el ventrículo a los órganos periféricos. En realizaciones preferidas de la invención, la ICA está asociada a la disfunción sistólica, preferiblemente caracterizada por una disminución de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI), preferiblemente en donde dicha FEVI es menor que 55% o menor que 50% o menor que 45% y/o por presión de llenado cardíaco aumentada.

45 La “insuficiencia cardíaca aguda” o denominada también “insuficiencia cardíaca aguda descompensada”, se pueden definir como el inicio rápido de síntomas y signos secundarios a la función cardíaca anómala, que da como resultado la necesidad de tratamiento urgente. La ICA puede presentarse aguda desde el principio (aparición nueva de insuficiencia cardíaca aguda en un paciente sin disfunción cardíaca previamente conocida) o como descompensación aguda de la ICC.

50 La disfunción cardíaca puede estar relacionada con la disfunción sistólica o diastólica, las anomalías en la frecuencia cardíaca, o con la carga previa y carga posterior desajustadas. A menudo es potencialmente mortal y requiere tratamiento urgente. De acuerdo con la clasificación establecida, la ICA incluye varias afecciones clínicas distintas de pacientes que presentan: (I) insuficiencia cardíaca congestiva aguda descompensada, (II) ICA con hipertensión/ crisis hipertensiva, (III) ICA con edema pulmonar, (IVa) choque cardiogénico/síndrome de capacidad baja, (IVb) choque cardiogénico grave, (V) insuficiencia de alto gasto, y (VI) insuficiencia cardíaca aguda del lado derecho. Para la descripción clínica detallada, clasificación y diagnóstico de ICA, y para el resumen de sistemas de clasificación de ICA adicionales incluyendo la clasificación de Killip, la clasificación de Forrester y la clasificación de

“gravedad clínica”, se hace referencia entre otros a Nieminen *et al.* 2005 (“Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology”. *Eur Heart J* 26: 384-416) y referencias en el mismo. Preferiblemente, dicha disfunción cardiaca es disfunción sistólica, más preferiblemente caracterizada por una disminución de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI), preferiblemente en donde dicha FEVI es menor que 55% o menor que 50% o menor que 45%, y/o por aumento de la presión de llenado cardiaco.

La expresión “disfunción sistólica” como se usa en la presente memoria lleva su significado establecido en la técnica. Como guía adicional, la expresión “disfunción sistólica” se puede usar de forma intercambiable con expresiones sinónimas conocidas por el experto en la técnica, tales como “insuficiencia o disfunción ventricular sistólica” o “insuficiencia o disfunción cardiaca sistólica”. Esencialmente, la “disfunción sistólica” se refiere a una insuficiencia de la función de bombeo del corazón, debido a una menor contractilidad del ventrículo.

La expresión “disfunción diastólica” como se usa en la presente memoria lleva su significado establecido en la técnica. Como guía adicional, la expresión “disfunción diastólica” se puede usar de forma intercambiable con expresiones sinónimas conocidas por el experto en la técnica, tales como “insuficiencia o disfunción ventricular diastólica” o “insuficiencia o disfunción cardiaca diastólica”. Esencialmente, la “disfunción diastólica” se refiere a una insuficiencia de la función de bombeo del corazón, debido al llenado ventricular alterado.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “fracción de eyección ventricular (izquierda)” significa el gasto del ventrículo (izquierdo) durante la sístole, y representa la fracción de sangre bombeada fuera de un ventrículo (izquierdo) con cada latido del corazón. Por definición, el volumen de sangre dentro de un ventrículo inmediatamente antes de una contracción se conoce como volumen diastólico final. Igualmente, el volumen de sangre que queda en un ventrículo al final de una contracción es el volumen sistólico final. La diferencia entre los volúmenes diastólico final y sistólico final es el volumen sistólico, el volumen de sangre eyectado con cada latido. La fracción de eyección (FE) es la fracción del volumen diastólico final que es eyectado con cada latido; es decir, es el volumen sistólico (VS) dividido entre el volumen diastólico final (VDF): $FE = VS/VDF = (VDF-VSF)/VDF$.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “presión de llenado cardiaco” se refiere a la presión con la que el ventrículo se llena con sangre. Las presiones de llenado cardiaco se controlan para calcular los volúmenes de llenado cardiaco que, a su vez, determina los volúmenes sistólicos de los ventrículos izquierdo y derecho. Como se usa en la presente memoria, la presión de llenado cardiaco es una representación de la presión diastólica final ventricular izquierda. Se conocen en la técnica métodos para determinar o calcular la presión de llenado cardiaco e incluyen mediciones por ultrasonidos (ecocardiografía) y Doppler, así como la medición directa por cateterismo del ventrículo. La presión de llenado cardiaco se puede calcular indirectamente por la medición de la presión auricular izquierda, presión venosa central o presión de la arteria pulmonar o presión capilar.

La expresión “acumulación de líquidos” como se usa en la presente memoria significa un aumento de líquido corporal en un sujeto. Como tal, la acumulación de líquidos está asociada con la retención de líquidos. La acumulación de líquidos puede estar causada, entre otros, por ejemplo por insuficiencia cardiaca (aguda), en particular debido a la disfunción sistólica o disfunción o insuficiencia renal, en particular una disfunción que previene o interfiere de otra forma con la secreción normal de líquidos en un sujeto, tal como el síndrome nefrótico. Las características de acumulación de líquidos incluyen un aumento de volumen de llenado vascular (o expansión de volumen vascular) y un aumento de la presión de llenado vascular. Como se usa en la presente memoria, el “estado de llenado” o “carga de líquido” se refiere al contenido de líquido en un sujeto, en particular al contenido de líquido vascular, tisular e intersticial. Como se usa en la presente memoria, el “volumen de llenado vascular” se refiere a la cantidad o volumen de líquidos en la vasculatura. Como se usa en la presente memoria, la “presión de llenado vascular” se refiere a la presión que es generada por la cantidad o volumen de líquidos en la vasculatura. Como se usa en la presente memoria, las expresiones “volumen de llenado vascular” y “presión de llenado vascular” se pueden usar de forma intercambiable. Los síntomas de la acumulación de líquidos en general y un aumento de volumen y/o presión de llenado vascular incluyen edema. Como se usa en la presente memoria, “edema” se refiere a la acumulación o retención de líquidos extravasculares, causada por un aumento de volumen o presión de llenado vascular. De acuerdo con la invención, la acumulación de líquidos, un aumento de volumen y/o presión de llenado vascular y el edema, pueden ser causados por la insuficiencia cardiaca (aguda), disfunción sistólica, disfunción renal o cualquier mecanismo fisiopatológico conocido en la técnica que produzca dicho desequilibrio de líquidos u homeostasis de líquidos anómala.

La expresión “insuficiencia cardiaca crónica” (ICC) se refiere en general a un caso de insuficiencia cardiaca que progresa tan lentamente que trabajan varios mecanismos compensatorios para llevar la enfermedad al equilibrio. Los síntomas clínicos comunes de la ICC incluyen, entre otros, uno cualquiera o más de dificultad respiratoria, capacidad de ejercicio disminuida, fatiga, letargo y edema periférico. Otros síntomas menos comunes incluyen uno o más de palpitaciones, alteraciones de la memoria o sueño y confusión, y normalmente ocurren simultáneamente con uno o más de los síntomas comunes citados antes.

En estudios tales como el presente, la población de ICC puede diferir de la población de ICA en cuanto que los pacientes de ICC no tienen una descompensación aguda y por lo tanto no se presentan en el SU en el momento en el que se toma la muestra en dicho estudio o investigación. Sin embargo, los pacientes con insuficiencia cardiaca

crónica pueden tener descompensación fácilmente conduciendo a la “insuficiencia cardiaca aguda”.

En estudios tales como el presente, una población de pacientes disneicos sin insuficiencia cardiaca puede comprender por ejemplo, pacientes que en el SU presentan síntomas similares a la población con ICA pero donde la causa de la disnea no está relacionada con la insuficiencia cardiaca aguda descompensada. Los ejemplos típicos son pacientes con EPOC o neumonía. Dichos pacientes pueden o no tener antecedentes de insuficiencia cardiaca subyacente, que pueden complicar en particular el diagnóstico final usando medios de diagnóstico convencionales tales como las mediciones de BNP o NT-pro-BNP.

Los términos “predecir” o “predicción”, “diagnosticar” o “diagnóstico” y “pronosticar” o “pronóstico” son comunes y están bien entendidos en la práctica médica y clínica. Como explicación adicional y sin limitación, “predecir” o “predicción” en general se refiere a una declaración de avance, indicación o anticipación de una enfermedad o afección en un sujeto al que (todavía) no se le ha dicho dicha enfermedad o afección. Por ejemplo, una predicción de una enfermedad o afección en un sujeto puede indicar una probabilidad, posibilidad o riesgo de que el sujeto desarrolle dicha enfermedad o afección, por ejemplo, en un determinado periodo de tiempo o a una determinada edad. Dicha probabilidad, posibilidad o riesgo puede estar indicada, entre otros, como un valor absoluto, intervalo o estadística, o puede estar indicado con respecto a una población de sujetos o sujeto de control adecuado (tal como, p. ej., con respecto a una población de sujetos o sujeto en general, normal o sano). Por lo tanto, la probabilidad, posibilidad o riesgo de que un sujeto desarrolle una enfermedad o afección puede estar ventajosamente indicada como un aumento o disminución, o como un número de veces de aumento o número de veces de disminución con respecto a una población de sujetos o sujeto de control adecuado.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “predicción de la ICA” en un sujeto puede significar en particular que el sujeto tiene una predicción “positiva” de la ICA, es decir, que el sujeto tiene riesgo de tener ICA (p. ej., el riesgo es significativamente mayor frente a una población de sujetos o sujeto de control adecuado). La expresión “predicción de ausencia de ICA” en un sujeto puede significar en particular que el sujeto tiene una predicción “negativa” de la ICA, es decir, que el riesgo del sujeto de tener ICA no es significativamente mayor frente a una población de sujetos o sujeto de control adecuado.

Los términos “diagnosticar” o “diagnóstico” se refieren en general al proceso o acto de reconocer, decidir sobre o concluir sobre una enfermedad o afección en un sujeto, basándose en los síntomas y/o signos y/o resultados de diferentes procedimientos de diagnóstico (tales como, por ejemplo, de conocer la presencia, ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores característicos de la enfermedad o afección diagnosticados).

Como se usa en la presente memoria, el “diagnóstico de ICA” en un sujeto puede significar en particular que el sujeto tiene ICA, por lo tanto, se le diagnostica que tiene ICA. El “diagnóstico de ausencia de ICA” en un sujeto puede significar en particular que el sujeto no tiene ICA, por lo tanto, se le diagnostica que no tiene ICA. Se puede diagnosticar a un sujeto, como se enseña en la presente memoria, que no tiene ICA, a pesar de presentar uno o más síntomas o signos convencionales reminiscentes de la ICA.

Los términos “pronosticar” y “pronóstico” en general se refieren a una anticipación del progreso de una enfermedad o afección y la perspectiva (p. ej., la probabilidad, duración y/o extensión) de recuperación.

Un buen pronóstico de ICA en general puede abarcar la anticipación de una recuperación parcial o completa satisfactoria de la ICA, preferiblemente dentro de un periodo de tiempo aceptable. Un buen pronóstico de ICA puede abarcar más habitualmente la anticipación de no empeoramiento o agravamiento adicional de la afección de insuficiencia cardiaca, preferiblemente dentro de un periodo de tiempo dado.

Un pronóstico malo de ICA en general puede abarcar la anticipación de una recuperación deficiente y/o recuperación insatisfactoriamente lenta, o sustancialmente no recuperación o incluso más empeoramiento de la ICA.

Los diferentes aspectos y realizaciones enseñados en la presente memoria se pueden basar en la medición de la cantidad de MCAM, y opcionalmente la medición de la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más de otros biomarcadores relevantes, tales como preferiblemente BNP, proBNP, NTproBNP y/o fragmentos de uno cualquiera de los mismos, en una muestra de un sujeto.

El término “sujeto” o “paciente” como se usa en la presente memoria, típicamente indica seres humanos, pero puede abarcar también la referencia a animales no humanos, preferiblemente animales de sangre caliente, más preferiblemente mamíferos, tales como, p. ej., primates no humanos, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.

Los términos “muestra” o “muestra biológica” como se usan en la presente memoria, incluyen cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto. Las muestras pueden incluir, sin limitación, sangre entera, plasma, suero, glóbulos rojos, glóbulos blancos (p. ej., células mononucleares de sangre periférica), saliva, orina, excrementos (es decir, las heces), lágrimas, sudor, sebo, aspirado de pezón, lavado ductal, exudados tumorales, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, linfa, aspirado con aguja fina, líquido amniótico, cualquier otro líquido corporal, lisados celulares, productos de secreción celulares, líquidos de inflamación, semen y secreciones vaginales. Las muestras preferidas pueden incluir las que comprenden MCAM en cantidades detectables. En realizaciones preferidas, la muestra puede

ser sangre entera o un componente fraccional de la misma tal como, p. ej., plasma, suero o un sedimento celular. Preferiblemente, la muestra se puede obtener fácilmente por métodos invasivos mínimos. Las muestras también pueden incluir muestras de tejido y biopsias, homogeneizados de tejidos y similares. Preferiblemente, la muestra usada para detectar los niveles de MCAM es plasma sanguíneo. El término "plasma" define el líquido acuoso incoloro de la sangre que no contiene células, pero en el que se suspenden las células (eritrocitos, leucocitos, trombocitos, etc.), que contienen nutrientes, azúcares, proteínas, minerales, enzimas, etc.

Una molécula o analito tal como una proteína, polipéptido o péptido o un grupo de dos o más moléculas o analitos tales como dos o más proteínas, polipéptidos o péptidos, se "miden" en una muestra cuando la presencia o ausencia y/o cantidad de dicha molécula o analito o dicho grupo de moléculas o analitos, se detecta o determina en la muestra, preferiblemente sustancialmente con la exclusión de otras moléculas y analitos.

Los términos "cantidad" y "nivel" son sinónimos y en general están bien entendidos en la técnica. Los términos usados en la presente memoria pueden referirse en particular a una cuantificación absoluta de una molécula o un analito en una muestra, o a una cuantificación relativa de una molécula o analito en una muestra, es decir, con respecto a otro valor tal como con respecto a un valor de referencia, como se enseña en la presente memoria, o a un intervalo de valores que indican una expresión base del biomarcador. Estos valores o intervalos se pueden obtener de un solo paciente o de un grupo de pacientes.

Una cantidad absoluta de una molécula o analito en una muestra se puede expresar ventajosamente como una cantidad en peso o molar, o más habitualmente como una concentración, p. ej. peso por volumen o mol por volumen.

Una cantidad relativa de una molécula o analito en una muestra se puede expresar ventajosamente como un aumento o disminución o como un número de veces de aumento o disminución con respecto a dicho otro valor, tal como con respecto a un valor de referencia, como se enseña en la presente memoria. Llevar a cabo una comparación relativa entre el primer y el segundo parámetro (p. ej., primera y segunda cantidades) puede, pero no es necesario, requerir determinar primero los valores absolutos de dichos primer y segundo parámetro. Por ejemplo, un método de medición puede producir lecturas cuantificables (tales como, p. ej., intensidades de señales) para dichos primer y segundo parámetros, en donde dichas lecturas son una función del valor de dichos parámetros, y en donde dichas lecturas se pueden comparar directamente para producir un valor relativo para el primer parámetro frente al segundo parámetro, sin la necesidad real de convertir primero las lecturas en valores absolutos de los respectivos parámetros.

Como se usa en la presente memoria, el término "MCAM" corresponde a la proteína normalmente conocida como molécula de adhesión de células de melanoma (MCAM), MUC18 o CD146, es decir, las proteínas y polipéptidos normalmente conocidas bajo estas designaciones en la técnica. Los términos abarcan dichas proteínas y polipéptidos de cualquier organismo donde se encuentren, y en particular de animales, preferiblemente vertebrados, más preferiblemente mamíferos, incluyendo seres humanos y mamíferos no humanos, incluso más preferiblemente de seres humanos. Los términos abarcan en particular dichas proteínas y polipéptidos con una secuencia natural, es decir, aquellos cuya secuencia primaria es la misma que la de la MCAM encontrada en u obtenida de la naturaleza. Un experto en la técnica entiende que las secuencias naturales de MCAM pueden diferir entre diferentes especies debido a divergencia genética entre dichas especies. Además, las secuencias naturales de MCAM pueden diferir entre o en diferentes individuos de la misma especie, debido a la diversidad (variación) genética normal dentro de una especie dada. También, las secuencias naturales de MCAM pueden diferir entre o incluso en individuos diferentes de la misma especie debido a modificaciones postranscripcionales y postraduccionales. Por consiguiente, todas las secuencias de MCAM encontradas en u obtenidas en la naturaleza se consideran "naturales". Los términos abarcan proteínas y polipéptidos de MCAM cuando forman una parte de un organismo vivo, órgano, tejido o célula, cuando forman una parte de una muestra biológica, así como cuando al menos se aíslan parcialmente de dichas fuentes. Los términos también abarcan proteínas y polipéptidos cuando son producidos por medios recombinantes o sintéticos.

Las MCAM de ejemplo incluyen, sin limitación, MCAM humana que tiene la secuencia de aminoácidos primaria como está anotada en el número de acceso en Uniprot/Swissprot (<http://www.expasy.org/>) NP 006491 como se muestra en la Fig. 1 (SEQ ID NO: 1). Un experto en la técnica también puede apreciar que dichas secuencias son del precursor de MCAM y pueden incluir partes que son separadas por procesamiento de la MCAM madura. Por ejemplo, la proteína MCAM puede estar en una forma soluble o puede estar unida a la membrana celular. En la figura 1, el péptido señal y los dominios transmembrana y citoplasmático están indicados en letras minúsculas en la secuencia de aminoácidos. También está indicado el péptido cuantificado MASterclass seleccionado (pept25 - negrilla, subrayado: SEQ ID NO: 2). Este péptido MASterclass puede cuantificar tanto la forma de longitud completa como la soluble escindida de MCAM, aunque debido a la configuración experimental solo se mide la fracción que circula en el plasma (es decir, la fracción no unida a células).

La proteína MCAM es específica para células endoteliales y células musculares lisas vasculares y se ha usado como una herramienta para la separación de células endoteliales de una población de células sanguíneas, basado en la forma unida a membrana de CD146. La MCAM pertenece a la superfamilia de genes de inmunoglobulina con 5 dominios de tipo inmunoglobulina (V-V-C2-C2-C2), una región transmembrana y una cola citoplasmática de 63

restos. Es una glicoproteína de membrana que funciona como una molécula de adhesión celular independiente del Ca²⁺ implicada en interacciones heterófilas de célula a célula. La proteína tiene un tamaño molecular de 130 kDa en su forma reducida (118 kDa no reducida) y cantidades de glicosilación unidas a N para el 50 por ciento del peso molecular aparente. La CD146 soluble es liberada por derramamiento de ectodominio (por la acción de MMP). Se observó un aumento de los niveles plasmáticos de CD146 soluble en pacientes con insuficiencia renal crónica (niveles saludables en el suero: ~270 ng/ml; pacientes con insuficiencia renal: ~500ng/ml) como se describe en Saito et al., 2008 (*Clin Exp Nephrol.*, febrero de 2008;12(1):58-64. Epub 5 de enero de 2008). Por otra parte, se observaron niveles en el suero menores de sCD146 (CD146 soluble) en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) tal como enfermedad de Crohn, mientras que la expresión de CD146 unido a membrana es mayor en la EII activa (Bardin et al., *Inflamm. Bowel Dis.*, enero de 2006;12(1):16-21 y Reumaux et al., *Inflamm. Bowel Dis.*, octubre de 2007;13(10):1315-7). Las últimas dos publicaciones indican que hay una clara diferencia en la correlación entre la afección del paciente y los niveles de 1) la MCAM soluble, y 2) la o las formas unidas a célula o membrana de la MCAM. En una realización preferida de los métodos, kits y dispositivos de la presente invención como se describen en la presente memoria, se detecta la proteína MCAM circulante, p. ej., la forma que circula en el plasma sanguíneo, en oposición a la proteína MCAM unida a membrana o célula (p. ej., la MCAM presente en la superficie de células endoteliales).

