

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 210**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2009 E 09736992 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2344671**

54 Título: **NGAL como biomarcador para la activación del receptor de mineralocorticoides**

30 Prioridad:

24.10.2008 EP 08305728
28.05.2009 US 181821 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2016

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE NANTES (33.3%)

72 Inventor/es:

JAISSER, FRÉDÉRIC;
FARMAN, NICOLETTE;
SAINTE-MARIE, YANNIS;
LATOUICHE, CÉLINE y
STEENMAN, MARJA

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 579 210 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

NGAL como biomarcador para la activación del receptor de mineralocorticoides

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a biomarcadores de la activación del Receptor de Mineralocorticoides (RM) en un paciente.

10 **Estado de la técnica**

El receptor de mineralocorticoides (RM) es un miembro de los receptores de hormonas esteroideas clásicas que incluyen al receptor de glucocorticoides (RG), receptor de andrógenos (RA), receptor de progesterona (RP) y receptor de estrógenos (RE) (Funder, 1997). Estos receptores son factores de transcripción activados por hormona que regulan una amplia diversidad de procesos fisiológicos que varían desde el desarrollo y la diferenciación de órganos hasta el control del estado de ánimo y la respuesta al estrés (Beato *et al.*, 1995). La hormona fisiológica para el RM es la aldosterona, que es una hormona esteroide que secreta la glándula adrenal.

Los RM se han localizado en sitios no epiteliales en los vasos sanguíneos, cerebro y corazón (Bonvalet JP. *et al.* 1995; Lombes M, *et al.* 1992; Tanaka J. *et al.* 1997). Numerosos estudios a lo largo de los últimos 10 años sugieren que las acciones no epiteliales de los mineralocorticoides son responsables de sus efectos fibróticos y tróficos vasculares y en el miocardio (Brilla CG. *et al.* 1992, Ullian ME. *et al.* 1992; Young M. *et al.* 1994). Además, se han descubierto RM, incluyendo células endoteliales de ser humano y células del músculo liso vascular (CMLV) (Hatakeyama H. *et al.* 1994) y las células del miocardio en estudios animales (Silvestre JS. *et al.* 1988). Varios estudios (Brilla CG *et al.* 1992; Young M. *et al.* 1994) han vinculado a los mineralocorticoides con la fibrosis del miocardio a través de la estimulación de la formación de colágeno en las células del miocardio.

Farquharson CA. *et al.* (2000) mostró de forma indirecta que la aldosterona podría tener un papel en la disfunción endotelial en la insuficiencia cardíaca crónica. Por lo tanto, el RM es una diana para fármacos importante, en particular para el tratamiento de la hipertensión y de la insuficiencia cardíaca.

Por ejemplo, el antagonista de la aldosterona, la espironolactona (también conocida como ALDACTONE®, PFIZER) se une al receptor de mineralocorticoides y bloquea la unión de la aldosterona. Este compuesto esteroide se utiliza comúnmente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva. En realidad, la espironolactona ha mostrado ser farmacológicamente eficaz y bien tolerada para reducir los riesgos de muerte en conjunto, la muerte debida a la insuficiencia cardíaca progresiva y la muerte súbita a partir de causas cardíacas, así como el riesgo de hospitalización por causas cardíacas. La administración de espironolactona a pacientes con insuficiencia cardíaca grave se evaluó en el estudio *Randomized Aldactone Evaluation Study*: Estudio Aleatorizado de Evaluación de la Aldactona (RALES). El RALES fue un ensayo aleatorizado, con doble ocultación, controlado por placebo, que incorporó participantes que tenían insuficiencia cardíaca grave y una fracción de eyección del ventrículo izquierdo de no más del 35 % y que estaban recibiendo terapia convencional, la cual normalmente incluía un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, un diurético de asa y, en algunos casos, digoxina. Los sujetos del RALES tratados con espironolactona tenían una reducción estadísticamente significativa de la mortalidad y de la frecuencia de hospitalización con respecto a los sujetos tratados con el placebo (Pitt B. *et al.* 1999).

Asimismo, la eplerenona ejemplifica otro bloqueante de la unión de la aldosterona al receptor de mineralocorticoides. Su acción es selectiva, en la que la eplerenona se une a receptores de mineralocorticoides de ser humano recombinantes con preferencia a la unión a receptores de glucocorticoides, progesterona y andrógenos de ser humano recombinantes. Los beneficios de terapéuticos asociados con la administración de eplerenona se han demostrado en múltiples ensayos clínicos. En uno de tales estudios, que implicaba más de 6.600 sujetos [*The Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study* (EPHESUS)], se encontró que la eplerenona reduce de forma significativa los riesgos de muerte atribuible a causas cardiovasculares y el riesgo de hospitalización para los episodios cardiovasculares (Pitt B. *et al.* 2003). También se observó una reducción en la tasa de muerte súbita a partir de causas cardíacas.

Sin embargo, la aldosterona no es la única hormona endógena conocida por activar el RM. Por ejemplo, los glucocorticoides endógenos también pueden activar el RM. En realidad, los glucocorticoides han mostrado producir estrés oxidativo e inflamación vascular en las fases iniciales del desarrollo de la fibrosis cardíaca. Los efectos nocivos de la activación del RM en el sistema cardiovascular pueden así producirse incluso en ausencia de hiperaldosteronismo (Funder JW, 2006) y los niveles plasmáticos de aldosterona no proporcionan indicio sobre la activación del RM en el sistema cardiovascular. Además, en la insuficiencia cardíaca, en el infarto de miocardio o en el daño del órgano afectado asociados con alta tensión sanguínea, la expresión del RM esta aumentada en el corazón o en los vasos, (Nagata K, *et al.* 2006; Takeda M. *et al.*, 2007).

Por lo tanto, hay todavía una necesidad existente en la técnica del desarrollo de un método preciso y específico para la evaluación de la activación del RM en el sistema cardiovascular.

Además, la administración de un antagonista del RM a un paciente puede estar acompañada de diversos efectos secundarios adversos tales como hiperpotasiemia. En realidad, ha habido varias comunicaciones de hiperpotasiemia grave después de la publicación el estudio RALES. En una de tales comunicaciones, se describieron no menos de 25 episodios de hiperpotasiemia relacionada con espironolactona de pacientes que tuvieron que tratarse en urgencias (Schepkens H. *et al.* 2001). Cuatro de los 25 pacientes precisaron medidas de reanimación cardiovascular y 2 de los 25 pacientes murieron. Varios autores han estimado una incidencia clínicamente significativa de hiperpotasiemia de aproximadamente el 10 % en pacientes que reciben este antagonista del RM.

Por lo tanto, hay todavía una necesidad existente en la técnica del desarrollo un método eficaz y específico para predecir la respuesta de un paciente afectado por insuficiencia cardíaca al tratamiento con un antagonista del RM, para prevenir o limitar los efectos secundarios adversos de tal tratamiento.

Wang *et al.* (Clinical Chemistry, 2007, 53:1, 34-41) describe que la NGAL/lipocalina2 es un marcador inflamatorio estrechamente asociado con la obesidad, la resistencia a la insulina y la hiperglucemia en seres humanos.

Hansen *et al.* (Immunology Letters, 2004, 91, 87-91) divulga que el antagonista del RM espironolactona (SPIR) reduce la mortalidad y la morbilidad en pacientes con Insuficiencia Cardíaca Crónica inhibiendo la expresión de citoquinas a partir de CMSP.

Owen *et al.* (Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 294, E1023-E1034) describe el vínculo entre la NGAL/lipocalina y la inflamación en la respuesta a la dexametasona en condrocitos.

Objeto de la invención

La presente invención describe un método para evaluar la activación del Receptor de Mineralocorticoides (RM) en un paciente, que comprende determinar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente el nivel de expresión de uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en el gen de la Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL) y el gen de SERPINA3.

La presente invención se refiere a un método para la predicción de la respuesta de un paciente a un tratamiento con un antagonista del RM, comprendiendo dicho método determinar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente el nivel de expresión de uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en el gen de la Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL) y el gen de SERPINA3, como se describe en las reivindicaciones.

La invención también se refiere al uso de un antagonista del RM para tratar a un paciente afectado por una enfermedad cardiovascular, siendo dicho paciente clasificado como respondedor mediante el método de la invención.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

El término "RM" se refiere al receptor de mineralocorticoides. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "activación del RM" se refiere a la activación del receptor de mineralocorticoides mediante mineralocorticoides (es decir, aldosterona) o glucocorticoides.

La expresión "antagonista del RM" se refiere a un compuesto, natural o no, que tiene la capacidad de inhibir (parcial o totalmente) la activación biológica del RM. Se conocen varios antagonistas del RM que incluyen la espironolactona, la epoximexrenona y la eplerenona. El alcance de la presente invención incluye todos los antagonistas del RM conocidos ahora y los antagonistas del RM a descubrir en el futuro. El antagonista de la aldosterona puede ser un compuesto tipo espironolactona (espironolactona, metabolitos activos de la espironolactona tales como canrenona o sales de los mismos tales como canrenoato de potasio). El antagonista de la aldosterona también puede ser un antagonista de la aldosterona epoxi esteroide. Otra serie de antagonistas del RM de tipo esteroide se ejemplifica mediante los derivados de la espironolactona que contienen epoxi. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.559.332 describe derivados de espironolactona como antagonistas del RM. Drospirenona (DRSP), que es un análogo para la espironolactona, puede ser un antagonista del RM adicional.

La expresión "inhibidor de la aldosterona sintasa" está destinada a incluir compuestos o agentes que inhiben la enzima aldosterona sintasa, que transforma corticosterona a aldosterona hidroxilando corticosterona a la forma 18-OH-corticosterona y 18-OH-corticosterona a aldosterona. Son bien conocidos en la técnica diversos inhibidores de la aldosterona sintasa. Dicho inhibidor de la aldosterona sintasa pueden ser inhibidores de la aldosterona sintasa esteroides y no esteroides. El inhibidor de la aldosterona sintasa puede ser un inhibidor de la aromatasa no esteroide o esteroide. Los inhibidores de la aromatasa no esteroides pueden incluir anastrozol y fadrozol (incluyendo el (+)-enantiómero de los mismos). Un ejemplo de un inhibidor de la aromatasa esteroide es exemestano. Otro inhibidor de la aldosterona sintasa no esteroide es el (+)-enantiómero del clorhidrato de fadrozol (patentes de Estados Unidos 4617307 y 4889861), como también se describe en Fiebler A. *et al.* (2005).

La expresión “Lipocalina2” o “NGAL” tiene su significado general en la técnica y se refiere a la Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos, como se describe en Schmidt-Ott KM. *et al.* (2007). NGAL puede ser de cualquier fuente, pero normalmente es una NGAL de mamífero (por ejemplo, de ser humano o de un primate que no sea ser humano), en particular una NGAL de ser humano. La expresión “gen de NGAL” se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm de NGAL y la proteína NGAL, tal como una secuencia de ADN genómico, y cualquier NGAL de origen natural y variantes y formas modificadas de la misma. También puede abarcar secuencias artificiales tales como ADNc que codifica el ARNm de NGAL y la proteína NGAL. Una secuencia de nucleótidos ejemplar de NGAL natural de ser humano se proporciona en la base de datos GenBank con el número de registro NM_005564. La expresión “ARNm de NGAL” tiene su significado general en la técnica y se refiere al ARN mensajero que se sintetiza durante la expresión del gen de NGAL. La expresión “proteína NGAL” se refiere a la secuencia de aminoácidos que se produce por la expresión del gen de NGAL, y cualquier NGAL de origen natural y formas variantes y modificadas de la misma. Una secuencia de aminoácidos ejemplar de NGAL natural de ser humano se proporciona en la base de datos GenPept con el número de registro NP_005555. La expresión “proteína NGAL” como se usa en el presente documento también abarca el complejo heterodimérico formado por NGAL y la metaloproteínasa MMP-9, también conocido como gelatinasa B, colagenasa de tipo IV de 92 kDa, gelatinasa de 92 kDa y colagenasa de tipo V (Kjeldsen *et al.*, 1993).

La expresión “anticuerpo anti NGAL” se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce NGAL.

El término gen de “SERPINA3” tiene su significado general en la técnica, también es conocido como CT; AACT; GIG24; GIG25; MGC88254. El nombre completo oficial de este gen es inhibidor de la peptidasa serpina, clado A (antiproteínasa alfa 1-antitripsina), miembro 3. SERPINA3 puede ser de cualquier fuente, pero normalmente es una SERPINA3 de mamífero (por ejemplo, de ser humano y de primate que no es ser humano), en particular una SERPINA3 de ser humano. La expresión “gen de SERPINA3” se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm de SERPINA3 y la proteína SERPINA3, tal como una secuencia de ADN genómico y cualquier SERPINA3 de origen natural y formas variantes y modificadas de la misma. También puede abarcar secuencias artificiales tales como el ADNc que codifica el ARNm de SERPINA3 y la proteína SERPINA3. La expresión “ARNm de SERPINA3” tiene su significado general en la técnica y se refiere al ARN mensajero que se sintetiza durante la expresión del gen de SERPINA3. La expresión “proteína SERPINA3” se refiere a la secuencia de aminoácidos que se produce por la expresión del gen de SERPINA3 y cualquier SERPINA3 de origen natural y formas variantes y modificadas de la misma.

La expresión “anticuerpo de SERPINA3” se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce la proteína SERPINA3.

La expresión “sistema cardiovascular” tiene su significado general en la técnica, e indica el sistema compuesto por el corazón, los vasos sanguíneos o vasculatura, y las células y el plasma que constituyen la sangre.

La expresión “enfermedad cardiovascular” tiene su significado general en la técnica y se utiliza para clasificar numerosas afecciones que afectan al corazón, las válvulas cardíacas, la sangre y la vasculatura del organismo. Las enfermedades cardiovasculares incluyen disfunción endotelial, arteriopatía coronaria, angina de pecho, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, enfermedad cerebrovascular, accidente cerebrovascular, accidentes isquémicos transitorios, trombosis venosa profunda, arteriopatía periférica, cardiomiopatía, arritmias, estenosis valvular aórtica y aneurisma.

Como se usa en el presente documento, la expresión “valor predeterminado de un biomarcador” se refiere a una cantidad de un biomarcador en muestras biológicas obtenidas de la población general o de una población seleccionada de sujetos. Por ejemplo, la población seleccionada puede estar compuesta de sujetos aparentemente sanos, tal como individuos que no hayan tenido anteriormente ningún signo o síntomas que indiquen la presencia de enfermedad cardiovascular. En otro ejemplo, el valor predeterminado puede ser de la cantidad de biomarcador obtenido de sujetos que tienen una enfermedad cardiovascular establecida. El valor predeterminado puede ser un valor umbral o un intervalo. El valor predeterminado puede establecerse basándose en las mediciones comparativas entre sujetos aparentemente sanos y sujetos con enfermedad cardiovascular establecida.