La MCAM se ha conocido como un marcador de daño celular endotelial, pero no se ha mostrado que sean útil para distinguir pacientes con ICA y con disnea sin ICA. Además, el marcador MCAM a menudo se usa como una herramienta para la separación de células endoteliales, que implica que se usa la proteína (de longitud completa) unida a membrana (véase, p. ej., el documento WO2006/020936).

La referencia en la presente memoria a la MCAM también abarca fragmentos de MCAM. Por lo tanto, la referencia en la presente memoria a la medición de la MCAM, o la medición de la cantidad de MCAM, puede abarcar medir la proteína o polipéptido MCAM, tal como, p. ej., medir la madurez y/o la forma soluble procesada por MMP (llamada de forma abreviada "forma soluble" en lo sucesivo) de MCAM y/o medir uno o más fragmentos de la misma. Por ejemplo, la MCAM y/o uno o más fragmentos de la misma se pueden medir de forma colectiva, de modo que la cantidad medida corresponda a la suma de las cantidades de las especies medidas de forma colectiva. En otro ejemplo, la MCAM y/o uno o más fragmentos de la misma se pueden medir cada uno individualmente. Preferiblemente, dicho fragmento de MCAM es una forma de MCAM circulante en el plasma.

La expresión "forma circulante en el plasma de MCAM" o de forma abreviada "forma circulante" abarca todas las proteínas de MCAM o fragmentos de la misma que circulan en el plasma, es decir, no están unidas a célula o membrana. Sin querer estar ligados por ninguna teoría, dichas formas circulantes se pueden obtener de la proteína MCAM de longitud completa por procesamiento natural (p. ej., escisión por MMP en su "forma soluble" como se ha indicado antes), o pueden ser resultado de procesos de degradación conocidos que ocurren en dicha muestra. En algunas situaciones, la forma circulante también puede ser la proteína MCAM de longitud completa, que se encuentra que está circulando en el plasma. Dicha "forma circulante" puede ser, por lo tanto, cualquier proteína de MCAM o cualquier forma soluble procesada de MCAM o fragmentos de cualquiera de ellos, que están circulando en la muestra, es decir, no está unida a fracción de célula o membrana de dicha muestra.

Como se usan en la presente memoria, las expresiones "propéptido natriurético tipo B" (también abreviado como "proBNP") y "fragmento amino terminal del propéptido natriurético tipo B" (también abreviado como "NTproBNP") y "péptido natriurético tipo B" (también abreviado como "BNP"), se refieren a péptidos habitualmente conocidos con estas designaciones en la técnica. Como explicación adicional y sin limitación, proBNP, NTproBNP y BNP in vivo, derivan de la preproteína precursora del péptido natriurético B (preproBNP). En particular, el péptido proBNP corresponde a la parte de preproBNP después de eliminación de la secuencia (líder) de la señal de secreción N-terminal de preproBNP. NTproBNP corresponde a la parte N-terminal y BNP corresponde a la parte C-terminal del péptido proBNP después de escisión del último adyacente C-terminal al aminoácido 76 de proBNP. Los términos abarcan dichos péptidos de cualquier organismo en los que se encuentren, y en particular de animales, preferiblemente vertebrados, más preferiblemente mamíferos, incluyendo seres humanos y mamíferos no humanos, incluso más preferiblemente de seres humanos.

Las designaciones proBNP, NTproBNP y BNP, como se usan en la presente memoria, se refieren en particular a dichos péptidos con una secuencia natural, es decir, péptidos en los que la secuencia primaria es la misma que la de los respectivos proBNP, NTproBNP o BNP encontrados en u obtenidos de la naturaleza. Un experto en la técnica entiende que las secuencias naturales de proBNP, NTproBNP o BNP pueden diferir entre diferentes especies debido a la divergencia genética entre dichas especies. Además, las secuencias nativas de proBNP, NTproBNP o BNP pueden diferir entre o incluso en individuos diferentes de la misma especie debido a la diversidad (variación) genética normal en una especie dada. Además, las secuencias naturales de proBNP, NTproBNP o BNP pueden diferir entre o incluso en diferentes individuos de la misma especie debido a modificaciones postranscripcionales o postraduccionales. Por consiguiente, todas las secuencias proBNP, NTproBNP o BNP encontradas en u obtenidas de la naturaleza se consideran "naturales".

Las designaciones proBNP, NTproBNP o BNP, como se usan en la presente memoria, abarcan los respectivos péptidos cuando forman parte de un organismo vivo, órgano, tejido o célula, cuando forman una parte de una muestra biológica, así como cuando se aíslan al menos parcialmente de dichas fuentes. Los términos también

abarcen los respectivos péptidos cuando son producidos por medios recombinantes o sintéticos.

El péptido proBNP humano de ejemplo incluye, sin limitación, el péptido desde la posición de aminoácido 27 a la posición 134 de la secuencia de la preproteína del precursor de péptido natriurético B, como está anotado con el número de acceso en NIH Entrez Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>) NP_002512 (versión NP_002512.1 revisado el 25 de enero, 2009).

La secuencia NP_002512 se muestra en la figura 3A (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de ejemplo de proBNP de NP_002512 se muestra en la figura 3B (SEQ ID NO: 4). El péptido NTproBNP humano de ejemplo, incluye sin limitación el péptido desde la posición de aminoácido 27 a la posición 102 de la secuencia de la preproteína del precursor de péptido natriurético B, como está anotado en dicho número de acceso en NIH Entrez Protein NP_002512. La secuencia de ejemplo de NTproBNP de NP_002512 se muestra en la figura 3C (SEQ ID NO: 5). El péptido BNP humano de ejemplo incluye, sin limitación, el péptido desde la posición de aminoácido 103 a la posición 134 de la secuencia de la preproteína del precursor de péptido natriurético B como está anotado con dicho número de acceso en NIH Entrez Protein NP_002512. La secuencia de ejemplo de BNP de NP_002512 se muestra en la figura 3D (SEQ ID NO: 6). Véase también Sudoh et al. 1989 (*Biochem Biophys Res Commun* 159: 1427-1434) para más ilustración de los péptidos derivados de preproBNP humanos, incluyendo proBNP, NTproBNP y BNP. Véase también Maisel et al. 2008 (*Eur J Heart Fail* 10(9): 824-39) y Miller et al. 2007 (*Biomarkers Med* 1(4): 503-512) en el uso de niveles de péptido natriurético en la práctica clínica.

La referencia en la presente memoria a proBNP, NTproBNP y/o BNP también puede abarcar fragmentos de uno cualquiera de proBNP, NTproBNP y/o BNP. Por lo tanto, la referencia en la presente memoria a la medición de la presencia o ausencia y/o cantidad de proBNP, NTproBNP y/o BNP, puede abarcar la medición de los péptidos proBNP, NTproBNP y/o BNP, y/o la medición de uno o más fragmentos de uno cualquiera de los péptidos proBNP, NTproBNP y/o BNP. Por ejemplo, los péptidos proBNP, NTproBNP y/o BNP y/o uno o más fragmentos de uno cualquiera de los mismos, se pueden medir de forma colectiva, de modo que la cantidad medida corresponde a la suma de las cantidades de las especies medidas de forma colectiva. En otro ejemplo, los péptidos proBNP, NTproBNP y/o BNP y/o uno o más fragmentos de uno cualquiera de los mismos, se pueden medir cada uno individualmente.

Además, salvo que sea evidente por el contexto, la referencia en la presente memoria a cualquier proteína, polipéptido o péptido (tal como, p. ej., MCAM, proBNP, NTproBNP o BNP) y fragmentos de los mismos, en general puede abarcar formas modificadas de dicha proteína, polipéptido o péptido y fragmentos, tales como las que llevan modificaciones posteriores a la expresión que incluyen, por ejemplo, fosforilación, glicosilación, lipidación, metilación, cisteinilación, sulfonación, glutationilación, acetilación, oxidación de metionina a sulfoxido de metionina o metionina-sulfona, y similares.

En una realización, la MCAM y fragmentos de la misma, o proBNP, NTproBNP, BNP y fragmentos de los mismos, pueden ser humanos, es decir, su secuencia primaria puede ser la misma que una que corresponda a la secuencia primaria de o presente en una MCAM humana natural y fragmentos de la misma, o proBNP, NTproBNP, BNP y fragmentos de los mismos. Por lo tanto, el calificativo "humano" en relación con esto, se refiere a la secuencia primaria de las proteínas, polipéptidos, péptidos o fragmentos respectivos, más que a su origen o fuente. Por ejemplo, dichas proteínas, polipéptidos, péptidos o fragmentos pueden estar presentes en o aislarse de muestras de sujetos humanos o pueden obtenerse por otros medios (p. ej., por expresión recombinante, traducción sin células o síntesis de péptidos no biológica).

El término "fragmento" de una proteína, polipéptido o péptido se refiere en general a las formas de eliminación o truncado N-terminal y/o C-terminal de dicha proteína, polipéptido o péptido. El término abarca fragmentos que surgen de cualquier mecanismo, tal como sin limitación, por traducción alternativa, exo y/o endoproteolisis y/o degradación de dicha proteína o polipéptido, tal como, por ejemplo, in vivo o in vitro, tal como, por ejemplo, por proteólisis física, química y/o enzimática. Sin limitación, un fragmento de una proteína, polipéptido o péptido puede representar al menos aproximadamente 5%, o al menos aproximadamente 10%, p. ej., $\geq 20\%$, $\geq 30\%$ o $\geq 40\%$, tal como $\geq 50\%$, p. ej., $\geq 60\%$, $\geq 70\%$ o $\geq 80\%$, o incluso $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ de la secuencia de aminoácidos de dicha proteína, polipéptido o péptido.

Por ejemplo, un fragmento de MCAM puede incluir una secuencia de ≥ 5 aminoácidos consecutivos, o ≥ 10 aminoácidos consecutivos, o ≥ 20 aminoácidos consecutivos, o ≥ 30 aminoácidos consecutivos, p. ej., ≥ 40 aminoácidos consecutivos, tal como, por ejemplo ≥ 50 aminoácidos consecutivos, p. ej., ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 90 , ≥ 100 , ≥ 200 , ≥ 300 , ≥ 400 , ≥ 500 o ≥ 600 aminoácidos consecutivos de la MCAM.

En una realización, un fragmento de MCAM puede ser la forma truncada N-terminal y/o C-terminal por entre 1 y aproximadamente 20 aminoácidos, tal como, p. ej., por entre 1 y aproximadamente 15 aminoácidos, o por entre 1 y aproximadamente 10 aminoácidos, o por entre 1 y aproximadamente 5 aminoácidos, comparado con la MCAM madura de longitud completa (SEQ ID NO: 1) o su forma soluble (véase la figura 1).

En una realización, un fragmento de proBNP, NTproBNP o BNP puede ser la forma truncada N-terminal y/o C-terminal por entre 1 y aproximadamente 20 aminoácidos, tal como, p. ej., por entre 1 y aproximadamente 15

aminoácidos, o por entre 1 y aproximadamente 10 aminoácidos, o por entre 1 y aproximadamente 5 aminoácidos, comparado con proBNP, NTproBNP o BNP. A modo de ejemplo, los fragmentos proBNP, NTproBNP y BNP útiles como biomarcadores se describen en el documento WO 2004/094460.

5 En una realización, los fragmentos de una proteína, polipéptido o péptido dados se pueden conseguir por proteólisis in vitro de dicha proteína, polipéptido o péptido para obtener ventajosamente péptido o péptidos detectables de una muestra.

10 Por ejemplo, dicha proteólisis se puede llevar a cabo mediante agentes físicos, químicos y/o enzimáticos, p. ej., proteinasas, preferiblemente endoproteinasas, es decir, escisión por proteasa internamente dentro de una cadena de proteína, polipéptido o péptido. Una lista no limitante de endoproteinasas incluye serina proteinasas (EC 3.4.21), treonina proteinasas (EC 3.4.25), cisteína proteinasas (EC 3.4.22), ácido aspártico proteinasas (EC 3.4.23), metaloproteinasas (EC 3.4.24) y ácido glutámico proteinasas.

15 Las endoproteinasas de ejemplo no limitantes incluyen tripsina, quimiotripsina, elastasa, endoproteinasa Lys-C de *Lysobacter enzymogenes*, endoproteinasa Glu-C de *Staphylococcus aureus* (endopeptidasa V8) o endoproteinasa Arg-C de *Clostridium histolyticum* (clostripaina). Se pueden usar enzimas conocidas o todavía no identificadas adicionales; un experto en la técnica puede elegir la o las proteasas adecuadas basándose en su especificidad y frecuencia de escisión para lograr las formas de péptidos deseadas.

20 Preferiblemente, la proteólisis se puede realizar mediante endopeptidasas del tipo tripsina (EC 3.4.21.4), preferiblemente tripsina, tal como, sin limitación, preparaciones de tripsina de páncreas bovino, páncreas humano, páncreas porcino, tripsina recombinante, tripsina Lys-acetilada, tripsina en solución, tripsina inmovilizada sobre un soporte sólido, etc. La tripsina es particularmente útil, entre otros, debido a la alta especificidad y eficacia de escisión. La descripción también contempla el uso de cualquier proteasa de tipo tripsina, es decir, con una especificidad similar a la de la tripsina.

Por otra parte, se pueden usar reactivos químicos para la proteólisis. Por ejemplo, CNBr puede escindir en Met, BNPS-escatol puede escindir en Trp.

25 Las condiciones para el tratamiento, p. ej., concentración de proteínas, concentración de enzimas o reactivos químicos, pH, tampón, temperatura, tiempo, los puede determinar el experto en la técnica dependiendo de la enzima o reactivo químico usado.

30 Por lo tanto, en un aspecto, la descripción también proporciona un fragmento aislado de MCAM como se ha definido antes aquí. Dichos fragmentos pueden dar información útil sobre la presencia y cantidad de MCAM en muestras biológicas, de modo que la detección de dichos fragmentos sea de interés. Por lo tanto, los fragmentos descritos en la presente memoria de MCAM son biomarcadores útiles.

35 El término "aislado" con referencia a un componente particular (tal como, por ejemplo, una proteína, polipéptido, péptido o fragmento de los mismos) en general indica que dicho componente existe separado, por ejemplo, se ha separado o preparado separado, de uno o más de otros componentes de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína, polipéptido, péptido o fragmento aislado, humano o animal, existe separado de un cuerpo humano o animal donde se encuentra de forma natural.

40 El término "aislado" como se usa en la presente memoria, puede abarcar también preferiblemente el calificativo "purificado". Como se usa en la presente memoria, el término "purificado" con referencia a proteína(s), polipéptido(s), péptido(s) y/o fragmento(s) de los mismos, no requiere la pureza absoluta. En cambio, indica que dicha o dichas proteínas, polipéptidos, péptidos y/o fragmentos de los mismos están en un entorno discreto en el que su abundancia (expresada de forma conveniente en términos de masa o peso o concentración) con respecto a otras proteínas, es mayor que en una muestra biológica. Un entorno discreto indica un medio solo, tal como por ejemplo una solución sola, gel, precipitado, liofilizado, etc. Los péptidos, polipéptidos o fragmentos purificados se pueden obtener por métodos conocidos que incluyen, por ejemplo, síntesis de laboratorio o recombinante, cromatografía, electroforesis preparativa, centrifugación, precipitación, purificación por afinidad, etc.

45 La o las proteínas, polipéptidos, péptidos y/o fragmentos purificados preferiblemente constituyen, en peso, $\geq 10\%$, más preferiblemente $\geq 50\%$, tal como $\geq 60\%$, todavía más preferiblemente $\geq 70\%$, tal como $\geq 80\%$, y todavía más preferiblemente $\geq 90\%$, tal como $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$ o incluso 100% , del contenido de proteína del entorno discreto. El contenido de proteína se puede determinar, p. ej., por el método de Lowry (Lowry et al. 1951. *J Biol Chem* 193: 265), opcionalmente como describe Hartree 1972 (*Anal Biochem* 48: 422-427). Además, la pureza de los péptidos o polipéptidos se puede determinar por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul Coomassie, o preferiblemente tinción con plata.

55 Una realización adicional proporciona MCAM aislada o fragmentos de MCAM, como se enseña en la presente memoria, que comprenden un marcador detectable. Esto facilita la detección fácil de dichos fragmentos. El término "marcador" como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva se refiere a cualquier átomo, molécula, resto o biomolécula que se puede usar para proporcionar una lectura o propiedad detectable y preferiblemente cuantificable, y que puede estar unida a o formar parte de una entidad de interés, tal como un péptido o polipéptido o un agente de

unión específico. Los marcadores se pueden detectar de forma adecuada por medios de espectrometría de masas, espectroscópicos, ópticos, colorimétricos, magnéticos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos o medios químicos. Los marcadores incluye, sin limitación, colorantes; radiomarcadores tales como ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I ; reactivos de densidad electrónica; enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina, como se usa habitualmente en inmunoensayos); restos de unión tales como biotina-estreptavidina; haptenos tales como diogoxigenina; restos luminógenos, fosforescentes o fluorógenos; marcadores de masas; y colorantes fluorescentes solos o en combinación con restos que pueden suprimir o cambiar los espectros de emisión por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

En una realización, la MCAM aislada o fragmentos de MCAM, como se enseña en la presente memoria, pueden marcarse mediante un marcador que altera la masa. Preferiblemente, un marcador que altera la masa puede implicar la presencia de un isótopo estable distinto en uno o más aminoácidos del péptido frente a su correspondiente péptido no marcado. Los péptidos con marcaje de masas son particularmente útiles como controles positivos, patrones o calibradores en aplicaciones de espectrometría de masas. En particular, los péptidos que incluyen uno o más isótopos distintos son químicamente similares, se separan cromatográfica y electroforéticamente de la misma forma y también se ionizan y fragmentan de la misma forma. Sin embargo, en un analizador de masas adecuado, dichos péptidos y opcionalmente los iones de fragmentación seleccionados de los mismos, presentarán relaciones m/z que los distinguen y por lo tanto se pueden diferenciar. Los ejemplos de parejas de isótopos estables que se pueden distinguir incluyen H y D, ^{12}C y ^{13}C , ^{14}N y ^{15}N o ^{16}O y ^{18}O . Normalmente, los péptidos y proteínas de muestras biológicas analizadas en la presente descripción pueden contener sustancialmente solo isótopos comunes que tienen una alta prevalencia en la naturaleza, tales como, por ejemplo H, ^{12}C , ^{14}N y ^{16}O . En dicho caso, el péptido con marcaje de masa se puede marcar con uno o más isótopos no comunes que tienen una prevalencia baja en la naturaleza, tales como, por ejemplo D, ^{13}C , ^{15}N y/o ^{18}O . Es posible también, que en casos donde los péptidos o proteínas de una muestra biológica incluyeran uno o más isótopos no comunes, el péptido con marcaje de masa pueda comprender el o los respectivos isótopos comunes.