El término “paciente” como se utiliza en el presente documento indica un mamífero tal como un roedor, un felino, un canino o un primate. Preferentemente, un paciente de acuerdo con la invención es un ser humano.

Un paciente, o grupo de pacientes, “respondedor” o “sensible” a un tratamiento con un antagonista del RM o con un inhibidor de la aldosterona sintasa, se refiere a un paciente, o grupo de pacientes, que muestra o mostrará un alivio clínicamente significativo de la enfermedad cardiovascular cuando se trata con un antagonista del RM o con un inhibidor de la aldosterona sintasa, respectivamente. De acuerdo con el método de la invención, un paciente se clasifica como respondedor a un tratamiento si la expresión de uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en el gen de Lipocalina Asociada con Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL) y el gen de SERPINA3 en dicho paciente, es significativamente distinto el valor predeterminado obtenido de la población general o de sujetos sanos. Preferentemente, un paciente es un respondedor si el nivel de expresión de uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en el gen de la Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL) y el gen de SERPINA3,

en dicho paciente, es mayor que el valor predeterminado obtenido de la población general o de sujetos sanos.

Normalmente, el nivel de expresión en un paciente de dichos uno o dos biomarcadores se considera mayor que el valor predeterminado obtenido de la población general o de sujetos sanos, si la proporción del nivel de expresión de dichos uno o dos biomarcadores en dicho paciente con respecto al de dicho valor predeterminado es mayor que 1,2, preferentemente que 1,5, incluso más preferentemente que 2, incluso más preferentemente que 5, 10 o 20.

La expresión "sujetos sanos" como se utiliza en el presente documento se refiere a una población de sujetos que no padece ninguna afección conocida y, en particular, que no están afectados por ninguna enfermedad cardiovascular, diabetes, obesidad o síndrome metabólico.

La expresión "muestra biológica" significa cualquier muestra biológica obtenida de un paciente. Los ejemplos de tales muestras incluyen líquidos, tejidos, muestras de células, órganos, biopsias, etc. Las muestras biológicas preferentes son muestras de células o de tejidos. Las muestras biológicas preferentes son sangre entera, suero, plasma u orina.

El término "biomarcador" como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a una molécula, es decir, a un gen (o ácido nucleico que codifica dicho gen), proteína, cuya expresión en una muestra biológica procedente de un paciente se puede detectar mediante métodos convencionales en la técnica (así como los descritos en el presente documento), y es predictiva o indica una afección del paciente a partir del cual se obtuvo.

Métodos predictivos de la invención:

La presente invención se refiere a un método para evaluar la activación del RM en un paciente que comprende determinar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente el nivel de expresión de uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en el gen de la Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL) y el gen de SERPINA3.

En una realización particular la invención se refiere a un método para evaluar la activación del RM en el sistema cardiovascular de dicho paciente, que comprende determinar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente el nivel de expresión de uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en el gen de la Lipocalina Asociada con Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL) y el gen de SERPINA3.

La presente invención también se refiere a un método para predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento con un antagonista del RM, comprendiendo dicho método determinar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente el nivel de expresión de uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en el gen de la Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL) y el gen de SERPINA3.

En una realización particular, el paciente está afectado por una enfermedad cardiovascular. Más particularmente, dicho paciente está afectado por una disfunción endotelial, arteriopatía coronaria, angina de pecho, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, enfermedad cerebro vascular, accidente cerebrovascular, accidentes isquémicos transitorios, trombosis venosa profunda, arteriopatía periférica, cardiomiopatía, arritmias, estenosis aortica o aneurisma. En una realización particular, dicho paciente está afectado por insuficiencia cardíaca congestiva o hipertensión.

En una realización particular, el paciente con una enfermedad cardiovascular ya se ha tratado con un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, diuréticos, vasodilatadores, betabloqueantes, digital y anticoagulantes.

En una realización, la invención se refiere a un método para evaluar en un paciente la activación del RM, que comprende determinar la cantidad de ARNm de los uno o dos biomarcadores en una célula o muestra de tejido obtenidos de dicho paciente.

La presente invención también se refiere a un método para predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento con un antagonista del RM, comprendiendo dicho método determinar la cantidad de ARNm de los uno o dos biomarcadores en una célula o muestra de tejido obtenidos de dicho paciente.

Las células preferentes son células mononucleares de sangre periférica (CMSP), macrófagos, células polinucleares, y células endoteliales y células progenitoras endoteliales (EPC). Incluso más preferentes, las células de acuerdo con la invención son las CMSP o células endoteliales. Los ARN totales se pueden extraer fácilmente de las mismas. Las células o muestra de tejido se pueden tratar antes de su uso, por ejemplo, para hacer que los ácidos nucleicos estén disponibles. Las técnicas de lisis celular o de proteínas, de concentración o dilución de ácidos nucleicos, son conocidas para el experto.

La determinación del nivel de expresión de un gen se puede realizar mediante una diversidad de técnicas. En general, el nivel de expresión según se determina es un nivel de expresión relativo.

Más preferentemente, la determinación comprende poner en contacto la muestra con reactivos selectivos, tales como sondas, cebadores o ligandos, y detectar de este modo la presencia, o medir la cantidad, de ácidos nucleicos de interés que se encuentran originalmente en la muestra.

5 En una realización preferente, el nivel de expresión se puede determinar determinando la cantidad de ARNm.

Los métodos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en primer lugar el ácido nucleico contenido en las muestras (por ejemplo, célula o tejido preparados del paciente) se extrae de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo utilizando enzimas líticas o soluciones químicas o se extraen mediante resinas de unión a ácidos nucleicos, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta después mediante hibridación (por ejemplo, análisis de transferencia de Northern) y/o amplificación (por ejemplo, RT-PCR). En una realización preferente, el nivel de expresión de los uno o dos biomarcadores se determina mediante RT-PCR, preferentemente RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, incluso más preferentemente RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real. En una realización preferente, el nivel de expresión del gen NGAL se evalúa mediante PCR cuantitativa utilizando los cebadores directo 5'-GGACCAGGGCTGTGCTACT-3' (SEQ ID NO: 1) e inverso 5'-GGTGGCCACTTGACATTGT-3' (SEQ ID NO: 2), o los cebadores directo 5'-TCACCCTGTACGGAAGAACC-3' (SEQ ID NO: 3) e inverso 5'-GGTGGGAACAGAGAAAACGA-3' (SEQ ID NO: 4).

20 Otros métodos de amplificación incluyen reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) y amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA).

Los ácidos nucleicos que tienen por lo menos 10 nucleótidos y presentan complementariedad de secuencia u homología con el ARNm de interés en el presente documento, encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se comprende que tales ácidos nucleicos no necesitan ser idénticos, pero son normalmente al menos el 80 % idénticos con la región homóloga de tamaño comparable, más preferentemente el 85 % idénticos e incluso más preferentemente el 90-95 % idénticos. En determinadas realizaciones, será ventajoso utilizar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como una etiqueta detectable, para la hibridación de detección. Se conocen en la técnica una amplia diversidad de indicadores apropiados que incluyen ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos (por ejemplo, avidina/biotina).