Los péptidos sintéticos con marcaje isotópico, se pueden obtener, entre otros, por síntesis o producción recombinante de dichos péptidos, usando uno o más sustratos de aminoácidos con marcaje isotópico, o por modificación química o enzimática de péptidos no marcados para introducir en estos uno o más isótopos distintos. A modo de ejemplo y no de limitación, los péptidos marcados con D se pueden sintetizar o producir de forma recombinante en presencia de L-metionina deuterada disponible en el comercio $\text{CH}_3\text{-S-CD}_2\text{CD}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ o arginina deuterada $\text{H}_2\text{NC(=NH)-NH-(CD}_2\text{)}_3\text{-CD(NH}_2\text{)-COOH}$. Debe observarse que cualquier aminoácido cuya forma deuterada o que contiene ^{15}N o ^{13}C exista, se puede considerar para la síntesis o producción recombinante de péptidos marcados. En otro ejemplo no limitante, un péptido se puede tratar con tripsina en H_2^{16}O o H_2^{18}O , conduciendo a la incorporación de dos oxígenos (^{16}O o ^{18}O , respectivamente) en el extremo COOH de dicho péptido (p. ej., documento US 2006/105415).

Por consiguiente, también está contemplado el uso de MCAM y fragmentos aislados de MCAM como se enseña en la presente memoria, que comprende opcionalmente un marcador detectable, como controles (positivo), patrones o calibradores en ensayos de detección cualitativos o cuantitativos (métodos de medición) de MCAM, y en particular en dichos métodos para la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de la ICA en sujetos, como se enseña en la presente memoria. Las proteínas, polipéptidos o péptidos se pueden suministrar en cualquier forma, entre otros como precipitado, secado al vacío, liofilizado, en solución como líquido o congelado, o inmovilizado de forma covalente o no covalente sobre fase sólida, tal como por ejemplo, sobre matriz cromatográfica sólida o sobre vidrio o plástico y otras superficies adecuadas (p. ej., como parte de matrices y micromatrices de péptidos). Los péptidos se pueden preparar fácilmente, por ejemplo, aislados de fuentes naturales, o preparados de forma recombinante o sintética.

También se proporcionan agentes de unión capaces de unirse específicamente a uno cualquiera o más de los fragmentos aislados de la MCAM, como se enseña en la presente memoria. Se proporcionan además agentes de unión capaces de unirse específicamente a solo uno de los fragmentos aislados de MCAM, como se enseña en la presente memoria. Dichos agentes de unión pueden incluir, entre otros, un anticuerpo, aptámero, fotoaptámero, proteína, péptido, peptidomimético o una molécula pequeña.

En una realización preferida, dicho agente de unión es capaz de unirse tanto a las formas unidas a membrana como circulantes en el plasma de la MCAM. Preferiblemente, dicho agente de unión es capaz de unirse específicamente o detectar la forma circulante en el plasma de la MCAM.

La expresión “se une específicamente” como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva, significa que un agente (indicado en la presente memoria también como “agente de unión específica”) se une a una o más moléculas o analitos deseados, tales como a una o más proteínas, polipéptidos o péptidos de interés o fragmentos de los mismos, sustancialmente con exclusión de otras moléculas que son aleatorias o no relacionadas, y opcionalmente sustancialmente con la exclusión de otras moléculas que están estructuralmente relacionadas.

La expresión “se une específicamente” no requiere necesariamente que un agente se una exclusivamente a su diana o dianas previstas. Por ejemplo, se puede decir que un agente se une específicamente a proteína(s), polipéptido(s), péptido(s) y/o fragmento(s) de los mismos de interés, si su afinidad por dicha diana o dianas previstas

- 5 en condiciones de unión es al menos aproximadamente 2 veces mayor, preferiblemente al menos aproximadamente 5 veces mayor, más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces mayor, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 25 veces mayor, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 50 veces mayor, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 100 veces o más mayor, que su afinidad por una molécula que no es diana.
- 10 Preferiblemente, el agente se puede unir a su o sus dianas previstas con constante de afinidad (K_A) de dicha unión $K_A \geq 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, todavía más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, incluso más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, y todavía más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ o $K_A \geq 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, en donde $K_A = \frac{[\text{SBA}_T][\text{SBA}][\text{T}]}{[\text{SBA}_T][\text{SBA}][\text{T}]}$, SBA indica el agente de unión específica, T indica la diana prevista. La determinación de K_A se puede llevar a cabo por métodos conocidos en la técnica, tales como por ejemplo, usando diálisis de equilibrio y análisis de gráfico de Scatchard.
- Los agentes de unión específicos, como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva pueden incluir, entre otros un anticuerpo, aptámero, fotoaptámero, proteína, péptido, peptidomimético o una molécula pequeña.
- 15 Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y en general se refiere a cualquier agente de unión inmunológico. El término abarca específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes (p. ej., multivalente 2, 3 o superior) y/o multiespecíficos (p. ej., anticuerpos específicos bi- o superior) formados a partir de al menos dos anticuerpo intactos, y fragmentos de anticuerpo en la medida que presenten la actividad biológica deseada (en particular, la capacidad para unirse específicamente a un antígeno de interés), así como compuestos multivalentes y/o multiespecíficos de dichos fragmentos. El término "anticuerpo" no es inclusivo de anticuerpos generados por métodos que comprenden inmunización, si no que incluye también cualquier polipéptido, p. ej., un polipéptido expresado de forma recombinante, que se hace para abarcar al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) capaz de unión específica a un epitopo en un antígeno de interés. Por lo tanto, el término se aplica a dichas moléculas independientemente de si se producen in vitro o in vivo.
- 20 En una realización, un anticuerpo puede ser cualquiera de las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y preferiblemente anticuerpo de clase IgG.
- En una realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, p. ej., un antisuero o inmunoglobulinas purificadas a partir de este (p. ej., purificado por afinidad).
- 25 En otra realización preferida, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o una mezcla de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden dirigirse a un antígeno particular o un epitopo particular dentro de un antígeno, con mayor selectividad y reproducibilidad.
- 30 A modo de ejemplo y no de limitación, los anticuerpos monoclonales se pueden hacer por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al. 1975 (*Nature* 256: 495), o se puede hacer por métodos de ADN recombinantes (p. ej., como en el documento US 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando técnicas descritas por Clackson et al. 1991 (*Nature* 352: 624-628) y Marks et al. 1991 (*J Mol Biol* 222: 581-597), por ejemplo.
- 35 En realizaciones adicionales, los agentes de unión a anticuerpo pueden ser fragmentos de anticuerpos. Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende la región de unión al antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv; fragmentos bivalentes; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multivalentes y/o multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpos, p. ej., fragmentos bivalentes, fragmentos trivalentes y fragmentos multivalentes. Las designaciones anteriores Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv etc. se pretende que tengan su significado establecido en la técnica.
- 40 El término anticuerpo incluye anticuerpos procedentes de o que comprenden una o más porciones derivadas de cualquier especie animal, preferiblemente especie de vertebrado, incluyendo, p. ej., aves y mamíferos. Sin limitación, los anticuerpos pueden ser de pollo, pavo, ganso, pato, pintada, codorniz o faisán. También sin limitación, los anticuerpos pueden ser humanos, murinos (p. ej., ratón, rata, etc.), burro, conejo, cabra, oveja, cobaya, camello (p. ej., (p. ej., *Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), llama (p. ej., *Lama paccos*, *Lama glama* o *Lama vicugna*) o caballo.
- 45 Un experto entenderá que un anticuerpo puede incluir una o más eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos (p. ej., sustituciones conservativas), siempre que dichas alteraciones conserven su unión del respectivo antígeno. Un anticuerpo también puede incluir una o más modificaciones naturales o artificiales de sus restos de aminoácidos constituyentes (p. ej., glicosilación, etc.).
- 50 Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos son bien conocidos en la técnica, como lo son métodos para producir anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1988; Harlow y Lane, "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1999,
- 55

ISBN 0879695447; "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", de Zola, ed., CRC Press 1987, ISBN 0849364760; "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach", de Dean y Shepherd, eds., Oxford University Press 2000, ISBN 0199637229; *Methods in Molecular Biology*, vol. 248: "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Lo, ed., Humana Press 2004, ISBN 1588290921).

- 5 El término "aptámero" se refiere a una oligo-ADN, oligo-ARN u oligo-ADN/ARN monocatenario o bicatenario o cualquier análogo de los mismos, que se puede unir específicamente a una molécula diana tal como un péptido. Ventajosamente, los aptámeros pueden presentar especificidad y afinidad bastante altas (p. ej., K_A del orden de $1 \times 10^9 M^{-1}$) para sus dianas. La producción de aptámeros se describe, entre otros, en el documento US 5.270.163; Ellington y Szostak 1990 (*Nature* 346: 818-822); Tuerk y Gold 1990 (*Science* 249: 505-510); o "The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications", de Klussmann, ed., Wiley-VCH 2006, ISBN 3527310592. El término "fotoaptámero" se refiere a un aptámero que contiene uno o más grupos funcionales fotorreactivos que se pueden unir de forma covalente o entrecruzar con una molécula diana. El término "peptidomimético" se refiere a un agente no peptídico que es topológicamente análogo a un péptido correspondiente. Los métodos de peptidomiméticos diseñados racionalmente son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el diseño racional de tres peptidomiméticos basados en el péptido octámero sulfatado CCK26-33, y los dos peptidomiméticos basados en el péptido undecámero sustancia P, y principios de diseño de peptidomiméticos relacionados, se describen en Horwell 1995 (*Trends Biotechnol* 13:132-134).

- 20 La expresión "molécula pequeña" se refiere a compuestos, preferiblemente compuestos orgánicos, con un tamaño comparable al de las moléculas orgánicas usadas en general en productos farmacéuticos. La expresión excluye macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas están en el intervalo de tamaño de hasta aproximadamente 5000 Da, p. ej., hasta aproximadamente 4000, preferiblemente hasta 3000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da, incluso más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da, p. ej., hasta aproximadamente 900, 800, 700, 600 o hasta aproximadamente 500 Da.

- 25 También se proporcionan métodos para inmunizar animales, p. ej., animales no humanos tales como animales de laboratorio o granja usando (es decir, usando como el antígeno de inmunización) los fragmentos enseñados en la presente memoria de MCAM, opcionalmente unidos a un vehículo presentador. La inmunización y preparación de reactivos anticuerpos a partir de suero inmune es bien conocido y se describe en documentos a los que se hace referencia en otra parte en esta memoria descriptiva. Los animales que se van a inmunizar pueden incluir cualquier especie animal, preferiblemente especies de sangre caliente, más preferiblemente especies de vertebrados, incluyendo, p.ej., aves y mamíferos. Sin limitación, los anticuerpos pueden ser de pollo, pavo, ganso, pato, pintada, codorniz o faisán. También sin limitación, los anticuerpos pueden ser humanos, murinos (p. ej., ratón, rata, etc.), burro, conejo, cabra, oveja, cobaya, camello, llama o caballo.

- 35 El término "vehículo presentador" o "vehículo" en general indica una molécula inmunógena que, cuando se une a una segunda molécula, aumenta las respuestas inmunitarias contra esta última, normalmente proporcionando epítopos de células T adicionales. El vehículo presentador puede ser una estructura (poli)peptídica o una estructura no peptídica, tal como, entre otros, glicanos, polietilenglicoles, miméticos de péptidos, polímeros sintéticos, etc. Los ejemplos no limitantes de vehículos incluyen la proteína nuclear del virus de la hepatitis B, dominios C3d múltiples, fragmento C de la toxina tetánica o partículas Ty de levaduras.

- 40 Los sueros inmunes obtenidos o que se pueden obtener por inmunización, como se enseña en la presente memoria, pueden ser particularmente útiles para generar reactivos anticuerpos que se unen específicamente con uno o más de los fragmentos de MCAM descritos en la presente memoria.

- 45 La memoria descriptiva también enseña un método para seleccionar agentes de unión específicos que se unen a (a) uno o más de los fragmentos de MCAM enseñados en la presente memoria, sustancialmente con la exclusión de (b) MCAM y/u otros fragmentos de la misma. De forma conveniente, dichos métodos se pueden basar en sustraer o eliminar agentes de unión que tienen reacciones cruzadas o uniones cruzadas con las moléculas de MCAM no deseadas de (b). Dicha sustracción se puede llevar a cabo como se conoce en la técnica, mediante una variedad de métodos de separación por afinidad, tales como cromatografía de afinidad, extracción en fase sólida por afinidad, extracción magnética por afinidad, etc.

- 50 Se puede usar cualquier método de separación, detección y cuantificación existente, disponible o convencional, en la presente memoria, para medir la presencia o ausencia (p. ej., siendo la lectura presente frente a ausente; o cantidad detectable frente a cantidad no detectable) y/o cantidad (p. ej., siendo la lectura una cantidad absoluta o relativa, tal como, por ejemplo, concentración absoluta o relativa) de MCAM y/o fragmentos de la misma, y opcionalmente de uno o más biomarcadores útiles para la ICA en muestras (cualesquiera moléculas o analitos de interés para medir en muestras, incluyendo MCAM y fragmentos de los mismos, se pueden referir a continuación en la presente memoria de forma colectiva como biomarcadores).

Por ejemplo, dichos métodos pueden incluir métodos de inmunoensayo, métodos de análisis de espectrometría de masas, o métodos cromatográficos o combinaciones de los mismos.

El término "inmunoensayo" se refiere en general a métodos conocidos como tales para la detección de una o más

moléculas o analitos de interés en una muestra, en donde la especificidad de un inmunoensayo por la o las moléculas o analitos de interés se confiere mediante la unión específica entre un agente de unión específico, normalmente un anticuerpo, y la o las moléculas o analitos de interés.

5 Las tecnologías de inmunoensayo incluyen, sin limitación, tecnologías ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA multiplexado, radioinmunoensayo (RIA), ELISPOT, y otras técnicas similares conocidas en la técnica. Los principios de estos métodos de inmunoensayo se conocen en la técnica, por ejemplo, John R. Crowther, "The ELISA Guidebook", 1ª ed., Humana Press 2000, ISBN 0896037282.

10 Como explicación adicional y no limitación, el ELISA directo usa un anticuerpo primario marcado para unirse a y de esta forma cuantificar el antígeno diana en una muestra inmovilizada en un soporte sólido tal como una placa de microvaloración. El ELISA indirecto usa un anticuerpo primario no marcado que se une al antígeno diana y un anticuerpo secundario marcado que reconoce y permite cuantificar el anticuerpo primario unido a antígeno. En el ELISA de tipo sándwich el antígeno diana es capturado de una muestra usando un anticuerpo de "captura" inmovilizado que se une a un sitio antigénico en el antígeno, y posteriormente para separar los analitos no unidos, el antígeno así capturado se detecta usando un anticuerpo de "detección" que se une a otro sitio antigénico en dicho antígeno, donde el anticuerpo de detección puede estar marcado directamente o ser detectable indirectamente como antes. El ELISA competitivo usa un "competidor" marcado que puede ser el anticuerpo primario o el antígeno diana. En un ejemplo, el anticuerpo primario inmovilizado no marcado se incuba con una muestra, esta reacción se deja que alcance del equilibrio, y después se añade el antígeno diana marcado. Este último se unirá al anticuerpo primario donde quiera que sus sitios de unión no estén todavía ocupados por antígeno diana no marcado de la muestra. Por lo tanto, la cantidad detectada de antígeno marcado unido se correlaciona inversamente con la cantidad de antígeno no marcado en la muestra. El ELISA multiplexado permite la detección simultánea de dos o más analitos en un solo compartimento (p. ej., pocillo de microplaca) normalmente en una pluralidad de localizaciones de la matriz (véase, por ejemplo, Nielsen y Geierstanger 2004. *J Immunol Methods* 290: 107-20 y Ling et al. 2007. *Expert Rev Mol Diagn* 7: 87-98 para guía adicional). Como se apreciará, el marcaje en las tecnologías de ELISA normalmente es por conjugación enzimática (tal como, p. ej., peroxidasa de rábano picante) y el punto final típicamente es colorimétrico, quimiluminiscente o fluorescente.

30 El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica basada en competición e implica mezclar cantidades conocidas de antígeno diana con marcaje radiactivo (p. ej., marcado con ^{125}I o ^{131}I), con anticuerpo contra dicho antígeno, después añadir antígeno no marcado o "frío" de una muestra y medir la cantidad de antígeno marcado desplazado (véase, p. ej., "An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques", de Chard T, ed., Elsevier Science 1995, ISBN 0444821198 para guía).

Además, los métodos de espectrometría de masas son adecuados para medir biomarcadores.

35 En general, son útiles en la presente memoria cualesquiera técnicas de espectrometría de masas (MS) que puedan obtener información precisa sobre la masa de péptidos y preferiblemente también sobre la fragmentación y/o secuencia de aminoácidos (parcial) de péptidos seleccionados (p. ej., en espectrometría de masas en tándem, MS/MS; desintegración post-fuente, TOF MS). Las técnicas y sistemas de MS y MS/MS de péptidos adecuadas son bien conocidas (véase, p. ej., *Methods in Molecular Biology*, vol. 146: "Mass Spectrometry of Proteins and Peptides", de Chapman, ed., Humana Press 2000, ISBN 089603609x; Biemann 1990. *Methods Enzymol* 193: 455-79; o *Methods in Enzymology*, vol. 402: "Biological Mass Spectrometry", de Burlingame, ed., Academic Press 2005, ISBN 9780121828073), y se pueden usar en la presente memoria.

45 Las disposiciones, instrumentos y sistemas de MS adecuados para el análisis de péptidos biomarcadores pueden incluir, sin limitación, MS con ionización por desorción por láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI-TOF); MALDI-TOF de desintegración post-fuente (PSD); MALDI-TOF/TOF; MS espectrometría de masas con ionización por desorción por láser inducida en superficie en tiempo de vuelo (SELDI-TOF); espectrometría de masas por ionización por electropulverización (ESI-MS); ESI-MS/MS; ESI-MS/(MS)ⁿ (n es un número entero mayor que cero); MS de trampa iónica por ESI 3D o lineal (2D); MS de triple cuadrupolo por ESI; MS por ESI de TOF de cuadrupolo ortogonal (Q-TOF); sistemas de MS por ESI de transformada de Fourier; desorción/ionización en silicio (DIOS); espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS); espectrometría de masas por ionización química a presión atmosférica (APCI-MS); APCI-MS/MS; APCI-(MS)ⁿ; espectrometría de masas por fotoionización a presión atmosférica (APPI-MS); APPI-MS/MS; y APPI-(MS)ⁿ. Las disposiciones de MS de fragmentación iónica en tándem (MS/MS) se pueden lograr usando formas establecidas en la técnica, tales como, p. ej., disociación inducida por colisión (CID).

55 En una realización, la detección y cuantificación de biomarcadores por espectrometría de masas puede implicar el seguimiento de reacciones múltiples (MRM), tal como describen, entre otros, Kuhn et al. 2004 (*Proteomics* 4:1175-86).