Las sondas comprenden normalmente ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 a 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de entre 10 y 800, más preferentemente de entre 15 y 700, normalmente de entre 20 y 500. Los cebadores normalmente son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, de entre 10 a 20 nucleótidos de longitud, diseñados para emparejarse de forma perfecta o casi perfecta con un ácido nucleico de interés a amplificar. Las sondas y cebadores son "específicas" para los ácidos nucleicos con los que hibridan, es decir, hibridan preferentemente en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (que corresponde a la mayor temperatura de fusión T_m, por ejemplo, formamida al 50 %, SCC 5x o 6x. SCC es NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M).

40 Los cebadores o sondas de ácidos nucleicos utilizados en el método de amplificación y detección anterior se pueden montar como un kit. Tal kit incluye cebadores y sondas moleculares consenso. Un kit preferente también incluye los componentes necesarios para determinar si la amplificación se ha producido. El kit puede también incluir, por ejemplo, tampones y enzimas de PCR; secuencias de control positivo, cebadores de control de la reacción e instrucciones para amplificar y detectar las secuencias específicas.

45 Se divulga un método para evaluar la activación del RM de un paciente que comprende medir la concentración de las una o dos proteínas biomarcadoras en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

50 La invención se refiere a un método para predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento con un antagonista del RM, que comprende medir la concentración de las proteínas NGAL y, opcionalmente, SERPINA3 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

55 En una realización preferente, la concentración de las una o dos proteínas biomarcadoras se mide en una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero o una muestra de orina obtenida de dicho paciente.

Los métodos pueden comprender poner en contacto la muestra biológica con un compañero de unión capaz de interactuar de forma selectiva con las una o dos proteínas biomarcadoras presentes en la muestra biológica. El compañero de unión puede ser un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal. En otra realización, el compañero de unión puede ser un aptámero.

60 Los anticuerpos policlonales o fragmentos de los mismos pueden generarse de acuerdo con métodos conocidos, administrando el antígeno o epítipo apropiado a un hospedador animal seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Para potenciar la producción de anticuerpos se pueden utilizar diversos adyuvantes conocidos en la técnica. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, son preferentes los anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales o un fragmento de los mismos se pueden preparar y aislar utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y aislamiento incluyen, pero sin limitación, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica del hibridoma de linfocitos B de ser humano (Cote *et al.*, 1983) y la técnica del hibridoma-VEB (Cole *et al.* 1985).

Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios anti NGAL o anti SERPINA3. Los anticuerpos útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos anti NGAL o anti SERPINA3 que incluyen, pero sin limitación, fragmentos F(ab')₂, que se pueden generar mediante la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta y fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los enlaces disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir la identificación rápida de fragmentos que tengan la especificidad deseada por NGAL o por SERPINA3. Por ejemplo, se puede utilizar la presentación en fagos de anticuerpos. En tal método, se expresan Fv monocatenarios (scFv) o fragmentos Fab, en la superficie de un bacteriófago adecuado, por ejemplo M13. Brevemente, se retiran células de vaso de un hospedador adecuado que ha sido inmunizado con una proteína, por ejemplo ratón. Las regiones codificantes de las cadenas VL y VH se obtienen de las células que producen el anticuerpo deseado frente a la proteína. Estas regiones codificantes se fusionan después con un extremo de una secuencia de fago. Una vez que el fago se inserta en un transportador adecuado, por ejemplo, bacteria, el fago presenta el fragmento de anticuerpo. También se puede proporcionar la presentación de anticuerpos en fagos mediante métodos combinatorios conocidos para los expertos en la técnica. Los fragmentos de anticuerpo presentados por un fago pueden después utilizarse como parte de un inmunoensayo.

Los anticuerpos monoclonales para NGAL se describen, por ejemplo, en Kjeldsen *et al.*, (1996). Los ejemplos de anticuerpos monoclonales para NGAL disponibles de forma comercial incluyen los obtenidos de Antibody Shop, Copenhague, Dinamarca, como HYB-211-01, HYB-211-02 y NYB- 211-05. Normalmente, HYB-211-01 y HYB-211-02 se pueden utilizar con NGAL en su forma reducida y sin reducir. Los anticuerpos de NGAL también se pueden adquirir de R&D Systems, con la referencia AF1857.

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales para SERPINA3 disponibles de forma comercial incluyen los obtenidos de Abgent, Inc. San Diego y de Sigma-Aldrich Co.

El compañero de unión puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de molécula diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden aislarse a través de Evolución Sistemática de Ligandos mediante Enriquecimiento Exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. 1997. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis de ADN por química combinatoria. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado de forma química, de una secuencia particular. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas, se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpos restringidas conformacionalmente, presentadas mediante una proteína plataforma, tal como Tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan de bibliotecas combinatorias mediante métodos del doble híbrido (Colas *et al.*, 1996).

Los compañeros de unión tales como anticuerpos o aptámeros, pueden estar marcados con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquiera otra etiqueta conocida en la técnica. Se conocen en la técnica etiquetas que en general proporcionan una señal (ya sea directa o indirectamente).

Como se utiliza en el presente documento, el término "etiquetado", con respecto al anticuerpo, pretende abarcar el etiquetado directo del anticuerpo o aptámero mediante acoplamiento (es decir, unión física) de una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)) a un anticuerpo o aptámero, así como el etiquetado indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero se puede marcar con una molécula radiactiva mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radiactivas incluyen, pero sin limitación, un átomo radiactivo para estudios centellográficos, tales como ¹¹²³, ¹¹²⁴, ¹¹¹¹, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re.

Los ensayos mencionados anteriormente en general implican la unión del compañero de unión (es decir, anticuerpo o aptámero) a un soporte sólido. Los soportes sólidos que pueden utilizarse en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en la forma de membrana o de pocillo de microtitulación); polivinil cloruro (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, esferas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilideno; papel diazotizado; membranas de nylon; esferas activadas, esferas sensibles al magnetismo y similares.

La concentración de las una o dos proteínas biomarcadoras se puede medir utilizando técnicas de inmunodiagnóstico convencionales, que incluyen inmunoensayos tales como competición, reacción directa o ensayos de tipo "sándwich".

Tales ensayos incluyen, pero sin limitación, pruebas de aglutinación; inmunoensayos ligados y mediados a enzima, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación.

5 Más particularmente, se puede utilizar un método ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un conjunto de anticuerpos que reconocen dichas una o dos proteínas biomarcadoras. Después, se añade a los pocillos recubiertos una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene dichas una o dos proteínas biomarcadoras. Después de un período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la(s) placa(s) se puede(n) lavar para retirar los restos no unidos y se añade una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de la muestra capturada, se lava la placa y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

15 Los métodos de ELISA adecuados para la detección de NGAL se describieron en Kjeldsen *et al.* (1996), Mishra J. *et al.* (2005) y Wang *et al.* (2007). Blaser J. *et al.* (1995) describió un inmunoensayo de enzimas de tipo sándwich para la detección de NGAL. Xu SY. *et al.* (1994) describió un radioinmunoensayo para la detección de NGAL.

20 Los kits de ELISA para la detección de NGAL están disponibles de forma comercial de Antibody Shop (Grusbakken 8 DK-2820 Gentofte - Dinamarca) con la referencia KIT 036 o KIT 037, de R & D Systems Europe (Lille - Francia) con la referencia DLCN20 y de MBL International, Woburn, MA 01801, EUA), con la referencia CY-8070. Está disponible de forma comercial un inmunoensayo para cuantificar las concentraciones del complejo NGAL/MMP9 de R&D Systems Europe (Lille - Francia) con la referencia DM9L20.

25 Medir la concentración de las una o dos proteínas biomarcadoras (con o sin métodos basados en inmunoensayo) puede también incluir la separación de los compuestos: centrifugación basada en el peso molecular de los compuestos; electroforesis basada en la masa y la carga; HPLC basada en la hidrofobicidad; cromatografía de exclusión por tamaño basada en el tamaño y afinidad de fase sólida basada en la afinidad del compuesto por la fase sólida particular que se utiliza. Una vez separadas, dichas una o dos proteínas biomarcadoras se pueden identificar basándose en el "perfil de separación" conocido por ejemplo, tiempo de retención, para el compuesto y se pueden medir utilizando técnicas convencionales.

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

35 En una realización, el método de la invención comprende una etapa de comparación de la concentración de dichas una o dos proteínas biomarcadoras con un valor umbral predeterminado. Dicha comparación es indicativa de la respuesta del paciente al tratamiento con un antagonista del RM. Normalmente, un paciente humano puede considerarse que es un respondedor al tratamiento si la concentración de la proteína NGAL en sangre antes del tratamiento es mayor que 70 µg/l, preferentemente mayor que 80 µg/l, incluso más preferentemente mayor que 85 µg/l, 90 µg/l, 95 µg/l, 100 µg/l, 125 µg/l, 150 µg/l o 200 µg/l.

40 **Kits de la invención**

45 También se describen kits que comprenden materiales útiles para llevar a cabo el método para evaluar la activación del RM en un paciente y el método para predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento con un antagonista del RM. Estos métodos los pueden realizar laboratorios de diagnóstico, laboratorios experimentales o facultativos. Se divulgan kits que se pueden utilizar en estos distintos entornos.

50 El material y los reactivos para la detección de NGAL y/o SERPINA3 en una muestra biológica se pueden montar juntos en un kit.

También se describe un kit que comprende:

- a) medios para detección de la proteína NGAL; y
- b) medios para la detección de la proteína SERPINA3.

55 Normalmente dicho kit comprende:

- a) un compañero de unión de la proteína NGAL; y
- b) un compañero de unión de la proteína SERPINA3.

60 Normalmente dicho compañero de unión es un anticuerpo.

65 El compañero de unión puede etiquetarse para una detección más sencilla. Puede estar o no inmovilizado sobre una superficie sustrato (por ejemplo, esferas, matriz y similares). Normalmente, puede incluirse en el kit una superficie sustrato (por ejemplo membrana) para la inmovilización del compañero de unión (por ejemplo, mediante electroforesis en gel y transferencia a membrana).

Además, un kit en general también comprende por lo menos un reactivo para la detección de un complejo entre el compañero de unión incluido en el kit y el biomarcador.

- 5 Dependiendo del procedimiento, el kit puede comprender adicionalmente uno o más de: tampón y/o reactivos de extracción y medios de detección. Se pueden incluir en el kit protocolos para el uso de estos tampones y reactivos, para la realización de las distintas etapas del procedimiento.

- 10 Los distintos reactivos incluidos en el kit pueden proporcionarse en una forma sólida (por ejemplo liofilizados) o líquida. Los kits opcionalmente pueden comprender distintos envases (por ejemplo, vial, ampolla, tubo de ensayo, matraz o botella) para cada tampón y/o reactivo individual. En general, cada componente será adecuado como se alícuota en su respectivo envase o se proporcionará en una forma concentrada. También se pueden proporcionar otros envases adecuados para realizar determinadas etapas de los métodos divulgados. Los envases individuales del kit se mantienen preferentemente en confinamiento cerrado para la venta comercial.

- 15 Un kit puede comprender instrucciones para el uso de sus componentes para la predicción del riesgo de insuficiencia cardiaca en un sujeto de acuerdo con un método de la invención. Las instrucciones para el uso del kit de acuerdo con los métodos de la invención pueden comprender instrucciones para procesar la muestra biológica obtenida del sujeto y/o para realizar la prueba, o instrucciones para la interpretación de los resultados. Un kit también puede contener información en la forma que prescribe una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos.

Métodos terapéuticos de la invención:

- 25 El método puede ser útil para clasificar pacientes afectados por enfermedad cardiovascular y después puede utilizarse para elegir el tratamiento preciso para dicho paciente. Por ejemplo, los pacientes clasificados como respondedores o no respondedores pueden recibir así una cantidad apropiada del antagonista del RM.

- 30 Así, tal método puede ayudar al médico a hacer una elección sobre el tratamiento terapéutico. Los costes de los tratamientos por lo tanto pueden adaptarse al riesgo de los pacientes.

Por lo tanto, otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para el tratamiento de un paciente afectado, y/o la prevención en un paciente en riesgo, de una enfermedad, que comprende las etapas que consisten en:

- 35 a) determinar si dicho paciente es un respondedor o un no respondedor a un tratamiento con un antagonista del RM, realizando el método *in vitro* para la predicción de la respuesta de dicho paciente de acuerdo con la invención, en el que el paciente se clasifica como un respondedor si el nivel de expresión de dichos uno o dos biomarcadores en dicho paciente, es mayor que el valor predeterminado obtenido de la población general o de sujetos sanos y
 40 b) administrar un antagonista del RM a dicho paciente, si en la etapa a) se ha determinado que dicho paciente es un respondedor, dicha enfermedad es una enfermedad cardiovascular.

El antagonista del RM puede administrarse en forma de una composición farmacéutica. Preferentemente, dicho antagonista se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 45 Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del antagonista del RM para tratar y/o para prevenir la enfermedad cardiovascular en una proporción beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

- 50 Se comprenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones lo decidirá el médico responsable, dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentes
 55 con el polipéptido específico empleado y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, está dentro de las habilidades de la técnica iniciar las dosis del compuesto en niveles menores de los necesitados para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar de forma gradual la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos se puede variar a lo largo de un amplio intervalo desde 0,01 hasta 1.000 mg por adulto por día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5,
 60 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación para el paciente a tratar. Un medicamento normalmente contiene desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del principio activo, preferentemente desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco se proporciona habitualmente en un nivel de dosificación desde 0,0002 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, en especial desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 7 mg/kg
 65 de peso corporal por día.

Un objetivo adicional de la invención es el uso de un antagonista del RM, para la preparación de un medicamento para tratar a un paciente afectado por una enfermedad cardiovascular, clasificando a dicho paciente como respondedor mediante el método descrito anteriormente.

5 Un objetivo adicional de la invención se refiere a un antagonista del RM para su uso en el tratamiento de un paciente afectado por una enfermedad cardiovascular, clasificando a dicho paciente como respondedor mediante el método de la invención.

10 Se divulga un antagonista del RM para el tratamiento de un paciente afectado por una enfermedad cardiovascular, diabetes, obesidad o síndrome metabólico, en el que dicho paciente tiene un nivel de expresión de los dichos uno o dos biomarcadores mayor que un valor predeterminado, obtenido de la población general o de sujetos sanos.

15 Se divulga adicionalmente el uso de uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en el gen de la Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL) y el gen de SERPINA3, como biomarcador/biomarcadores de la activación del RM en un paciente.