En una realización, los métodos de análisis de péptidos por MS se pueden combinar de forma ventajosa con métodos de separación o fraccionamiento de péptidos o proteínas corriente arriba, tal como, por ejemplo, con los métodos cromatográficos y otros métodos descritos en la presente memoria más adelante.

La cromatografía también se puede usar para medir biomarcadores. Como se usa en la presente memoria, el término “cromatografía” abarca métodos para separar sustancias químicas, mencionadas como tales y ampliamente disponibles en la técnica. En un procedimiento preferido, la cromatografía se refiere a un procedimiento en el que una mezcla de sustancias químicas (analitos) llevada por una corriente de líquido o gas que se mueve (“fase móvil”) se separa en componentes, como resultado de la distribución diferencial de los analitos, cuando fluyen alrededor y sobre una fase estacionaria líquida o sólida (“fase estacionaria”), entre dicha fase móvil y dicha fase estacionaria. La fase estacionaria normalmente puede ser un sólido finamente dividido, una lámina de material de filtro, o una película fina de un líquido sobre la superficie de un sólido, o similares. La cromatografía también se puede aplicar ampliamente para la separación de compuestos químicos de origen biológico, tales como, p. ej., aminoácidos, proteínas, fragmentos de proteínas o péptidos, etc.

La cromatografía como se usa en la presente memoria puede ser preferiblemente en columna (es decir, en donde la fase estacionaria se deposita o empaqueta en una columna), preferiblemente cromatografía de líquidos, y todavía más preferiblemente HPLC. Aunque los detalles de la cromatografía son bien conocidos en la técnica, para una guía adicional véase, p. ej., Meyer M., 1998, ISBN: 047198373X, y “Practical HPLC Methodology and Applications”, Bidlingmeyer, B. A., John Wiley & Sons Inc., 1993.

Los tipos de cromatografía de ejemplo incluyen, sin limitación, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC de fase normal (NP-HPLC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), tal como cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, cromatografía de interacción hidrófila (HILIC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) incluyendo cromatografía de filtración en gel o cromatografía de gel permeable, cromatografía de afinidad tal como cromatografía de inmunofinidad, de afinidad de metal inmovilizado, y similares.

En una realización, la cromatografía que incluye cromatografía monodimensional, bidimensional o más dimensiones, se puede usar como un método de fraccionamiento de péptidos junto con un método de análisis de péptidos adicional, tal como, por ejemplo, con un análisis de espectrometría de masas corriente abajo como se describe en otra parte en esta memoria descriptiva.

Se pueden usar métodos adicionales de separación, identificación o cuantificación de péptidos o polipéptidos, opcionalmente junto con cualquiera de los métodos de análisis descritos antes, para medir biomarcadores en la presente descripción. Dichos métodos incluyen, sin limitación, reparto por extracción química, isoelectroenfoque (IEF) que incluye el isoelectroenfoque capilar (CIEF), isotacoforesis capilar (CITP), electrocromatografía capilar (CEC), y similares, electroforesis en gel de poliacrilamida monodimensional (PAGE), electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), electroforesis en gel capilar (CGE), electroforesis capilar de zona (CZE), cromatografía electrocinética capilar (MEKC), electroforesis de flujo libre (FFE), etc.

Los diferentes aspectos y realizaciones enseñados en la presente memoria, se pueden basar además en la comparación de la cantidad de MCAM medida en muestras con valores de referencia de la cantidad de MCAM, en donde dichos valores de referencia representan predicciones, diagnósticos y/o pronósticos conocidos de ICA.

Por ejemplo, distintos valores de referencia pueden representar la predicción de un riesgo (p. ej., un riesgo anormalmente elevado) de tener ICA frente a la predicción de no tener o tener riesgo normal de ICA. En otro ejemplo, distintos valores de referencia pueden representar predicciones de diferentes grados de riesgo de tener ICA.

En un ejemplo adicional, los distintos valores de referencia pueden representar el diagnóstico de ICA frente al diagnóstico de ausencia de ICA (tal como, p. ej., el diagnóstico de sano o recuperado de la ICA, etc.). En otro ejemplo, distintos valores de referencia pueden representar el diagnóstico de ICA de diferente gravedad.

En otro ejemplo más, diferentes valores de referencia pueden representar un buen pronóstico para la ICA frente a un mal pronóstico para la ICA. En un ejemplo adicional, los distintos valores de referencia pueden representar pronósticos favorables o desfavorables de forma variable para la ICA.

Dicha comparación en general puede incluir medios para determinar la presencia o ausencia de al menos una diferencia y opcionalmente del tamaño de dichos valores o perfiles intermedios diferentes que se comparan. Una comparación puede incluir una inspección visual, una comparación aritmética o estadística de mediciones. Dichas comparaciones estadísticas incluyen, pero no se limitan a aplicar una regla. Si los valores o perfiles de biomarcadores comprenden al menos un patrón, la comparación para determinar una diferencia en dichos valores o perfiles de biomarcadores también puede incluir mediciones de esos patrones, de modo que dichas mediciones del biomarcador se correlacionan con las mediciones de los patrones internos.

Los valores de referencia para la cantidad de MCAM se pueden establecer de acuerdo con procedimientos conocidos previamente usados para otros biomarcadores.

Por ejemplo, un valor de referencia de la cantidad de MCAM para una predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA se puede establecer determinando la cantidad de MCAM en la o las muestras de un individuo o de una población de individuos caracterizada por dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA (es

decir, para quien dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA es válida). Dicha población puede comprender sin limitación ≥ 2 , ≥ 10 , ≥ 100 , o incluso varios cientos o más individuos.

5 Por lo tanto, a modo de ejemplo ilustrativo, los valores de referencia de la cantidad de MCAM para el diagnóstico de ICA frente a ausencia de ICA, se pueden establecer determinando la cantidad de MCAM en la o las muestras de un individuo o de una población de individuos a los que se ha diagnosticado (p. ej., basado en otro medio adecuadamente concluyente, tal como por ejemplo, signos y síntomas clínicos, imágenes, ECG, etc.) respectivamente que tienen o no tienen ICA.

10 En una realización, el o los valores de referencia como se pretende en la presente memoria pueden transmitir cantidades absolutas de MCAM. En otra realización, la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto ensayado se puede determinar directamente con respecto al valor de referencia (p. ej., en términos de aumento o disminución, o número de veces de aumento o número de veces de disminución). Ventajosamente, esto puede permitir comparar la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto con el valor de referencia (en otras palabras, para medir la cantidad relativa de MCAM en la muestra del sujeto frente al valor de referencia) sin necesidad de determinar primero las respectivas cantidades absolutas de MCAM.

15 El nivel de expresión o presencia de un biomarcador en una muestra de un paciente a veces puede fluctuar, es decir, aumentar o disminuir significativamente sin síntomas de cambio (aspecto de empeorar o mejorar). En dicho caso, el cambio del marcador precede al cambio en los síntomas y se hace una medición más sensible que el cambio de síntomas. La intervención terapéutica se puede iniciar antes y ser más eficaz que esperar los síntomas deteriorantes. Los síntomas pueden ser (no limitados a): dificultad para respirar, edema en las extremidades inferiores, palpitaciones cardíacas, fatiga, etc. La intervención temprana en un estado más inicial se puede llevar a cabo de forma segura en casa, lo cual es una mejora importante para tratar pacientes gravemente deteriorados en el servicio de urgencias.

25 La medición del nivel de MCAM del mismo paciente en diferentes tiempos de medición, en dicho caso puede así permitir el seguimiento continuo del estado del paciente y puede llevar a la predicción de empeoramiento o mejora de la afección del paciente con relación a la ICA. Se puede usar un kit o dispositivo de ensayo doméstico o clínico como se indica en la presente memoria, para este seguimiento continuo. Uno o más valores de referencia o intervalos de niveles de MCAM asociados con una determinada enfermedad (p. ej., ICA o ausencia de ICA) para dicho ensayo, se pueden determinar, p. ej., de antemano o durante el proceso de seguimiento a lo largo de un determinado periodo de tiempo en dicho sujeto. Alternativamente, estos valores de referencia o intervalos se pueden establecer mediante conjuntos de datos de varios pacientes con fenotipos de enfermedad muy parecidos, p. ej., de sujetos sanos o sujetos que no tienen ICA. Una desviación repentina de los niveles de MCAM de dichos valor de referencia o intervalo, puede predecir el empeoramiento de la afección del paciente (p. ej., en casa o centro médico) antes de que realmente se puedan sentir u observar los síntomas (a menudo graves).

35 Por lo tanto, esta memoria descriptiva proporciona también un método o algoritmo para determinar un cambio significativo en el nivel del marcador MCAM en un determinado paciente, que es indicativo de cambio (empeoramiento o mejora) del estado clínico. Además, la invención permite establecer el diagnóstico de que el sujeto se está recuperando o se ha recuperado de la afección de ICA.

40 En una realización, los presentes métodos pueden incluir una etapa de establecer dicho o dichos valores de referencia. En una realización, los kits y dispositivos presentes pueden incluir medios para establecer un valor de referencia de la cantidad de MCAM para una predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA. Dichos medios pueden comprender, por ejemplo, una o más muestras (p. ej., muestras separadas o juntas) de uno o más individuos caracterizados por dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA.

45 Los diferentes aspectos y realizaciones enseñados en la presente memoria, pueden implicar además encontrar una desviación o ausencia de desviación entre la cantidad de MCAM medida en una muestra de un sujeto y un valor de referencia dado.

Una "desviación" de un primer valor respecto a un segundo valor puede abarcar en general cualquier dirección (p. ej., aumento: primer valor $>$ segundo valor; o disminución: primer valor $<$ segundo valor) y cualquier extensión de la alteración.

50 Por ejemplo, una desviación puede abarcar una disminución en un primer valor de, sin limitación, al menos aproximadamente 10% (aproximadamente 0,9 veces o menos), o de al menos aproximadamente 20% (aproximadamente 0,8 veces o menos), o de al menos aproximadamente 30% (aproximadamente 0,7 veces o menos), o de al menos aproximadamente 40% (aproximadamente 0,6 veces o menos), o de al menos aproximadamente 50% (aproximadamente 0,5 veces o menos), o de al menos aproximadamente 60% (aproximadamente 0,4 veces o menos), o de al menos aproximadamente 70% (aproximadamente 0,3 veces o menos), o de al menos aproximadamente 80% (aproximadamente 0,2 veces o menos), o de al menos aproximadamente 90% (aproximadamente 0,1 veces o menos), con respecto a un segundo valor con el que se está haciendo la comparación.

Por ejemplo, una desviación puede abarcar un aumento en un primer valor de, sin limitación, al menos

aproximadamente 10% (aproximadamente 1,1 veces o más), o de al menos aproximadamente 20% (aproximadamente 1,2 veces o más), o de al menos aproximadamente 30% (aproximadamente 1,3 veces o más), o de al menos aproximadamente 40% (aproximadamente 1,4 veces o más), o de al menos aproximadamente 50% (aproximadamente 1,5 veces o más), o de al menos aproximadamente 60% (aproximadamente 1,6 veces o más), o de al menos aproximadamente 70% (aproximadamente 1,7 veces o más), o de al menos aproximadamente 80% (aproximadamente 1,8 veces o más), o de al menos aproximadamente 90% (aproximadamente 1,9 veces o más), o de al menos aproximadamente 100% (aproximadamente 2 veces o más), o de al menos aproximadamente 150% (aproximadamente 2,5 veces o más), o de al menos aproximadamente 200% (aproximadamente 3 veces o más), o de al menos aproximadamente 500% (aproximadamente 6 veces o más), o de al menos aproximadamente 700% (aproximadamente 8 veces o más), o similar, con respecto a un segundo valor con el que se está haciendo la comparación.

Preferiblemente, una desviación se puede referir a una alteración observada estadísticamente significativa. Por ejemplo, una desviación se puede referir a una alteración observada que está fuera de los márgenes de error de los valores de referencia en una población dada (expresado, por ejemplo, por la desviación estándar o error estándar o por un múltiplo predeterminado del mismo, p. ej., $\pm 1xDE$ o $\pm 2xDE$, o $\pm 1xDE$ o $\pm 2xEE$). La desviación también puede referirse a un valor que está fuera de un intervalo de referencia definido por valores en una población dada (por ejemplo, fuera de un intervalo que comprende $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 75\%$ o $\geq 80\%$ o $\geq 85\%$ o $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ o incluso $\geq 100\%$ de los valores en dicha población).

En una realización adicional, se puede inferir una desviación si una alteración observada está más allá de un umbral o punto de corte dado. Dicho umbral o punto de corte se puede seleccionar como se conoce en general en la técnica, para proporcionar una sensibilidad y/o especificidad elegidas de los métodos de predicción, diagnóstico y/o pronóstico, p. ej., sensibilidad y/o especificidad de al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95%.

Por ejemplo, en una realización, una cantidad elevada de MCAM en la muestra del sujeto - preferiblemente al menos aproximadamente 1,1 veces elevada, o al menos aproximadamente 1,2 veces elevada, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,3 veces elevada, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 1,4 veces elevada, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 1,5 veces elevada, tal como entre aproximadamente 1,1 veces y 3 veces elevada o entre aproximadamente 1,5 veces y 2 veces elevada - comparada con un valor de referencia que representa la predicción o diagnóstico de ausencia de ICA o que representa un buen pronóstico para la ICA, indica que el sujeto tiene o tiene riesgo de tener ICA o indica un mal pronóstico para la ICA en el sujeto.

Cuando se encuentra una desviación entre la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto y un valor de referencia que representa una determinada predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA, dicha desviación es indicativa o se puede atribuir a la conclusión de que la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA en dicho sujeto es diferente de la representada por el valor de referencia.

Cuando no se encuentra desviación entre la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto y un valor de referencia que representa una determinada predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA, la ausencia de dicha desviación es indicativa o se puede atribuir a la conclusión de que la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA en dicho sujeto es sustancialmente la misma que la representada por el valor de referencia.

Las consideraciones anteriores se aplican de forma análoga a perfiles de biomarcadores.

Cuando se determinan dos o más biomarcadores diferentes en un sujeto, sus respectivas presencia, ausencia y/o cantidad se pueden representar juntas como un perfil de biomarcadores, formando los valores de cada uno de los biomarcadores medidos una parte de dicho perfil. Como se usa en la presente memoria, el término "perfil" incluye cualquier conjunto de datos que representa los distintos aspectos o características asociadas con una afección de interés, tal como con una predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA. El término abarca en general, entre otros perfiles de ácidos nucleicos, tales como por ejemplo perfiles de genotipos (conjuntos de datos genotípicos que representan el genotipo de uno o más genes asociados con una afección de interés), perfiles de número de copias de genes (conjuntos de datos de número de copias de genes que representan la amplificación o eliminación de uno o más genes asociados con una afección de interés), perfiles de expresión de genes (conjuntos de datos de expresión de genes que representan los niveles de ARNm de uno o más genes asociados con una afección de interés), perfiles de metilación de ADN (conjuntos de datos de metilación que representan niveles de metilación de ADN de uno o más genes asociados con una afección de interés), así como perfiles de proteínas, polipéptidos o péptidos, tal como por ejemplo perfiles de expresión de proteínas (conjuntos de datos de expresión de proteínas que representan los niveles de una o más proteínas asociadas con una afección de interés), perfiles de activación de proteínas (conjuntos de datos que representan la activación o inactivación de una o más proteínas asociadas con una afección de interés), perfiles de modificación de proteínas (conjuntos de datos que representan la modificación de una o más proteínas asociadas con una afección de interés), perfiles de escisión de proteínas (conjuntos de datos que representan la escisión proteolítica de una o más proteínas asociadas con una afección de interés), así como cualquier combinación de los mismos.

- Los perfiles de biomarcadores se pueden crear en una serie de formas y pueden ser la combinación de biomarcadores o aspectos de biomarcadores medibles usando métodos tales como proporciones, u otros métodos o algoritmos de asociación más complejos (p. ej., métodos basados en una regla). Un perfil de biomarcador comprende al menos dos mediciones, donde las mediciones pueden corresponder al mismo o diferentes biomarcadores. Un perfil de biomarcador también puede comprender al menos 3, 4, 5, 10, 20, 30 o más mediciones. En una realización, un perfil de biomarcador comprende cientos, o incluso miles de mediciones.
- Por lo tanto, por ejemplo, distintos perfiles de referencia pueden representar la predicción de un riesgo (p. ej., un riesgo anormalmente elevado) de tener ICA frente a la predicción de no tener riesgo o tener riesgo normal de ICA. En otro ejemplo, distintos perfiles de referencia pueden representar predicciones de diferentes grados de riesgo de tener ICA.
- En un ejemplo adicional, distintos perfiles de referencia pueden representar el diagnóstico de ICA frente al diagnóstico de ausencia de ICA (tal como, p. ej., el diagnóstico de salud, recuperación de ICA, etc.). En otro ejemplo, distintos perfiles de referencia pueden representar el diagnóstico de ICA de gravedad variable.
- En otro ejemplo más, distintos perfiles de referencia pueden representar un buen pronóstico para la ICA frente a un mal pronóstico para la ICA. En un ejemplo adicional, diferentes perfiles de referencia pueden representar pronósticos favorables o desfavorables de forma variable para la ICA.
- Los perfiles de referencia, como se usa en la presente invención, se pueden establecer de acuerdo con procedimientos conocidos previamente usados para otros biomarcadores.
- Por ejemplo, un perfil de referencia de la cantidad de MCAM y la presencia, ausencia y/o cantidad de uno o más de otros biomarcadores relacionados con la ICA para una predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA, se puede establecer determinando el perfil en la o las muestras de un individuo o de una población de individuos caracterizados por dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA (es decir, para los que dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA es válida).
- Dicha población puede comprender sin limitación ≥ 2 , ≥ 10 , ≥ 100 , o incluso varios cientos o más individuos.
- Por lo tanto, mediante un ejemplo ilustrativo, se pueden establecer perfiles de referencia para el diagnóstico de ICA frente a la ausencia de ICA, determinando los perfiles en la o las muestras de un individuo o de una población de individuos a los que se ha diagnosticado, respectivamente, que tienen o no tienen ICA.
- En una realización, los presentes métodos pueden incluir una etapa de establecer dicho o dichos perfiles de referencia. En una realización, los presentes kits y dispositivos pueden incluir medios para establecer un perfil de referencia para una predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA. Dichos medios pueden comprender, por ejemplo, una o más muestras (p. ej., muestras separadas o juntas) de uno o más individuos caracterizados por dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de ICA.
- Además, se pueden usar análisis multiparamétricos conocidos en la técnica, cambiando lo que se deba cambiar, para determinar desviaciones entre grupos de valores y perfiles generados a partir de estos (p. ej., entre perfiles de biomarcadores de la muestra y de referencia).
- Cuando se encuentra una desviación entre el perfil de la muestra y un perfil de referencia que representa una determinada predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA, dicha desviación es indicativa o se puede atribuir a la conclusión de que la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA en dicho sujeto es diferente de la representada por el perfil de referencia.
- Cuando no se encuentra desviación entre el perfil de la muestra y un perfil de referencia que representa una determinada predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA, la ausencia de dicha desviación es indicativa o se puede atribuir a la conclusión de que la predicción, diagnóstico y/o pronóstico de ICA en dicho sujeto es sustancialmente la misma que la representada por el perfil de referencia.
- La presente descripción proporciona kits o dispositivos para el diagnóstico de insuficiencia cardiaca, más en particular de insuficiencia cardiaca aguda, que comprenden medios para detectar el nivel del marcador MCAM en una muestra del paciente. En una realización más preferida, dicho kit o kits de la descripción se pueden usar en marcos clínicos o en casa. El kit de acuerdo con la descripción se puede usar para diagnosticar la insuficiencia cardiaca aguda, para el seguimiento de la eficacia del tratamiento de un sujeto que padece ICA con un agente, o para el cribado de sujetos para la prevención de la aparición de ICA en dicho sujeto.
- En un marco clínico, el kit o dispositivo puede estar en forma de un dispositivo clínico o en un marco de equipo de urgencias, p. ej., como parte del equipamiento de una ambulancia u otro vehículo de urgencias móvil o equipamiento de equipo o como parte de un kit de primeros auxilios. El kit o dispositivo de diagnóstico puede ayudar a un médico, auxiliar de primeros auxilios o enfermera a decidir si el paciente que está en observación está desarrollando una insuficiencia cardiaca aguda, después de lo cual se puede llevar a cabo la acción o tratamiento adecuados.