20 Incluso se divulga adicionalmente un método para el control de un tratamiento de un paciente con un antagonista del RM que comprende evaluar la activación del RM mediante el método de acuerdo con la invención y, de forma opcional, comparar el nivel de expresión de los dichos uno o dos biomarcadores, con un valor predeterminado que representa una fase predeterminada de la activación del RM, indicando el nivel de expresión de los dichos uno o dos biomarcadores con respecto al valor predeterminado, la evolución de la activación del RM y por lo tanto el grado de eficacia del tratamiento.

25 La invención se ilustrará adicionalmente a la vista de las figuras y los ejemplos.

Descripción de las figuras

30 **Figura 1A: Evolución temporal de la expresión de NGAL en modelos con sobreexpresión cardíaca condicional del RM.** Lcn2 representa lipocalina2 (NGAL). HPRT representa gen constitutivo de control. Cnt representa ratones miembros de la misma camada de control. DT representa ratones doble transgénicos con sobreexpresión de RMh condicional.

Figura 1B: Expresión de la proteína NGAL en el corazón de RM. Lcn2 representa lipocalina2 (NGAL). GAPDH representa proteína constitutiva de control. Cnt representa ratones de control miembros de la misma camada. DT representa ratones doble transgénicos con sobreexpresión de RMh condicional.

35 **Figura 2: Expresión de NGAL en el corazón de RM frente a ratones que sobreexpresan GR.** Lcn2 representa lipocalina2 (NGAL). HPRT representa gen constitutivo de control. Cnt representa ratones de control miembros de la misma camada. DT representa ratones doble transgénicos con sobreexpresión de RMh o de RGh condicional.

40 **Figura 3: Expresión de NGAL en diversos modelos.** A y B: PCR cuantitativa; C y D: ELISA. Cnt representa ratones de control miembros de la misma camada. DT representa ratones dobles transgénicos con sobreexpresión de RMh condicional. Aldo-sal significa ratones uninefrectomizados tratados con infusión de aldosterona y que beben NaCl al 1 %. La expresión del RM específica de endotelios se obtiene mediante la expresión del RM condicional dirigida solo al endotelio.

45 **Figura 4: Expresión de NGAL en un modelo celular de cardiomiocitos de rata (células H9C2) que expresan de forma estable el RM de rata.** Cnt representa control (diluyente). Aldo y cortico representan aldosterona y corticosterona, respectivamente. RU28318 es un antagonista del RM, RU 486 es un antagonista del RG. β actina es un gen constitutivo utilizado para la normalización.

Figura 5A: Expresión de NGAL en un modelo de ratón de diabetes de tipo II. Lcn2 representa lipocalina2 (NGAL). Cnt representa ratones de control miembros de la misma camada. Db/db representan ratones diabéticos.

50 **Figura 5B: Evolución de los niveles plasmáticos de lipocalina2/NGAL.** Lcn2 plasmática en ratones de control y db/db, con y sin tratamiento con canrenoato durante 17 semanas.

55 **Figura 6: Inducción dependiente de RM de la lipocalina2/NGAL en el corazón y el plasma de ratas con insuficiencia cardíaca.** A. La expresión de lipocalina2/NGAL aumenta 2 veces en el ventrículo izquierdo del corazón de ratas con insuficiencia cardíaca inducida por caquexia. La inducción se previene completamente mediante la dosis eficaz de espirolactona (50 mg/kg/día, capaz de prevenir los síntomas de insuficiencia cardíaca). B. Los niveles plasmáticos de lipocalina2/NGAL también aumentan en el plasma de la rata con insuficiencia cardíaca (Figura 6B). El aumento se previene cuando los animales se tratan con espiro 50 mg/kg/d (IC + espiro 50 mg/kg/d frente a IC).

60 **Figura 7: Validación de los genes diferenciales identificados en el análisis de micromatrices en el modelo de ratón de sobreexpresión cardíaca de RM.** Se aumenta de forma significativa la expresión de Serpina3 en el corazón de ratones que sobreexpresan el RM (DT-RM), pero no se modifica en el corazón de ratones que sobreexpresan RG (DT-RG). Los valores de los niveles de ARNm se normalizaron en cada muestra para los valores del ARNm de ubc. Estos valores en el control se establecieron como 1 para cada gen y en la figura se muestran los cambios en veces. *, $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al control, utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

65 **Figura 8: Especificidad de RM de la expresión de serpina3 en células H9C2/RM.** Mediante aldosterona (aldo) 1 nM y corticosterona (cortico) 10 nM durante 24 h, se aumenta la expresión de serpina3 mediante un mecanismo dependiente del RM, como se muestra utilizando RU28318, un antagonista específico del RM. Los valores de los

niveles del ARNm se normalizaron en cada muestra para los niveles del ARNm de β actina. Estos valores en el control (células no tratadas) se establecieron como 1 para cada gen, y en la figura se muestran los cambios en veces. **, $p < 0,01$ frente al control (no esteroide), utilizando análisis de ANOVA.

Figura 9A: Evolución temporal de la inducción de Serpina3 en células H9C2/RM tratadas con aldosterona 10 nM. La expresión de Serpina3 se induce de forma muy alta después de 24 horas de exposición a la aldosterona. Los valores de los niveles de ARNm se normalizaron en cada muestra para los niveles de ARNm de la β actina. Estos valores en el control (células no tratadas) se establecieron como 1 para cada gen, y se muestran en la figura los cambios en veces. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ frente al control (no esteroide), utilizando análisis de ANOVA.

Figura 9B: Respuesta dependiente de la dosis de la inducción de Serpina3 con aldosterona.

La inducción de la expresión de Serpina3 mediante la aldosterona es dependiente de la dosis. Los valores de los niveles del ARNm se normalizaron en cada muestra para los niveles del ARNm de la β actina. Estos valores en el control (células no tratadas) se establecieron como 1 para cada gen, y en la figura se muestran los cambios en veces. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ frente al control (no esteroide), utilizando análisis de ANOVA.

Figura 10: Inducción de Serpina 3 dependiente del RM en el corazón de ratas con insuficiencia cardíaca.

La expresión de Serpina3 aumenta de forma muy alta en el ventrículo izquierdo del corazón de ratas con insuficiencia cardíaca inducida por caquexia. La inducción se previene mediante la dosis eficaz de espironolactona (50 mg/kg/día, capaz de evitar los síntomas de insuficiencia cardíaca). **, $p < 0,01$ frente a simulado; #, $p < 0,05$, frente a Placebo (insuficiencia cardíaca, administración de placebo) utilizando análisis de ANOVA.

EJEMPLO 1

Ratones transgénicos para RM y RG: Los ratones transgénicos para el receptor de mineralocorticoides (RM) y el receptor de glucocorticoides (RG) permiten la expresión condicional del RM y el RG de ser humano, respectivamente. Los ratones transgénicos para RM y RG se obtuvieron mediante reproducción de los ratones aceptores generados en el laboratorio, que permitió la expresión condicional, inducible del RMh o del RGh cuando se cruzaban con los ratones transactivadores apropiados. Estos modelos transgénicos condicionales se han descrito en Ouvrard-Pascaud *et al.* (2005) y Sainte-Marie *et al.* (2007). Para identificar los genes modulados de forma selectiva en el corazón mediante el RM, los ratones aceptores de RM y RG se cruzaron con los ratones transactivadores de MHC-tTA proporcionados por G. Fishman, Universidad de Colombia, NY, EUA) (Yu *et al.* 1996), que permiten la expresión del RMh y del RGh específica de cardiomiocitos, respectivamente. Esto dio como resultado una sobreexpresión de 4 veces del RM o el aumento de 3 veces en la unión de glucocorticoide en el corazón de los ratones condicionales para RM o RG, respectivamente, en comparación con los miembros de la misma camada de control. Para evitar la letalidad prematura embrionaria, la progenie RM se trató con Dox desde la gestación hasta el nacimiento, permitiendo que se produzca la expresión solo el día 7 después del nacimiento.