Un kit de ensayo doméstico da al paciente una lectura que puede comunicar a un médico, un auxiliar de primeros auxilios o al servicio de urgencias de un hospital, después de lo cual se puede realizar la acción adecuada. Dicho dispositivo de ensayo doméstico tiene un interés particular para gente que tiene antecedentes de, o tienen riesgo de padecer insuficiencia cardiaca (p. ej., pacientes con insuficiencia cardiaca crónica) o que tienen antecedentes o tienen riesgo de padecer disnea (dificultad para respirar), que puede estar causada, p. ej., por insuficiencia cardiaca aguda, infecciones, problemas pulmonares, septicemia, etc. Dichos sujetos con un riesgo alto de insuficiencia cardiaca o que tienen antecedentes de disnea podrían realmente beneficiarse de tener en casa un dispositivo o kit de ensayo doméstico de acuerdo con la invención, porque entonces pueden distinguir fácilmente entre un suceso de insuficiencia cardiaca aguda y otro suceso que cause disnea, dando lugar a una forma más fácil de determinar las acciones que deben tomarse para resolver el problema.

Los kits o dispositivos típicos de acuerdo con la descripción comprenden los siguientes elementos:

- a) un medio para obtener una muestra del sujeto
- b) un medio o dispositivo para medir la cantidad del marcador MCAM en dicha muestra y visualizar si la cantidad del marcador MCAM en dicha muestra está por debajo o por encima de un determinado nivel o valor umbral, que indica si el sujeto padece o no insuficiencia cardiaca aguda.

En cualquiera de las realizaciones de la invención, los kits o dispositivos pueden comprender además, c) medios para comunicar directamente con un médico, un servicio de urgencias del hospital o un puesto de primeros auxilios, que indique que una persona está sufriendo o no una insuficiencia cardiaca aguda.

La expresión “nivel o valor umbral” o “valor de referencia” se usa de forma intercambiable como un sinónimo y es como se define en la presente memoria. También puede ser un intervalo de valores base (p. ej., “peso en seco”) determinado en un paciente individual o en un grupo de pacientes con afecciones muy similares.

En cualquiera de las realizaciones de la descripción, el dispositivo o kit o kits de la descripción pueden comprender además medios para detectar el nivel de un marcador adicional para la insuficiencia cardiaca o la insuficiencia cardiaca aguda en la muestra de dicho paciente. Marcadores adicionales podrían ser, por ejemplo, el BNP o NT-pro-BNP o fragmentos de BNP o NT-pro-BNP.

Se puede usar cualquiera de los kits definidos en la presente memoria como un dispositivo clínico para que use el propio sujeto o un médico.

En dicho kit de la descripción, el medio para obtener una muestra del sujeto (a) puede ser cualquier medio para obtener una muestra de dicho sujeto, conocido en la técnica. Los ejemplos para obtener, p. ej., una muestra de sangre, son conocidos en la técnica y podría ser cualquier tipo de dispositivo basado en lanceta o pinchazo en el dedo o piel, que básicamente perfora la piel y produce una gota de sangre que es liberada de la piel. Cuando se usa una muestra de orina, el medio para obtener una muestra del sujeto puede ser en forma de una tira absorbente tal como las usadas en las pruebas de embarazo domésticas conocidas en la técnica. De forma análoga, una muestra de saliva se podría obtener usando una torunda en soporte conocida en la técnica. Los ejemplos de dispositivos de toma de muestra de sangre u otros dispositivos de toma de muestra se dan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 4.802.493, 4.966.159, 5.099.857, 6.095.988, 5.944.671, 4.553.541, 3.760.809, 5.395.388, 5.212.879, 5.630.828, 5.133.730, 4.653.513, 5.368.047, 5.569.287, 4.360.016, 5.413.006 y solicitudes de patente de EE.UU. n° 2002/111565, 2004/0096959, 2005/143713, 2005/137525, 2003/0153900, 2003/0088191, WO9955232, WO2005/049107, WO2004/060163, WO02/056751, WO02/100254, WO2003/022330, WO2004/066822, WO97/46157, WO2004/039429, o EP0364621, EP0078724, EP1212138, EP0081975, o EP0292928.

En dicho kit de la descripción, el medio o dispositivo para medir la cantidad del marcador MCAM en dicha muestra (b) puede ser cualquier medio o dispositivo que pueda detectar específicamente la cantidad de la proteína MCAM en la muestra. Los ejemplos son sistemas que comprenden moléculas de unión específicas a MCAM unidas a una fase sólida, p. ej., dispositivos de tiras o varillas de flujo lateral y similares, bien conocidos en la técnica. Un ejemplo no limitante para realizar un ensayo bioquímico es usar una tira de ensayo y anticuerpos marcados, cuya combinación no requiera ningún lavado de la membrana. La tira de ensayo es bien conocida, por ejemplo, en el campo de los kits de prueba de embarazo donde un anticuerpo anti-hCG está presente sobre el soporte, y es transportado en complejo con la hCG por el flujo de orina a un segundo anticuerpo inmovilizado que permite la visualización. Otros ejemplos no limitantes de dichos dispositivos, sistemas o kits de ensayo domésticos se puede encontrar, por ejemplo, en las siguientes patentes de EE.UU.: 6.107.045, US6.974.706, 5.108.889, 6.027.944, 6.482.156, 6.511.814, 5.824.268, 5.726.010, 6.001.658 o solicitudes de patente de EE.UU.: 2008/0090305 o 2003/0109067.

En una realización preferida, la descripción proporciona un dispositivo o varilla de flujo lateral. Dicha varilla comprende una tira de ensayo que permite la migración de una muestra por flujo capilar desde un extremo de la tira donde se aplica la muestra al otro extremo de dicha tira, donde se mide la presencia de un analito en dicha muestra.

En otra realización, la descripción proporciona un dispositivo que comprende una tira de reactivos. Dicha tira de reactivos comprende una o más almohadillas de ensayo que cuando se humedecen con la muestra, proporcionan un cambio de color en la presencia de un analito y/o indican la concentración de la proteína en dicha muestra.

En una realización preferida del kit de la descripción, el medio o dispositivo (1) para medir la cantidad de proteína en una muestra (b), es un soporte sólido (7) que tiene un extremo proximal (2) y distal (3) que comprende:

- una zona de aplicación de la muestra (4) en la cercanía del extremo proximal,
- una zona de reacción (5) distal a la zona de aplicación de la muestra (4), y

5 - una zona de detección (6) distal a la zona de reacción (5),

por el cual dicho soporte tiene una propiedad capilar que dirige un flujo de la muestra fluida aplicada en la zona de aplicación, en una dirección desde el extremo proximal al extremo distal,

- opcionalmente, el medio o dispositivo también comprende una fuente de fluido, p. ej., en un envase, pipeta cuentagotas o vial, que permite que muestras viscosas fluyan más fácilmente a través de la tira.

10 La zona de reacción (5) comprende una o más bandas (10) de molécula de unión a MCAM conjugada con un agente de detección (p. ej., oro coloidal), cuyo conjugado de molécula de unión a MCAM está dispuesto sobre el soporte sólido de modo que puede migrar con el flujo capilar de fluido, es decir, no está inmovilizado. La zona de detección (6) comprende una o más bandas de captura (11) que comprenden una población de moléculas de unión a MCAM inmovilizadas sobre el soporte sólido.

15 Cuando se aplica una muestra en la zona de aplicación de la muestra (4), migra hacia la zona de reacción (5) por flujo capilar. Cualquier MCAM presente en la muestra reacciona con el conjugado de molécula de unión a MCAM marcada, y el complejo así formado es transportado por flujo capilar a la zona de detección (6). La zona de detección (6), que tiene las moléculas de unión a MCAM permanentemente inmovilizadas en la misma, captura e inmoviliza cualquier complejo, produciendo una concentración localizada de conjugado que se puede visualizar.

20 Las dos zonas (5 y 6) como se describen en la presente memoria (una zona con los conjugados no fijados y una zona con los anticuerpos de captura fijados) en general no se superponen. Pueden estar dispuestas de forma adyacente con ausencia o presencia de un hueco intermedio del soporte sólido que carece de banda. Una banda puede estar dispuesta sobre un soporte sólido por cualquier medio, por ejemplo, absorbida, adsorbida, en recubrimiento, unida covalentemente o secada, dependiendo de si es necesario que el reactivo se movilice o no.

25 Con el fin de obtener una tira de ensayo semicuantitativa en la que solo se forme una señal una vez que el nivel de proteína MCAM en la muestra es mayor que un determinado nivel o valor umbral predeterminado, la zona de reacción (5) que comprende las moléculas de unión a MCAM conjugadas no fijadas, podría comprender también una cantidad predeterminada de anticuerpos de captura de MCAM fijados. Esto permite capturar una determinada cantidad de proteína MCAM presente en la muestra, que corresponde al nivel o valor umbral predeterminado. La cantidad restante de proteína MCAM (si hay) unida por el conjugado o moléculas de unión marcadas después se puede dejar que migren a la zona de detección (6). En este caso, la zona de reacción (6) solo recibirá complejos de molécula de unión marcada-MCAM y posteriormente solo produce una señal si el nivel de la proteína MCAM en la muestra es mayor que el nivel o valor umbral predeterminado.

35 Otra posibilidad para determinar si la cantidad de la proteína MCAM en la muestra está por debajo o por encima de un determinado nivel o valor umbral, es usar un anticuerpo de captura primario que captura toda la proteína MCAM presente en la muestra, en combinación con un anticuerpo secundario marcado, que desarrolla una determinada señal o color cuando está unido a la fase sólida. La intensidad del color o señal después se puede comparar con un cuadro de colores o señales de referencia que indica que cuando la intensidad de la señal está por encima de una determinada señal umbral, la prueba es positiva (es decir, la ICA es inminente). Alternativamente, la cantidad o intensidad del color o señal se pueden medir con un dispositivo electrónico que comprende, p. ej., un detector de absorbancia de luz o medidor de emisión de luz, que produce un valor numérico de intensidad de señal o absorbancia de color formada, que después se puede presentar al sujeto en forma de un resultado negativo si dicho valor numérico está por debajo del valor umbral o un resultado positivo si dicho valor numérico está por encima del valor umbral.

45 Esta realización es de particular relevancia en el seguimiento del nivel de MCAM en un paciente a lo largo de un periodo de tiempo.

El valor de referencia o intervalo se puede, p. ej., determinar usando el dispositivo doméstico en un periodo en el que el sujeto no tiene ICA, dando al paciente una indicación de su nivel base de MCAM. Por lo tanto, el uso regular del dispositivo doméstico permitirá que el sujeto note un cambio repentino en los niveles de MCAM comparado con el nivel base, lo cual le puede permitir contactar con un médico.

50 Alternativamente, se puede determinar el valor de referencia en el sujeto que padece ICA, el cual indica entonces su "nivel de riesgo" de MCAM personal, es decir, el nivel de MCAM que indica que está expuesto o que pronto estará expuesto a un suceso de ICA. El nivel de riesgo es interesante para el seguimiento del progreso de la enfermedad o para evaluar el efecto del tratamiento. La reducción del nivel de MCAM comparado con el nivel de riesgo indica que la afección del paciente está mejorando.

55

Además, el valor o nivel de referencia se puede establecer por resultados de mediciones combinadas en sujetos con estados patológicos o fenotipos muy similares (p. ej., todos en estado de ausencia de ICA o todos en estado de ICA).

5 Los ejemplos no limitantes de dichos pruebas semicuantitativas conocidas en la técnica, cuyo principio se podría usar para el dispositivo de ensayo doméstico de acuerdo con la presente descripción, son la prueba de VIH/SIDA o pruebas de cáncer de próstata vendidos por Sanitoets. La prueba de próstata doméstica es una prueba rápida dirigida a un ensayo inicial semicuantitativo para detectar niveles de PSA en la sangre mayores que 4 ng/ml en la sangre entera. El kit de autodiagnóstico doméstico típico comprende los siguientes componentes: un dispositivo de enayo al que se va a administrar la muestra de sangre y que produce una señal cuando el nivel de proteína está por encima de un determinado nivel umbral, una cantidad de diluyente, p. ej., en una pipeta cuentagotas para ayudar a la transferencia de los analitos (es decir, la proteína de interés) desde la zona de aplicación a la zona de detección de la señal, opcionalmente una pipeta vacía para recoger la muestra de sangre, un dispositivo de punción del dedo, opcionalmente torunda estéril para limpiar la zona de la punción, e instrucciones para usar el kit.

15 También se conocen ensayos similares, p. ej., para la detección del cáncer de mama y detección del nivel de proteína CRP en el aspecto los ensayos domésticos de riesgo cardiaco. La última prueba abarca enviar el resultado de la prueba a un laboratorio, donde el resultado es interpretado por un técnico o médico experto. Dicho diagnóstico basado en teléfono o internet de la afección del paciente, por supuesto es posible y aconsejable con la mayoría de los kits, puesto que la interpretación del resultado del ensayo a menudo es más importante que realizar el ensayo. Cuando se usa un dispositivo electrónico como se ha mencionado antes que da un valor numérico del nivel de proteína presente en la muestra, este valor, por supuesto, se puede comunicar fácilmente por teléfono, teléfono móvil, teléfono satelital, correo electrónico, internet u otros medios de comunicación, que avisan a un hospital, un médico o un equipo de primeros auxilios que una persona está sufriendo una insuficiencia cardiaca aguda. Un ejemplo no limitante de dicho sistema se describe en la patente de EE.UU. 6.482.156.

25 En la siguiente descripción se hace referencia a los dibujos en los que se ilustran realizaciones particulares de la descripción; no se pretende que sean en absoluto limitantes. El experto puede adaptar el dispositivo y sustituir componentes y características de acuerdo con las prácticas comunes del experto en la técnica.

30 Las figuras 6A y B muestran una realización preferida de una tira de ensayo de la descripción. La tira (1) incluye un extremo proximal (2) y un extremo distal (3). Se proporciona una zona de aplicación de la muestra (4) en el extremo proximal (2), una zona de reacción (5) está adyacente a la misma y una zona de detección (6) está en la cercanía del extremo distal (3). Se puede depositar una muestra sobre el soporte sólido (7) en la zona de aplicación (4) para la transferencia por acción capilar a la zona de detección (6). Se puede proporcionar una capa protectora (8) que cubre cualquiera o ambas superficies del soporte sólido (7), excepto una región de la zona de aplicación de la muestra (4). Dicha capa protectora protege la muestra y constituyentes químicos de la tira de la contaminación y evaporación. Una o más almohadillas absorbentes (9) en contacto capilar con la zona de aplicación de la muestra (4) del soporte sólido (7) pueden absorber y liberar muestra según sea necesario; dicha almohadilla (9) típicamente está colocada en la superficie del soporte sólido (7) que es la misma o la opuesta a la zona de aplicación de la muestra (4). En la figura 5B, la almohadilla absorbente (9) es parte de la zona de aplicación de la muestra (4). Una o más de las almohadillas absorbentes (9') se pueden poner en contacto capilar con la zona de detección (6) del soporte sólido (7), distal a cualquiera de las bandas de captura (11), (14). Estas almohadillas (9') pueden absorber fluido que ha pasado por el soporte sólido; dicha almohadilla (9') típicamente está colocada en la superficie del soporte sólido (7) que es la misma u opuesta a la zona de aplicación de la muestra (4). El soporte sólido (7) puede estar hecho de cualquier material adecuado que tenga una propiedad de acción capilar, y puede tener las mismas propiedades descritas antes. Debería ser capaz también de soportar una sustancia (p. ej., una molécula de unión a MCAM no inmovilizada), que cuando se hidrata, puede migrar a través del soporte sólido por un flujo de fluido de acción capilar.

45 El soporte sólido (7) también puede comprender una banda de conjugado de molécula de unión a MCAM (10), situada en la zona de reacción (5), en una posición distal a la zona de aplicación de la muestra (4). Cualquier MCAM en la muestra es transportada por acción capilar hacia esta banda (10), donde reacciona con el conjugado de molécula de unión a MCAM inmovilizado de forma permanente.

50 El conjugado de molécula de unión a MCAM puede estar asociado con o unido a un agente de detección para facilitar la detección. Los ejemplos de agentes de detección de laboratorio incluyen, pero no se limitan a marcadores luminiscentes; marcadores colorimétricos, tales como colorantes; marcadores fluorescentes; o marcadores químicos, tales como agente electroactivos (p. ej., ferrocianuro); enzimas, marcadores radiactivos; o marcadores de radiofrecuencia. Más habitualmente, el agente de detección es una partícula. Los ejemplos de partículas útiles en la práctica de la descripción incluyen, pero no se limitan a partículas coloidales de oro; partículas coloidales de azufre; partículas coloidales de selenio; partículas coloidales de sulfato de bario; partículas coloidales de sulfato de hierro; partículas de yodato metálico; partículas de haluro de plata; partículas de sílice; partículas coloidales de óxido metálico (hidrato); partículas coloidales de sulfuro metálico; partículas coloidales de selenuro de plomo; partículas coloidales de selenuro de cadmio; partículas coloidales de fosfato metálico; partículas coloidales de ferrito metálico; cualquiera de las partículas coloidales mencionadas antes recubiertas con capas orgánicas o inorgánicas; moléculas de proteínas o péptidos; liposomas; o partículas de látex de polímero orgánico, tales como perlas de látex de

poliestireno. Las partículas preferidas son partículas coloidales de oro. El oro coloidal se puede hacer por cualquier medio convencional, tal como los métodos indicados en G. Frens, 1973 *Nature Physical Science*, 241:20 (1973). Métodos alternativos pueden estar descritos en las patentes de EE.UU. n° 5.578.577. 5.141.850; 4.775.636; 4.853.335; 4.859.612; 5.079.172; 5.202.267; 5.514.602; 5.616.467; 5.681.775.

5 El soporte sólido (7) además comprende una o más bandas de captura (11) en la zona de detección (6). Una banda de captura comprende una población de moléculas de unión a MCAM inmovilizadas de forma permanente sobre el mismo. El complejo de MCAM:conjugado de molécula de unión a MCAM formado en la zona de reacción (5) migra hacia la zona de detección (6) donde dicha banda (11) captura el complejo que migra y lo concentra, permitiendo que sea visualizado a simple vista o usando una máquina lectora. La molécula de unión a MCAM presente en la
10 zona de reacción (5) y en la zona de detección (6) puede reaccionar con la misma parte de MCAM o puede reaccionar con diferentes partes de MCAM.