Muestras, aislamiento de ARN, etiquetado e hibridación: Se aisló ARN total de corazones completos procedentes de 5 ratones transgénicos para RM de un mes, 5 ratones transgénicos para RG de un mes, utilizando reactivo TRIZOL® (Life technologies). Las muestras de referencia para los ratones transgénicos para RM consistían de ARN total de corazón entero extraído de 5 miembros de la misma camada de control (misma edad, misma reproducción) de los ratones transgénicos para RM. Las muestras de referencia para los ratones transgénicos para RG consistían de ARN total de corazón entero extraídas de 5 miembros de control de la misma camada (misma edad, misma cría) que los ratones transgénicos para el RG. El ARNm se aisló utilizando el kit Oligotex ARNm (Qiagen). La calidad del ARN y del ARNm se evaluó utilizando un bioanalizador Agilent 2100. El ARNm procedente de ratones transgénicos para RM se agrupó y se marcó con Cy3 en tres reacciones distintas. El ARNm procedente de la referencia para los ratones transgénicos para RM se agrupó y marcó con Cy3 en tres reacciones distintas. El ARNm procedente de ratones transgénicos para RG se combinó en tres grupos que se marcaron cada uno con Cy5 en dos reacciones distintas. El ARNm procedente de la referencia para los ratones transgénicos para RG se agrupó y marcó con Cy3 en seis reacciones distintas. Los ADNc marcados con Cy3 y Cy5 se prepararon utilizando el kit CyScribe ADNc Post Labeling (Amersham Pharmacia Biotech). Las reacciones de etiquetado se realizaron de forma separada para cada micromatriz. Se realizaron tres hibridaciones de micromatrices para los ratones transgénicos para RM y seis para los ratones transgénicos para RG. La mezcla de hibridación se preincubó con ADN de Cot-I de ser humano (Gibco-BRL), ARNt de levadura y ARN poliA, y se hibridó con una micromatriz.

Micromatrices: Las micromatrices se prepararon en el laboratorio utilizando sondas de oligonucleótidos de 50-meros (MWG Biotech®). Las sondas se aplicaron de forma puntual sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con epoxisilano utilizando Lucidea Array Spotter de Amersham. Los 5419 genes que se representaron en la micromatriz se habían seleccionado por su implicación en el funcionamiento normal y patológico del músculo cardiovascular y/o esquelético. La selección estaba basada en 1) experimentos de hibridación sustractiva (Steenman *et al.* 2005), 2) hibridaciones en micromatriz de barrido genómico (Steenman *et al.* 2003) y 3) datos de la bibliografía. La micromatriz contenía oligonucleótidos específicos de ratón y oligonucleótidos de ser humano con homología de por lo menos el 80 % con la secuencia de ratón correspondiente. Cada sonda génica se aplicó de forma puntual por triplicado.

Extracción de los datos sin procesar y consolidación: Las matrices hibridadas se escanearon mediante microscopía confocal de fluorescencia (Scanarray 4000XL, GSI-Lumonics). Las mediciones de la señal de fluorescencia se obtuvieron de forma separada para cada fluorocromo a una resolución de 10 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Las intensidades de las señales de hibridación y de fondo, y los parámetros de control de calidad se midieron utilizando

GenePix Pro 5.0 (Axon®). Se realizó un procedimiento de normalización Lowess (Yang *et al.* 2002) para corregir los sesgos técnicos. El procedimiento se aplicó canal por canal como se describió anteriormente (Workman *et al.* 2002). Para cada micromatriz, las intensidades de la señal de Cy3 y de Cy5 se normalizaron de forma individual con respecto a un prototipo definido, como el perfil promedio de todas las intensidades de la señal de Cy3 o Cy5.

5 **Análisis estadísticos de las micromatrices:** Se utilizaron para identificar genes con expresión diferencial estadísticamente significativa el Análisis de Significación de Micromatrices (ASM) (Tusher *et al.* 2001) y los Modelos Lineales para datos de Micromatrices (Limma) (Smyth 2004). Se utilizó análisis de una clase para identificar genes expresados de forma diferencial entre los ratones transgénicos y de referencia, y se utilizó análisis de dos clases para
10 identificar genes expresados de forma diferencial entre ambos modelos de ratones transgénicos. El análisis de una clase de los ratones transgénicos para RM dio como resultado la identificación de 520 genes que se identificaron mediante ASM (TFD (tasa de falso descubrimiento) = 0,05 %) y Limma (corrección "TFD", $p < 0,01$). El análisis de una clase de los ratones transgénicos para RG dio como resultado la identificación de 1232 genes que se identificaron mediante ASM (TFD = 0,03 %) y Limma (corrección "TFD", $p < 0,01$). El análisis de dos clases dio como resultado la
15 identificación de 529 genes que se identificaron mediante ASM (TDF = 0,09 %) y Limma (corrección "TDF", $p < 0,01$).

Expresión de NGAL en diversos modelos de ratón transgénicos o farmacológicos con activación del RM: La expresión cuantitativa del ARNm de NGAL se analizó mediante PCR cuantitativa (Q-PCR, Light Cycler, Biorad) utilizando los cebadores directo 5'-GGACCAGGGCTGTCGCTACT-3' (SEQ ID NO: 1) e inverso
20 5'-GGTGGCCACTTGACATTGT-3' (SEQ ID NO: 2) en 25 μ l de RT-PCR (utilizando el kit qPCR Core para Sybr Green I de Eurogentec), preparados utilizando 2 μ g de ARN total sin ADN extraído de corazón de ratones transgénicos para RM de uno, dos y tres meses y comparados con los miembros de la misma camada correspondientes, así como ratones transgénicos para RG de dos meses (y los respectivos miembros de la misma camada de control). La expresión de proteína para NGAL se analizó en extractos de proteína cardíacos procedentes de ratones para RM de
25 dos meses utilizando un anticuerpo específico de NGAL (AF1857, R&D Systems). La concentración plasmática de NGAL se estimó utilizando un ensayo de ELISA específico para NGAL murina (proporcionado por A. Xu, Hong-Kong) (Wang *et al.*, 2007)

30 La expresión cuantitativa del ARNm de NGAL también se analizó mediante Q-PCR en el corazón de ratones con uninefrectomía y tratados con infusión de aldosterona (60 μ g/kg/d, minibombas ALZET de 0,25 μ l/h) y sal al 1 % en agua potable durante 3 semanas (en comparación con los ratones solo uninefrectomizados de control), y en la aorta torácica de ratones de 9 meses con sobreexpresión condicional del RM de ser humano, obtenida solo después de la reproducción apropiada de los ratones transgénicos para RM descritos anteriormente con un ratón transactivador específico de endotelio (que proporcionó L. E. Benjamine, Harvard, EUA) (Sun *et al.*, 2005) que permitió la expresión
35 condicional del RMh solo en el endotelio.