Pueden estar presentes una o más bandas de control (12) sobre el soporte sólido (7). Por ejemplo, puede estar presente un péptido no inmovilizado (12) en la zona de aplicación de la muestra (4), cuyo péptido no tiene reacción cruzada con ninguna de las bandas de la molécula de unión a MCAM (13) o (14). Cuando se aplica la muestra, migra hacia la zona de reacción (5), donde está dispuesto un conjugado de anticuerpo antipéptido y donde se forma un complejo péptido-anticuerpo. Dicho complejo migra hacia la zona de detección (6), donde una banda de captura (14) del anticuerpo antipéptido está inmovilizada sobre el soporte sólido, y que concentra dicho complejo permitiendo la visualización. La banda de captura de control (14) está situada por separado de la banda de captura de MCAM (11), por lo tanto, se puede ver una reacción positiva distinta de la reacción de detección si el ensayo está
15 funcionando correctamente.
20

Una ventaja particular de un control de acuerdo con la descripción, es que son controles internos, es decir, el control frente al que se pueden comparar los resultados de la medición de MCAM está presente en el soporte sólido individual. Por lo tanto, los controles de acuerdo con la descripción se pueden usar para corregir la variabilidad en el soporte sólido, por ejemplo. Dicha corrección sería impracticable con controles externos que se basan, por ejemplo,
25 en un muestreo estadístico de soportes. Además, se pueden minimizar las variaciones de un lote a otro y de un experimento a otro, usando los agentes de unión de control y agentes de control de acuerdo con la descripción. Además, se pueden reducir los efectos de la unión no específica. Todas estas correcciones serían difíciles de realizar usando controles externos, fuera del soporte.

Durante el ensayo, la MCAM de la muestra y el conjugado de molécula de unión a MCAM se combinan y concentran sobre el soporte sólido (7). Esta combinación produce una concentración de los compuestos que se pueden visualizar por encima del color de fondo del soporte sólido (7). Los compuestos se pueden formar a partir de una combinación de los compuestos mencionados antes, que incluyen anticuerpos, agentes de detección y otras partículas asociadas con las zonas de reacción y de detección. Basándose en el ensayo particular que se lleva a cabo, las zonas de reacción y detección se pueden implementar selectivamente para lograr un intervalo dinámico
30 adecuado que puede ser lineal o no lineal.
35

Un soporte sólido (7) para realizar el ensayo puede estar albergado dentro de un cartucho (20) como se muestra, por ejemplo, en la figura 6. El cartucho preferiblemente es estanco frente a la orina, salvo por una o más aberturas. El soporte sólido (7) puede estar expuesto por una abertura (21) en el cartucho para proporcionar una zona de aplicación (4) en el extremo proximal (2), y otra abertura (22) para permitir la lectura de la zona de detección (6) cerca del extremo distal (3). El cartucho (20) puede incluir un código detector (23) para comunicar con un dispositivo de lectura.
40

La presencia y/o concentración de MCAM en una muestra se puede medir por resonancia de plasmón de superficie (SPR) usando un chip que tiene molécula de unión a MCAM inmovilizada sobre el mismo, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET), atenuación de fluorescencia, medición de polarización de fluorescencia u otros medios conocidos en la técnica. Cualquiera de los ensayos de unión descritos se puede usar para determinar la presencia y/o concentración de MCAM en una muestra. Para hacer esto, la molécula de unión a MCAM se hace reaccionar con una muestra, y la concentración de MCAM se mide según sea adecuado, para el ensayo de unión que se está usando. Para validar y calibrar un ensayo, se pueden llevar a cabo reacciones de control que usan diferentes concentraciones de MCAM y/o molécula de unión a MCAM patrón. Cuando se usan ensayos en fase sólida, después de incubación, se lleva a cabo una etapa de lavado para eliminar la MCAM no unida. La MCAM unida se mide según sea adecuado para el marcador dado (p. ej., recuento de centelleo, fluorescencia, anticuerpo-colorante etc.). Si se desea un resultado cuantitativo, pueden no ser necesarios los controles y diferentes concentraciones. Por supuesto se pueden cambiar las funciones de la MCAM y molécula de unión a MCAM; el experto en la técnica puede adaptar el método de modo que se aplique la molécula de unión a MCAM a la muestra, en diferentes concentraciones de muestra.
45
50
55

Una molécula de unión a MCAM de acuerdo con la descripción es cualquier sustancia que se une específicamente a la MCAM. Los ejemplos de una molécula de unión a MCAM útil de acuerdo con la presente descripción, incluyen, pero no se limitan a un anticuerpo, un polipéptido, un péptido, un lípido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico, un péptido-ácido nucleico, molécula pequeña, molécula orgánica pequeña, u otro candidato a fármaco. Una molécula de unión a MCAM puede ser un compuesto natural o sintético, que incluye, por ejemplo, molécula pequeña sintética,
60

compuesto contenido en extractos de células animales, vegetales, bacterianas o fúngicas, así como medio condicionado de dichas células. Alternativamente, la molécula de unión a MCAM puede ser una proteína genéticamente modificada que tiene sitios de unión para la MCAM. De acuerdo con un aspecto de la descripción, una molécula de unión a MCAM se une específicamente a la MCAM con una afinidad mejor que 10^6 M. Una molécula de unión a MCAM adecuada se puede determinar a partir de su unión con una muestra patrón de MCAM. Los métodos para determinar la unión entre la molécula de unión a MCAM y la MCAM son conocidos en la técnica. Como se usa en la presente memoria, el término anticuerpo incluye, pero no se limita a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos genéticamente modificados, y fragmentos de anticuerpo biológicamente funcionales (p. ej., scFv, Nanobodies, Fv, etc.) suficientes para la unión del fragmento de anticuerpo a la proteína. Dicho anticuerpo puede estar disponible en el comercio contra la MCAM, tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón, rata, humano o humanizado.

En una realización preferida, la molécula o agente de unión es capaz de unirse tanto a la proteína MCAM madura unidad a membrana o a célula o como al fragmento. En una realización más preferida, el agente o molécula de unión se une específicamente o se detecta la forma soluble, preferiblemente la forma de MCAM circulante plasmática, como se define en la presente memoria.

De acuerdo con un aspecto de la descripción, la molécula de unión a MCAM está marcada con un marcador que permite la detección con otro agente (p. ej., con una pareja de unión a sonda). Dichos marcadores pueden ser, por ejemplo, biotina, estreptavidina, marcador his, marcador myc, maltosa, proteína de unión a maltosa o cualquier otro tipo de marcador conocido en la técnica que tenga una pareja de unión. El ejemplo de asociaciones que se pueden usar en la disposición de detector:pareja de unión puede ser cualquiera, e incluye por ejemplo, biotina:estreptavidina, marcador de his:ion metálico (p. ej., Ni^{2+}), maltosa:proteína de unión a maltosa.

En otra realización, la descripción proporciona una tira reactiva colorimétrica simple y precisa y el método para medir la presencia de MCAM en una muestra. Más en particular, la presente descripción también se refiere a un dispositivo que comprende una tira reactiva. La presente tira reactiva comprende un soporte sólido que se proporciona con al menos una almohadilla de ensayo para medir la presencia de MCAM en una muestra. Dicha almohadilla de ensayo preferiblemente comprende una matriz vehículo que incorpora una composición de reactivos capaz de interactuar con la MCAM para producir una respuesta medible, preferiblemente una respuesta medible visualmente o mediante un instrumento. La tira reactiva puede estar fabricada en cualquier tamaño y forma, pero en general la tira reactiva es más larga que ancha. El soporte sólido puede estar compuesto de cualquier material adecuado y preferiblemente está hecho de material firme o rígido tal como acetato de celulosa, poli(tereftalato de etileno), polipropileno, policarbonato o poliestireno. En general, la matriz vehículo es un material absorbente que permite que la muestra de orina se mueva, en respuesta a fuerzas capilares, a través de la matriz vehículo para ponerse en contacto con la composición de reactivos y producir una transición de color detectable o medible. La matriz vehículo puede ser cualquier sustancia capaz de incorporar los reactivos químicos necesarios para llevar a cabo el ensayo de interés, con la condición de que la matriz vehículo sea sustancialmente inerte con respecto a los reactivos químicos, y sea porosa o absorbente con respecto a los componentes solubles de la muestra de ensayo líquida. La expresión "matriz vehículo" se refiere a matrices absorbentes o no absorbentes que son insolubles en agua y otros líquidos fisiológicos y mantienen su integridad estructural cuando se exponen a agua y otros líquidos fisiológicos. Las matrices absorbentes adecuadas incluyen papel de filtro, materiales de esponja, celulosa, madera, telas tejidas y no tejidas y similares. Las matrices no absorbentes incluyen fibra de vidrio, películas polímeras y membranas preformadas o microporosas. Otras matrices vehículo adecuadas incluyen polvos inorgánicos hidrófilos tales como gel de sílice, alúmina, tierra de diatomeas y similares; sustancias arcillosas; tela; materiales polímeros naturales hidrófilos, en particular material de celulosa, como perlas celulósicas, y en especial papeles que contienen fibra tales como papel de filtro o papel cromatográfico; polímeros que se encuentran de forma natural sintéticos o modificados, tales como gelatina reticulada, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida, celulosa, poli(alcohol vinílico), polisulfonas, poliésteres, poli(acrilatos, poliuretanos, dextrano reticulado, agarosa, y otros de dichos polímeros hidrófilos insolubles en agua reticulados y no reticulados. Las sustancias hidrófobas y no absorbentes no son adecuadas para usar como la matriz vehículo de la presente descripción. Las matrices vehículo pueden ser de diferentes composiciones químicas o una mezcla de composiciones químicas. Las matrices también pueden variar en cuanto a la lisura o rugosidad combinado con la dureza y blandura. Sin embargo, en cada caso la matriz vehículo comprende un material hidrófilo o absorbente. La matriz vehículo está construida lo más ventajosamente de papel de filtro absorbente o películas polímeras no absorbentes. Una matriz vehículo preferida es una matriz absorbente, hidrófila, que incluye materiales celulósicos, tales como papel, y preferiblemente papel de filtro o una matriz no absorbente, que incluye películas polímeras, tales como un poliuretano o una gelatina reticulada. Una composición de reactivos que produce un cambio colorimétrico cuando se hace reaccionar con MCAM en una muestra, se puede incorporar homogéneamente en la matriz vehículo, y la matriz vehículo contiene entonces la composición de reactivos homogéneamente por toda la matriz vehículo, mientras que mantiene la penetrabilidad de la matriz vehículo por el componente predeterminado de la muestra de ensayo. Los ejemplos de composiciones de reactivos adecuadas pueden incluir, por ejemplo, una molécula de unión a MCAM en el caso de una técnica basada en anticuerpo, o tampón de pH en el caso de detección enzimática. La composición de reactivos preferiblemente se seca y estabiliza sobre una almohadilla de ensayo adherida a al menos un extremo de un soporte sólido. La almohadilla de ensayo sobre la que se absorbe y seca la composición de reactivos, está hecha preferiblemente de un material de membrana que muestra un color de fondo mínimo. Preferiblemente, la almohadilla de ensayo puede

5 estar construida de materiales lavados con ácido o base, con el fin de minimizar el color de fondo. En otra realización, la composición de reactivos que se seca sobre la tira reactiva comprende además agentes humectantes para reducir la fragilidad de la almohadilla de ensayo. Los ejemplos no limitantes de agentes humectantes preferidos incluyen Triton X-100, Bioterg, glicerol, O Tween, y similares. La composición de reactivos se puede aplicar a la tira reactiva por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la matriz vehículo a partir de la cual están hechas las almohadillas de ensayo, se puede sumergir en una solución de la composición de reactivos y secar de acuerdo con técnicas conocidas en la materia. Una tira reactiva de acuerdo con la descripción se puede proporcionar con múltiples almohadillas de ensayo para ensayar más de un analito en una muestra de orina. Se puede proporcionar una tira reactiva que comprende un soporte sólido provista de una o más almohadillas de ensayo que incluyen almohadillas de ensayo para medir la presencia de uno o más analitos seleccionados del grupo que comprende proteínas tales como marcadores de ICA, BNP, NT-pro-BNP o fragmentos de los mismos, sangre, leucocitos, nitrito, glucosa, cetonas, creatinina, albúmina, bilirrubina, urobilinógeno y/o una almohadilla de ensayo de pH, y/o una almohadilla de ensayo para medir la gravedad específica.

15 Una posible realización de una tira reactiva 101 de acuerdo con la descripción se representa esquemáticamente en la figura 8 A-B. La tira 101 incluye un extremo proximal 102 y un extremo distal 103. Se proporcionan diferentes almohadillas de ensayo 109, 109', 109" sobre las que se proporcionan las composiciones de reactivos en el extremo proximal 102 sobre el soporte sólido 107 de la tira reactiva. La tira debe estar diseñada de modo que se pueda humectar con una cantidad de muestra suficientemente grande, opcionalmente diluida por un líquido fisiológico que mejore el flujo capilar de una muestra viscosa tal como sangre o saliva y similares.

20 Una tira reactiva como se define en la presente memoria, se usa como sigue. Brevemente, una o más zonas de la almohadilla de ensayo de la tira reactiva de la descripción se sumergen en una muestra o se aplica una pequeña cantidad de muestra a la tira reactiva sobre la o las zonas de la almohadilla de ensayo. Se produce un desarrollo de color que se puede analizar visualmente o por reflectometría en la tira reactiva en un espacio de tiempo corto, normalmente en el espacio de 0,5 a 10 minutos. El cambio de color de la zona de reactivo sobre la almohadilla de ensayo tras la reacción con MCAM preferiblemente es directamente proporcional a la concentración de MCAM en la muestra del paciente. La intensidad de color que se desarrolla en la almohadilla de ensayo se puede determinar visualmente o por un lector basado en la reflectancia, por ejemplo. El desarrollo de color y la o las zonas de la almohadilla de ensayo se comparan con un color o colores de referencia para determinar una estimación de la cantidad de MCAM presente en la muestra. La intensidad de color que se desarrolla en la almohadilla de ensayo se compara con al menos uno, y preferiblemente al menos dos tonos de color estándar que corresponden a un intervalo de concentración de MCAM determinada por aplicación de un factor de corrección.

La tira reactiva puede comprender además un colorante fluorescente o infrarrojo, aplicado a la tira soporte o incorporada en una almohadilla de ensayo, que asegura el alineamiento adecuado de la tira reactiva en un aparato que tiene un sistema de detección para la respuesta detectable o medible.

35 En otra realización, la descripción se refiere también a una almohadilla de ensayo para medir la presencia de MCAM en una muestra. Preferiblemente, dicha almohadilla de ensayo comprende una matriz vehículo que incorpora una composición de reactivos capaz de interactuar con la MCAM para producir una respuesta medible, preferiblemente una respuesta medible visualmente o mediante un instrumento. En otra realización preferida, la descripción proporciona una almohadilla de ensayo según se define en la presente memoria para usar en una tira reactiva, preferiblemente en una tira reactiva como se define en la presente memoria.

40 Los agentes de unión específicos, péptidos, polipéptidos, proteínas, biomarcadores etc. en los presentes kits, pueden estar en diferentes formas, p. ej., liofilizados, libres en solución o inmovilizados en una fase sólida. Se pueden proporcionar, p.ej., en una placa de multipocillos o como una matriz o micromatriz, o se pueden envasar por separado y/o individualmente. Se pueden marcar de forma adecuada como se enseña en la presente memoria. Dichos kits pueden ser particularmente adecuados para llevar a cabo los métodos de ensayo de la descripción, tales como, p. ej., inmunoensayos, ensayos ELISA, ensayos de espectrometría de masas, y similares.

Los aspectos y realizaciones anteriores se apoyan mejor mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

50 Ejemplo 1: Cuantificación de proteínas dirigida por MASSterclass para la validación temprana de marcadores candidatos derivados del descubrimiento

Configuración experimental de MASSterclass

55 Los ensayos de MASSterclass usan espectrometría de masas en tándem dirigida con dilución de isótopos estable como un sistema de cuantificación de péptidos de etapa final (llamado también Monitorización de Reacción Múltiple (MRM) y Monitorización de Reacción Seleccionada (SRM)). El péptido diana es específico (es decir, proteotípico) para la proteína específica de interés, es decir, la cantidad de péptido medida está directamente relacionada con la cantidad de proteína en la muestra original. Para alcanzar la especificidad y sensibilidad necesarias para la cuantificación de biomarcadores en muestras complejas, preceden fraccionamientos de péptidos a la etapa de cuantificación final.

Un ensayo MASterclass adecuado puede incluir las siguientes etapas:

- Muestra de plasma/suero
 - Reducción de albúmina humana e IgG (reducción de complejidad en el nivel de proteínas) usando captura de afinidad con anticuerpos anti-albúmina y anti-IgG usando columnas centrífugas ProteoPre (Sigma Aldrich)
 - 5 - Adición de cantidades conocidas de péptidos con marcaje isotópico. Este péptido tiene la misma secuencia de aminoácidos que el péptido proteotípico de interés, típicamente con un aminoácido con marcaje isotópico incorporado en el mismo para generar una diferencia de masa. Durante el procedimiento entero, el péptido marcado tiene idéntico comportamiento químico y cromatográfico que el péptido endógeno, excepto durante la etapa de cuantificación de etapa final que se basa en la masa molecular.
 - 10 - Digestión triptica. Las proteínas en la muestra de suero/plasma reducida se digieren en péptidos usando tripsina. Esta enzima escinde proteínas de forma C-terminal desde lisina y arginina, excepto cuando está presente una prolina C-terminal de la lisina o arginina. Antes de la digestión, las proteínas se desnaturalizan por ebullición, que vuelve a la molécula de proteína más accesible para la actividad de la tripsina durante las 16 h de incubación a 37°C.
 - 15 - Primer fraccionamiento basado en péptidos: La electroforesis de flujo libre (FFE; BD Diagnostic) es una técnica de separación de fluidos sin gel, en la que moléculas cargadas que se mueven en un flujo laminar continuo se separan por un campo eléctrico perpendicular al flujo. El campo eléctrico hace que las moléculas cargadas se separen en un gradiente de pH de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI). Solo las fracciones que contienen los péptidos seguidos se seleccionan para el fraccionamiento adicional y análisis de LC-MS/MS. Cada péptido de interés eluye de la cámara de FFE en un número de fracción específico, que se determina durante el desarrollo del ensayo de proteínas usando el homólogo del péptido sintético. Las fracciones específicas o mezclas de fracciones (multiplexado)
 - 20 continúan al siguiente nivel de fraccionamiento.
 - Segundo fraccionamiento basado en péptidos: La HPLC con fenilo (XBridge Phenyl; Waters) separa péptidos de acuerdo con la hidrofobicidad y naturaleza aromática de los aminoácidos presentes en la secuencia peptídica. La ortogonalidad con la separación en C18 de la etapa final se logra trabajando con la columna a un valor de pH mayor (pH 10). Como demostraron Gilar et al. 2005, *J Sep Sci* 28(14): 1694-1703, el pH es de lejos el parámetro más drástico para alterar la selectividad de péptidos en la RP-HPLC. Cada péptido de interés eluye de la columna de Fenilo con un tiempo de retención específico, que se determina durante el desarrollo del ensayo de proteínas usando el homólogo de péptido sintético. El uso de un sistema de control externo, en el que una mezcla de 9 péptidos patrón se separa por adelantado de un lote de separaciones de muestra, permite ajustar la recolección de fracciones con el fin de corregir los cambios de tiempo de retención. La extensión del fraccionamiento depende de la concentración de la proteína en la muestra y la complejidad de esa muestra.
 - 25
 - 30 - La cuantificación basada en LC-MS/MS, que incluye la separación adicional en fase inversa (C18) nanoLC (PepMap C18; Dionex) y MS/MS: espectrometría de masas en tándem usando el modo de MRM (4000 QTRAP; ABI)/SRM (Vantage TSQ; Thermo Scientific). La columna LC se conecta a una aguja de electropulverización conectada a la cabeza de la fuente del espectrómetro de masas. Cuando el material eluye de la columna, las moléculas son ionizadas y entran en el espectrómetro de masas en la fase gaseosa. El péptido que se sigue se selecciona específicamente para pasar el primer cuadrupolo (Q1), basado en su relación de masa a carga (m/z). Después, el péptido seleccionado se fragmenta en un segundo cuadrupolo (Q2) que se usa como una celda de colisión. Los fragmentos resultantes después entran en el tercer cuadrupolo (Q3). Dependiendo de los ajustes del instrumento (determinados durante la fase de desarrollo del ensayo) solo se seleccionan para la detección un fragmento de péptido específico o fragmentos de péptidos específicos (o las llamadas transiciones).
 - 35
 - 40 - La combinación de m/z del péptido seguido y de m/z del fragmento seguido de este péptido se llama una transición. Este procedimiento se puede llevar a cabo para múltiples transiciones durante un experimento. Tanto el péptido endógeno (analito) como su correspondiente péptido sintético con marcaje isotópico (patrón interno) eluyen en el mismo tiempo de retención, y se miden en el mismo experimento de LC-MS/MS.
 - 45
 - La lectura de MASterclass se define por la relación entre el área bajo el pico específico para el analito y el área bajo el pico específico para el análogo sintético con marcaje isotópico (patrón interno). Las lecturas de MASterclass están directamente relacionadas con la concentración original de la proteína en la muestra. Por lo tanto, se pueden
 - 50 comparar las lecturas de MASterclass entre diferentes muestras y grupos de muestras.
- A continuación se da un protocolo de MASterclass típico que se sigue en el presente estudio:
- 25 µl de plasma se someten a reducción de la albúmina e IgG humanas (columnas centrífugas ProteoPre; Sigma Aldrich) de acuerdo con el protocolo del fabricante, excepto que se usó NH₄HCO₃ 20 mM como el tampón de unión/equilibrado.
 - 55 - La muestra reducida (225 µl) se desnaturaliza durante 15 min a 95°C y se enfría inmediatamente sobre hielo

- Se añaden a la muestra 500 fmol del péptido con marcaje isotópico (péptido “Heavy AQUA” hecho por encargo; Thermo Scientific)
- Se añaden 20 µg de tripsina a la muestra y se deja que se produzca la digestión durante 16 h a 37°C
- 5 - La muestra digerida se diluyó primero 1/8 en disolvente A (ácido fórmico al 0,1%) y después 1/20 en el mismo disolvente que contenía 250 amol/µl de todos los péptidos con marcaje isotópico (péptido “Heavy AQUA” hecho por encargo; Thermo Scientific) de interés.
- Se separaron 20 µl de la dilución final usando nano-LC de fase inversa con MS/MS en línea en el modo MRM/SRM:
 - Columna: PepMap C18, D.I. 75 µm x L 25 cm, diámetro de poros 100 Å, tamaño de partículas 5 µm
 - 10 - Disolvente A: ácido fórmico al 0,1%
 - Disolvente B: acetonitrilo 80%, ácido fórmico al 0,1%
 - Gradiente: 30 min; 2%-55% de disolvente B
 - MS/MS en modo MRM: el método contiene las transiciones para el analito así como para el péptido marcado sintético.
 - 15 - Las transiciones usadas se determinaron experimentalmente y se seleccionaron durante el desarrollo del ensayo de proteínas
 - Cada una de las transiciones de interés se midió durante un periodo que empezaba 3 min antes y terminaba 3 min después del tiempo de retención determinado del péptido de interés, asegurándose de que cada pico tenía al menos un conjunto de 15 datos.
 - 20 - Los datos no procesados se analizaron y cuantificaron usando el programa de ordenador LCQuan (Thermo Scientific): el área bajo el pico del analito (= el péptido MCAM) y el bajo el pico del patrón interno (el péptido MCAM sintético, marcado) en el mismo tiempo de retención en C18 se determinaron por detección automática del pico. Estos se comprobaron manualmente.
 - La lectura de MASSterclass se definió por la relación el área del pico del analito y el área del pico del patrón interno
 - 25 **Análisis estadístico de MASSterclass**
 - Las proporciones medidas son cuantificaciones diferenciales de péptidos. En otras palabras, una proporción es la concentración normalizada de un péptido. La concentración de un péptido es proporcional a la proporción medida con la espectrometría de masas.
 - Se lleva a cabo un análisis estadístico con el fin de determinar la precisión diagnóstica de una proteína específica.
 - 30 Para hacer esto, se comparan las clases de muestras por parejas. El análisis define la capacidad de una proteína para discriminar dos poblaciones de muestras.
 - El rendimiento diagnóstico de una proteína específica se determinó midiendo el área bajo las curvas (AUC) de Características Operativas del Receptor (ROC) (curva de eficacia diagnóstica) (véase, Sullivan Pepe M, *The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction*. 1993 Oxford University Press New York). Los intervalos de confianza (IC) y estimados de las AUC también se computaron usando un procedimiento no paramétrico, en concreto el método Bootstrap (véase, Efron B, Tibshirani R.J. *Nonparametric confidence intervals. An introduction to the bootstrap. Monographs on statistics and applied probability*. 1993; 57:75-90 Chapman & Hall New York).
 - 35 **Ejemplo 2: Verificación del valor diagnóstico del marcador candidato MCAM usando MASSterclass**
 - 40 Se recogieron muestras clínicas de forma prospectiva a lo largo de 3 centros médicos diferentes de pacientes que se presentaron en el servicio de urgencias (SU) con disnea aguda (n=100) relacionada con insuficiencia cardiaca aguda o relacionada con otras causas (= disnea sin ICA).
 - Para todos los pacientes incluidos se completó un cuaderno de recogida de datos (CRD) con detalles sobre antecedentes médicos, diagnóstico de ingreso y medicación.
 - 45 El análisis de Características Operativas del Receptor (ROC) demostró que la MCAM era muy sensible y específica para el diagnóstico de ICA en pacientes disneicos que se presentaban en el SU, indicado por una mediana del AUC general de 0,91 con IC al 95% de 0,85-0,96 (véase la figura 4). Este rendimiento diagnóstico es equivalente al BNP y NT-proBNP, el patrón referencial actual de los biomarcadores para el diagnóstico de ICA en la población con disnea aguda. La tabla 1 cita los resultados.

Tabla 1:

	BNP	NT-proBNP	MCAM
Mediana de AUC	0,88	0,85	0,91
IC al 95%	0,82-0,95	0,77-0,92	0,85-0,96

5 La combinación de la MCAM con el BNP tiene un impacto significativo en la precisión diagnóstica general, alcanzando un máximo de 86% en el conjunto de datos actual (véase la figura 4). La precisión diagnóstica de la MCAM y el BNP en un solo punto de corte y la combinación de los dos marcadores se resume en la siguiente tabla 2. Teniendo en cuenta que 100 pg/ml es el punto de corte de “descarte” usado clínicamente para el BNP, el uso del nivel de MCAM en un solo punto de corte puede mejorar mucho la precisión diagnóstica del BNP. Los valores de MCAM pueden compensar la falta de especificidad del BNP cuando los valores son superiores a 100 pg/ml.

Tabla 2:

Precisión de BNP en 100 pg/ml =	71%
Precisión de MCAM =	84%
Precisión de BNP (descarte) + MCAM =	86%

10 Ejemplo 3: Verificación de la MCAM como un marcador del progreso de la enfermedad: comparación de los niveles en el ingreso frente al alta.

15 Se recogieron muestras de los pacientes a los que se diagnosticó insuficiencia cardiaca agua tanto en el ingreso en el SU como en el alta del hospital, es decir, cuando se consideró que los pacientes se habían recuperado y estaban estables. Como media la muestra del alta se recogió 9-11 días después de la muestra de ingreso. Los niveles de MCAM se midieron usando MASterclass tanto en ambas muestras y se compararon los niveles dentro del mismo paciente. Para la mayoría de los pacientes hubo una disminución significativa de MCAM cuando se compararon los niveles en el ingreso y en el alta (figura 5). Se obtiene un cuadro muy parecido cuando se comparan los niveles de BNP en el ingreso frente al alta. Estos datos apoyan la idea de que los niveles de MCAM son un reflejo del estado de la enfermedad y por lo tanto se podrían usar para el seguimiento y/o predicción de un suceso agudo.

Además el tratamiento principal dado a estos pacientes de ICA eran diuréticos y como consecuencia los pacientes perdieron líquidos. Por lo tanto, una disminución de los niveles de MCAM es reflejo de un cambio en el estado de llenado de los pacientes.

Ejemplo 4: niveles de MCAM asociados con la ganancia de peso y pérdida de peso en pacientes con disnea aguda.

25 Se cribó la MCAM de muestras clínicas de pacientes con disnea aguda (cohorte de BASEL V como se describe en Potocki et al., *Journal of Internal Medicine* enero 2010;267(1):119-29), a los que se había diagnosticado insuficiencia cardiaca aguda descompensada o disnea debido a otras causas, usando MASterclass. Todos los datos clínicos relativos a las muestras se obtuvieron por el colaborador clínico y se añadieron a la ruta de análisis de datos de MASterclass.

30 Las asociaciones de los niveles de MCAM con todos los parámetros clínicos disponibles se computaron usando pruebas estadísticas unifactoriales. Se usó la prueba de correlación por rangos de Spearman para computar los coeficientes de correlación y la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para evaluar si dos muestras de observación independientes proceden de la misma población.

35 Estos análisis mostraron una clara asociación de la MCAM con la ganancia de peso antes del ingreso en el hospital y pérdida de peso después del uso de diuréticos terapéuticos, indicado por los p valores de Wilcoxon bajos (resumido en la tabla 3).

Tabla 3:

	población	MCAM p-valores
pérdida de peso del ingreso al alta	ICA	0,00383
ganancia de peso antes del ingreso	ICA	0,00058

40 La figura 9 ilustra el efecto de la ganancia de peso en los niveles de MCAM. Los pacientes con ICA que subieron de peso antes del ingreso en el hospital (acumulación de líquidos) tienen niveles de MCAM claramente aumentados.

Ejemplo 5: los niveles de MCAM aumentan en pacientes con ICA con disfunción sistólica

El efecto de la disfunción sistólica frente a la diastólica en pacientes con insuficiencia cardiaca, en los niveles de MCAM, se investigó basándose en los resultados del cribado de MASterclass de la cohorte de BASEL V. Esta cohorte contiene un número suficiente de pacientes con ICA con fracción de eyección ventricular izquierda reducida

(FEVI<55) o FEVI conservada (FEVI>55). Los niveles de MCAM eran significativamente mayores en pacientes con ICA con fracciones de eyección reducidas ($p<0,001$). La figura 10 muestra gráficas de cajas y bigotes para la MCAM en estas dos subpoblaciones de ICA.

- 5 Los pacientes con una disfunción sistólica (FE reducida) son más resistentes a la acumulación de líquidos y acumularán más volumen comparado con pacientes con disfunción diastólica antes de que se produzcan los síntomas de disnea.

REIVINDICACIONES

1. Uso de MCAM como un biomarcador para diagnosticar, predecir y/o pronosticar la insuficiencia cardiaca agua (ICA) en un sujeto.
- 5 2. Un método para diagnosticar, predecir y/o pronosticar la insuficiencia cardiaca agua (ICA) en un sujeto, caracterizado porque la fase de examen del método comprende medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto.
3. El método según la reivindicación 2, que comprende las etapas de:
 - (i) medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto;
 - (ii) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de ICA;
 - 10 (iii) encontrar una desviación o ausencia de desviación de la cantidad de MCAM medida en (i) respecto al valor de referencia;
 - (iv) atribuir dicha desviación o ausencia de desviación encontrada a un diagnóstico, predicción y/o pronóstico particular de ICA en el sujeto.
- 15 4. El método según las reivindicaciones 2 o 3, en donde una cantidad elevada de MCAM en la muestra del sujeto comparada con un valor de referencia que representa el diagnóstico o predicción de ausencia de ICA o que representa un buen pronóstico para la ICA, indica que el sujeto tiene o tiene riesgo de tener ICA o indica un mal pronóstico para la ICA en el sujeto.
- 20 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el sujeto presenta uno o más síntomas y/o signos potencialmente indicativos de ICA, en donde el sujeto presenta disnea, p. ej., causada por EPOC, neumonía o ICA, o en donde el sujeto tiene antecedentes médicos de insuficiencia cardiaca.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, para diagnosticar insuficiencia cardiaca agua (ICA) o recuperación de la misma, en un sujeto ingresado en el hospital, que comprende las etapas de:
 - (i) medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto tras el ingreso en el hospital y en un tiempo de medición donde se haga un diagnóstico de recuperación de la ICA;
 - 25 (ii) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de ICA;
 - (iii) encontrar una desviación o ausencia de desviación de la cantidad de MCAM medida en (i) respecto al valor de referencia;
 - 30 (iv) atribuir dicha desviación o ausencia de desviación encontrada a un diagnóstico particular de ICA o recuperación de ICA en el sujeto.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para el seguimiento de un cambio en el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de ICA en un sujeto, que comprende:
 - (i) aplicar el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 al sujeto en uno o más tiempos de medición sucesivos, de modo que se determine el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de ICA en el sujeto en dichos tiempos de medición sucesivos;
 - 35 (ii) comparar el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de ICA en el sujeto en dichos tiempos de medición sucesivos determinados en (i); y
 - (iii) encontrar la presencia o ausencia de un cambio entre el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de ICA en el sujeto en dichos tiempos de medición sucesivos determinados en (i).
 - 40
8. El método según la reivindicación 7, en donde dicho cambio en el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de ICA en sujetos se sigue en el transcurso de un tratamiento médico de dicho sujeto.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde la fase de examen del método comprende además medir la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más de otros biomarcadores útiles para el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de ICA en la muestra del sujeto, en donde dicho otro biomarcador útil para el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de ICA se elige del grupo que consiste en el péptido natriurético tipo B (BNP), propéptido natriurético tipo B (proBNP), y fragmento amino terminal del propéptido natriurético tipo B (NTproBNP).
- 45
10. El método según la reivindicación 9, que comprende las etapas de:

- (i) medir la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores en la muestra del sujeto;
- (ii) usar las mediciones de (i) para establecer un perfil del sujeto de la cantidad MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores;
- 5 (iii) comparar dicho perfil del sujeto de (ii) con un perfil de referencia de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores, representando dicho perfil de referencia un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de ICA;
- (iv) encontrar una desviación o ausencia de desviación del perfil del sujeto de (ii) respecto al perfil de referencia;
- 10 (v) atribuir dicha desviación o ausencia de desviación descubierta a un diagnóstico, predicción y/o pronóstico particular de ICA en el sujeto.
11. Un método para establecer un perfil de referencia para la cantidad de MCAM y opcionalmente la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más de otros biomarcadores útiles para el diagnóstico, predicción y/o pronóstico de ICA, representando dicho perfil de referencia:
- (a) un diagnóstico o predicción de ausencia de ICA o un buen pronóstico para la ICA, o
- 15 (b) un diagnóstico o predicción de ICA o un mal pronóstico para la ICA,
- que comprende:
- (i) medir la cantidad de MCAM y opcionalmente la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores en:
- 20 (i a) una o más muestras de uno o más sujetos que no tienen ICA o no están en riesgo de tener ICA o que tienen un buen pronóstico para la ICA; o
- (i b) una o más muestras de uno o más sujetos que tienen ICA o están en riesgo de tener ICA o tienen mal pronóstico para la ICA;
- (ii)
- 25 (ii a) usar las mediciones de (i a) para crear un perfil de la cantidad de MCAM y opcionalmente de la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores; o
- (ii b) usar las mediciones de (i b) para crear un perfil de la cantidad de MCAM y opcionalmente de la presencia o ausencia y/o la cantidad de dichos uno o más de otros biomarcadores;
- (iii)
- 30 (iii a) almacenar el perfil de (ii a) como el perfil de referencia que representa el diagnóstico o predicción de ausencia de ICA o que representa el pronóstico bueno para la ICA; o
- (iii b) almacenar el perfil de (ii b) como el perfil de referencia que representa el diagnóstico o predicción de ICA o que representa el pronóstico malo para la ICA, en donde dicho otro biomarcador útil para diagnosticar, predecir y/o pronosticar ICA se elige del grupo que consiste en el péptido natriurético tipo B (BNP), propéptido natriurético tipo B (proBNP), y fragmento amino terminal del propéptido natriurético tipo B (NTproBNP).
- 35
12. Un método para establecer un valor base o de referencia de MCAM en un sujeto, que comprende:
- (i) medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto en diferentes tiempos de medición, en donde el sujeto no padece ICA, y
- (ii) calcular el intervalo o valor medio del sujeto, que es el valor base o de referencia de MCAM para dicho sujeto.
- 40 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el sujeto padece ICA que implica disfunción sistólica, preferiblemente en donde dicha disfunción sistólica se caracteriza por una disminución de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI), preferiblemente en donde dicha FEVI es menor que 55% o menor que 50% o menor que 45%, y/o en donde dicha disfunción sistólica se caracteriza por aumento de la presión de llenado cardíaco.
- 45 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en donde la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores se mide usando, respectivamente, un agente de unión capaz de unirse específicamente a la MCAM y/o fragmentos de la misma, y un agente de unión capaz de unirse específicamente a dichos uno o más de otros biomarcadores, preferiblemente, en donde la cantidad

de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o la cantidad de uno o más de otros biomarcadores se mide usando una tecnología de inmunoensayo, tal como tecnologías de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA multiplexado, radioinmunoensayo (RIA), ELISPOT, o usando un método de análisis de espectrometría de masas o usando un método de cromatografía, o usando una combinación de dichos métodos.

- 5 15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-14, en donde la muestra usada es plasma y en donde se detecta la forma circulante en el plasma de la MCAM.
16. Uso de un kit que comprende medios para medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto, para diagnosticar, predecir y/o pronosticar la ICA en dicho sujeto, opcionalmente comprendiendo además un valor de referencia de la cantidad de MCAM o medios para establecer un valor de referencia, en donde dicho valor de referencia representa un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de ICA, opcionalmente en donde dicho medio para detectar la MCAM es capaz de detectar la forma circulante en el plasma de la MCAM, preferiblemente capaz de detectar específicamente la forma circulante en el plasma de la MCAM.
- 10 17. Una matriz o micromatriz de agentes de unión que comprende:
- 15 (a) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a la MCAM y/o a fragmentos de la misma, preferiblemente, una cantidad o concentración conocida de dichos agentes de unión; y
- (b) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a uno o más de otros biomarcadores útiles para diagnosticar, predecir y/o pronosticar la ICA, preferiblemente una cantidad o concentración conocida de dichos agentes de unión, en donde dichos otros biomarcadores se eligen del grupo que consiste en BNP, proBNP y NTproBNP.
- 20 18. Un dispositivo de prueba portátil capaz de medir la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto, que comprende:
- (i) medios para obtener una muestra del sujeto, y
- (ii) medios para medir la cantidad de MCAM en dicha muestra, y
- 25 (iii) medios para visualizar la cantidad de MCAM medida en la muestra, en donde el medio de visualización es capaz de indicar si la cantidad de MCAM en la muestra es mayor o menor que un determinado nivel umbral y/o si la cantidad de MCAM en la muestra se desvía o no de un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un diagnóstico, predicción y/o pronóstico conocido de ICA.

FIG 1

(A) MCAM, de NP_006491

mglprlvcaflaaccprvagvPGEAEQPAPELVEVEVGSTALLKCGLSQSQGNLSHV
DWFSVHKEKRTLIFRVRQGGQSEPGEYEQRLSLQDRGATLALTQVTPQDERIFLCQGKR
PRSQEYRIQLRVYKAPEEPNIQVNPLGIPVNSKEPEEVATCVGRNGYPIPQVIWYKNGRP
LKEEKNRVHIQSSQTVESSGLYTLQSILKAQLVKEDKDAQFYCELNYRLPSGNHMKESRE
VTVPVFYPTTEKVVLEVEPVGMLKEGDRVEIRCLADGNPPPHFSISKQNPSTREAAEETTN
DNGVLVLEPARKEHSGRYECQGLDLDTMISLLSEPQELLVNYVSDVRVSPAAPERQEGSS
LTLTCEAESSQDLEFQWLREETGQVLERGPVLQLHDLKREAGGGYRCVASVPSIPGLNRT
QLVNVAIFGPPWMAFKERKVVWKENMVLNLSCEASGHPRPTISWNVNGTASEQDQDPQRV
LSTLNVLVTPELLETVECTASNDLGKNTSILFLELVNLTLLTPDSNTTGLSTSTASPH
TRANSTSTERKLEPEPESRGvvivavivcivlavlavlyflykkkklpcrrsgkqeitl
Ppsrkselvvevksdklpeemgllqgssgdkrapgdqgekyidlrh (SEQ ID NO: 1)

FIG 2

(A) Preproteína precursora del péptido natriurético B, NP_002512

MDPQTAPSRALLLLLFLHLAFLGGRSHPLGSPGSASDLETSGLQEQRN
HLQGKLSLQVEQTSLEPLQESPRPTGVWKSREVATEGIRGHRKMVLY
TLRAPRSPKMVQSGGCFGRKMDRISSSSSGLGCKVLRH (SEQ ID NO:
3)

(B) proBNP, de NP_002512

HPLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQGKLSLQVEQTSLEPLQESPRPT
GVWKSREVATEGIRGHRKMVLYTLRAPRSPKMVQSGGCFGRKMDRIS
SSSGLGCKVLRH (SEQ ID NO: 4)

(C) NTproBNP, de NP_002512

HPLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQGKLSLQVEQTSLEPLQESPRPT
GVWKSREVATEGIRGHRKMVLYTLRAPR (SEQ ID NO: 5)

(D) BNP, de NP_002512

SPKMVQSGGCFGRKMDRISSSSSGLGCKVLRH (SEQ ID NO: 6)

FIG 3

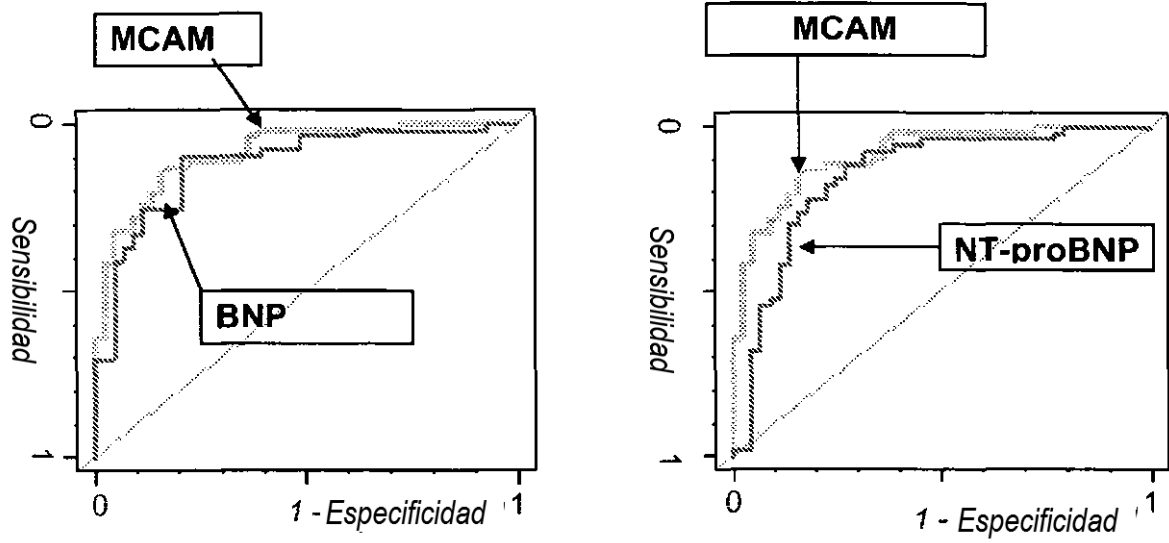


FIG 4

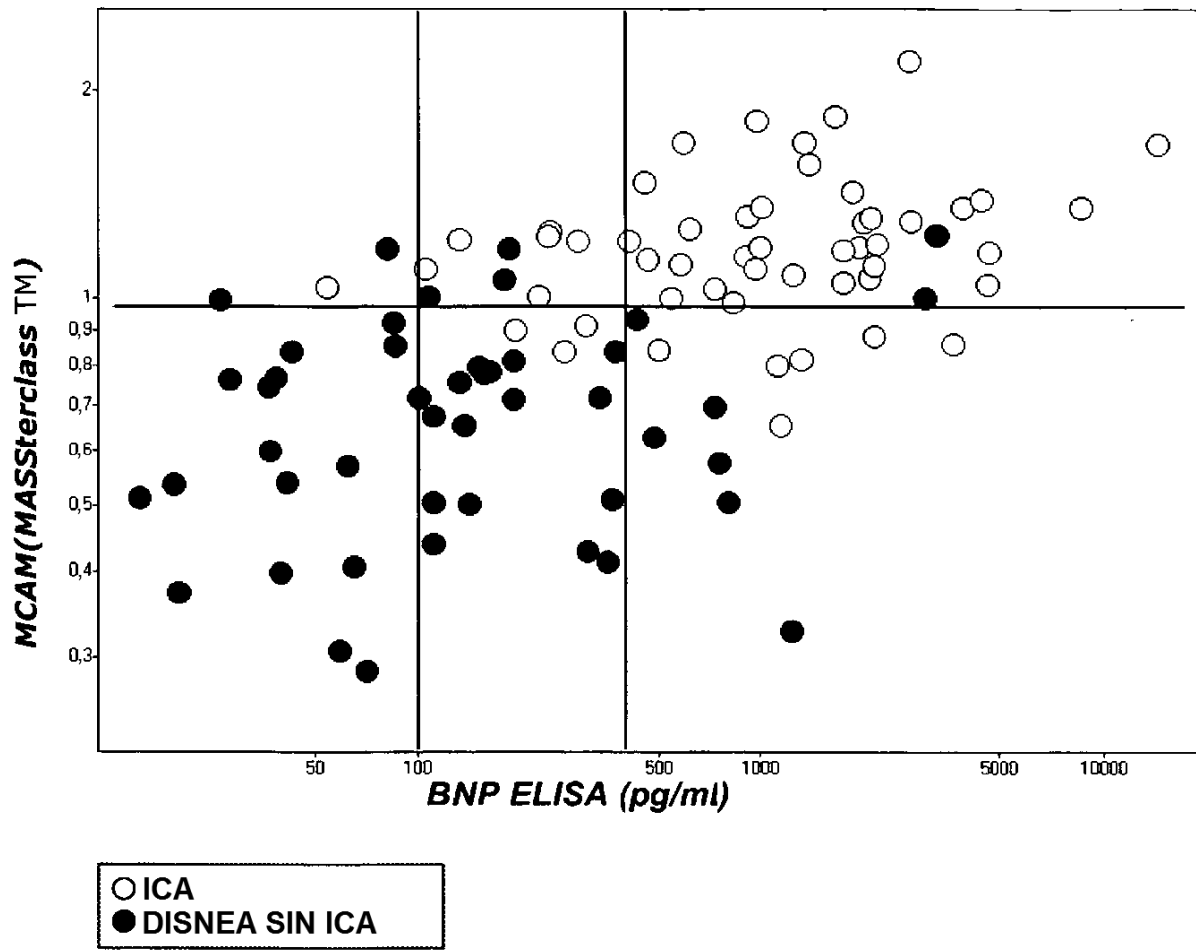


FIG 5

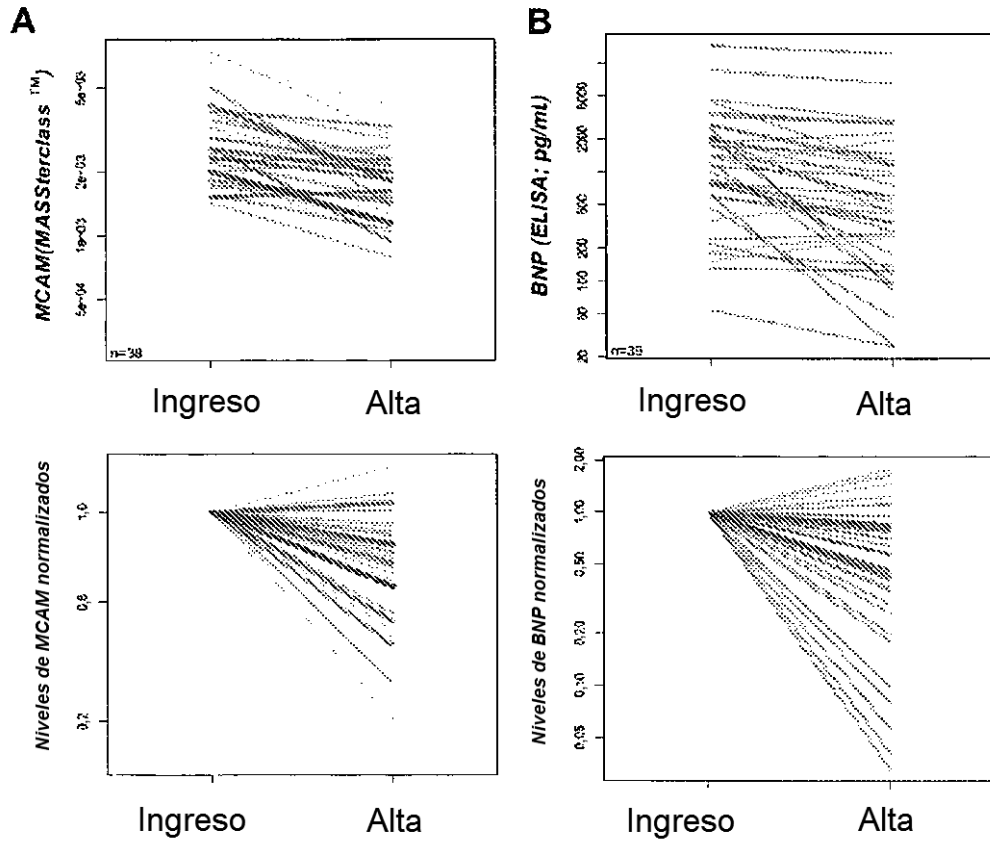


FIG 6

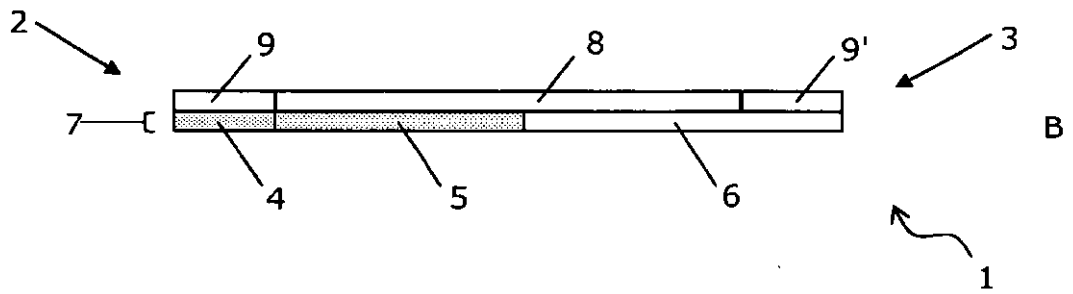
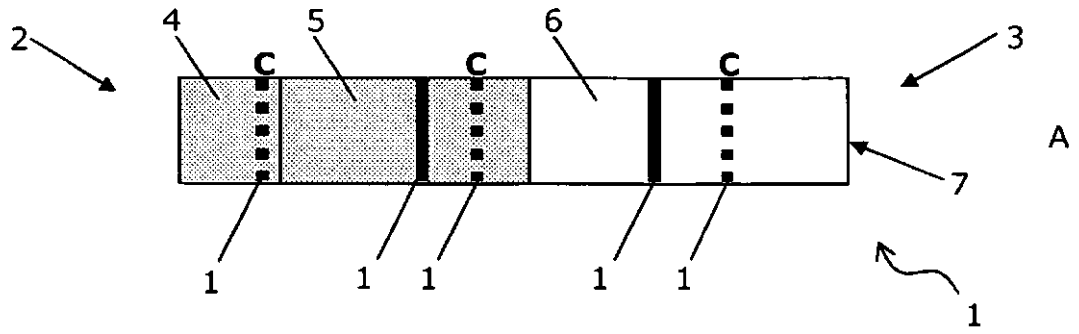
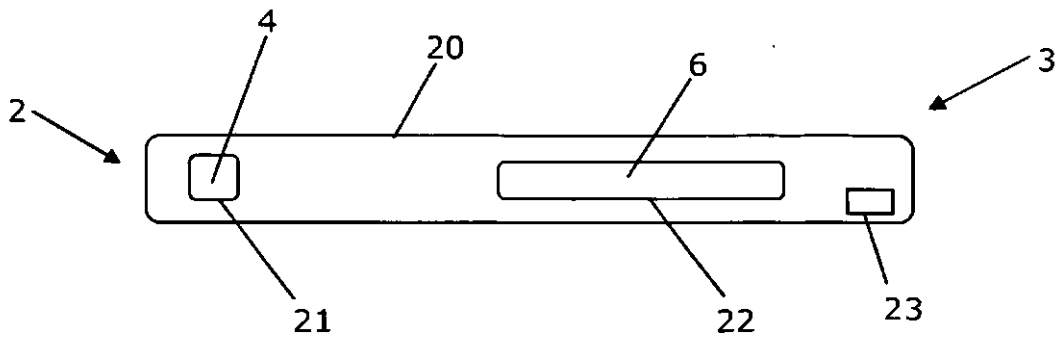


FIG 7



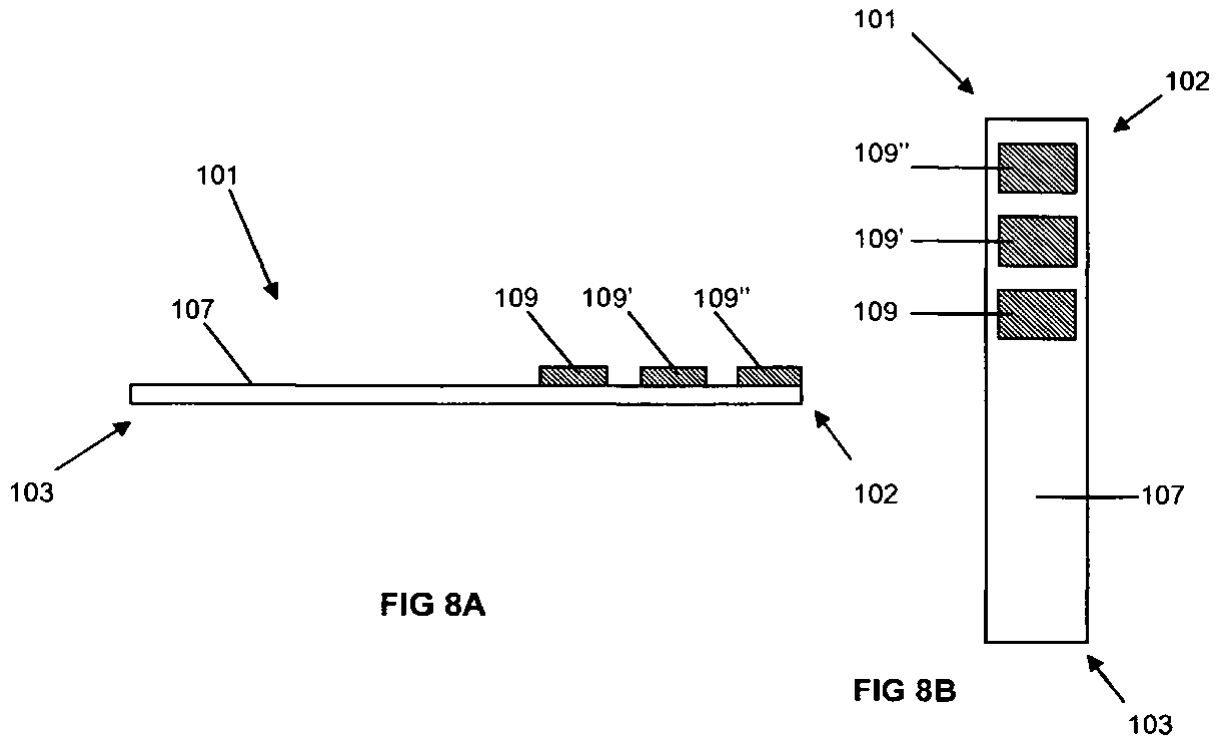


FIG 9

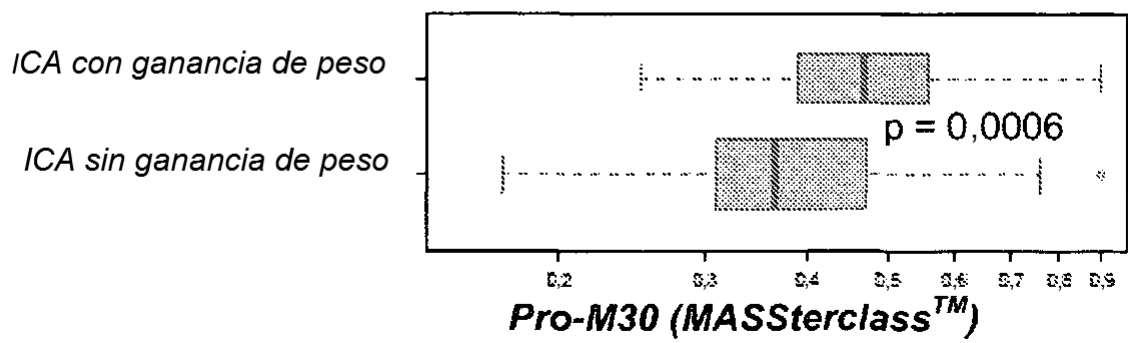


FIG 10