Se estimó también en el plasma de ratones de 3 meses la concentración plasmática de NGAL con uninefrectomía y tratados con infusión de aldosterona (60 μ g/kg/d, minibombas ALZET de 0,25 μ l/h) y sal al 1 % en agua potable durante 3 semanas (en comparación con ratones de control solo uninefrectomizados), así como en ratones de 9 meses
40 con sobreexpresión del RM específica de endotelio, en comparación con los miembros de la misma camada de control.

Expresión de NGAL en un modelo celular de cardiomiocitos de rata (células H9C2) que sobreexpresan de forma estable RM de rata (Fejes-toth, Endocrinology, 2007)

45 La expresión cuantitativa del ARNm de NGAL se analizó mediante PCR cuantitativa (Q-PCR, Light Cycler, Biorad) utilizando los cebadores directo 5'-TCACCCTGTACGGAAGAACC-3' (SEQ ID NO: 3) e inverso 5'-GGTGGGAACAGAGAAAACGA-3' (SEQ ID NO: 4) en 25 μ l de RT-PCR (utilizando el kit qPCR Core para Sybr Green I de Eurogentec) preparado utilizando 2 μ g de ARN total sin ADN extraído de células H9-C2/RM de rata tratadas con diversas concentraciones de aldosterona o con corticosterona 10^{-8} M o con antagonista del RM RU 28318 o
50 antagonista del RG RU 486 10^{-6} M, solos o en combinación.

Expresión de NGAL en un modelo de ratón de diabetes tipo II (ratones db/db con una mutación espontánea en el gen del receptor de leptina)

55 Se estimó la concentración plasmática de NGAL, utilizando un ensayo ELISA específico para NGAL murino (que proporcionó A. Xu, Hong-Kong) (Wang *et al.*, 2007), en ratones db/db antes y después del tratamiento con el antagonista farmacológico del RM canrenoato, Sigma-Aldrich, 100 mg/kg/día en agua potable, 45 días)

Resultados:

60 El ARNm de Lipocalina2/NGAL se expresa de forma fuerte (x 60-200) en el corazón de ratones con sobreexpresión condicional del RM de ser humano (DT), en comparación con los miembros de la misma camada de control (Cnt) a la edad de 1, 1,5 o 3 meses (Figura 1A). La proteína Lipocalina2/NGAL también se indujo fuertemente en el corazón de ratones de 1,5 meses con sobreexpresión condicional del RM de ser humano (DT), en comparación con los miembros
65 de la misma camada de control (Cnt) (Figura 1B). Esto es altamente sensible dado que la inducción de la expresión de la lipocalina2/NGAL en los miembros de la misma camada de control nunca superó x 1,3. La especificidad sobre el RG,

estrechamente relacionado, se evaluó analizando la expresión de lipocalina/NGAL en el corazón de ratones que sobreexpresan RG de 2 meses (Figura 2). La expresión de la NGAL se indujo 75 veces más en el corazón de ratones que sobreexpresan el RM que en ratones que sobreexpresan el RG.

5 La expresión de Lipocalina2/NGAL aumenta en el corazón de ratones con 3 semanas de estimulación farmacológica del RM (modelo aldo/sal) así como en la aorta de ratones de 9 meses con sobreexpresión condicional del RM dirigida al endotelio (DT, en comparación con los miembros de la misma camada, Cnt) (Figura 3 A-C). Cabe destacar que los niveles plasmáticos de lipocalina2/NGAL también aumentan en estos dos modelos de ratón, sugiriendo la secreción a partir de la pared endotelial (Figura 3 B-D).

10 La expresión de Lipocalina2/NGAL aumenta en las células H9C2/RM tratadas con aldosterona 10^{-8} M durante 24 horas (Figura 4A). Este aumento de la expresión de Lipocalina2/NGAL se evita mediante la adición a la aldosterona 10^{-8} M de antagonista del RM RU 28318, pero no con el antagonista del RG RU 486 (Figura 4A). La corticosterona 10^{-8} M (una hormona glucocorticoide) también estimuló la expresión de Lipocalina2/NGAL en células H9C2/RM (Figura 4B). Este aumento también se evita mediante el antagonista del RM RU 28318, pero no mediante el antagonista del RG RU 486 (Figura 4B), lo que indica que la corticosterona también estimula la expresión de Lipocalina2/NGAL a través del RM. El evolución temporal del estudio indicó que la expresión de Lipocalina2/NGAL se indujo después de 24 horas de aldosterona 10^{-8} M y se mantuvo sostenida después de 48 horas de estimulación (Figura 4C). La expresión de Lipocalina2/NGAL se estimula mediante concentraciones crecientes de aldosterona, indicando un efecto mediado por el RM específico (Figura 4D).

Los niveles plasmáticos de lipocalina2/NGAL también aumentan en el plasma de un modelo de ratón de diabetes tipo II (db/db) (Figura 5A y Figura 5B, control frente a db/db). También se analizó en estos ratones el efecto de 17 semanas antagonismo farmacológico del RM.

25 La Figura 5B representa los niveles plasmáticos de lipocalina2/NGAL en los ratones de control y db/db, con y sin tratamiento con canrenoato. El aumento de los niveles plasmáticos de lipocalina2/NGAL en ratones db/db se evita mediante el tratamiento *in vivo* de 17 semanas de los ratones db/db con el antagonista del RM canrenoato (Figura 5B, db/db + canrenoato). El canrenoato no tuvo efecto sobre los niveles plasmáticos de lipocalina2/NGAL en los ratones de control (control + canrenoato). Esto demuestra que el nivel plasmático de lipocalina2/NGAL se puede utilizar para seguir la eficacia de los antagonistas del RM en la diabetes de tipo II.

35 En un modelo de rata de insuficiencia cardíaca (IC) asociada con caquexia, la expresión cardíaca del ARNm de lipocalina2/NGAL, estimada mediante PCR en tiempo real, se indujo hasta 2 veces (simulado frente a IM) (Figura 6A). Cuando se administra espirolactona a una concentración eficaz para prevenir el desarrollo de síntomas de insuficiencia cardíaca (IC + espiro 50 mg/kg/d frente a IC) la inducción del ARNm de lipocalina2/NGAL se evita de forma completa (Figura 6A). Los niveles plasmáticos de lipocalina2/NGAL también aumentan en el plasma de las ratas con insuficiencia cardíaca (Figura 6B). El aumento se evita cuando los animales se tratan con espiro 50 mg/kg/d (IC + espiro 50 mg/kg/d frente a IC).

40 Por lo tanto, la activación del RM se puede evaluar de forma específica y eficaz determinando el nivel de expresión del gen NGAL. La respuesta de un paciente a un tratamiento con un antagonista del RM o un inhibidor de la aldosterona sintasa se puede predecir determinando el nivel de expresión del gen de NGAL en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

45 EJEMPLO 2

Se ha medido el nivel plasmático de Lcn2/NGAL en una población de sujetos sanos.

50 Se incluyeron en el estudio hombres y mujeres con edades entre los 18 y 85 años, a condición de que no hubiesen presentado patología aguda en los últimos 7 días y que no estuvieran bajo ningún tratamiento cardiovascular. Los criterios de exclusión adicionales para los controles sanos fueron: tensión sanguínea alta conocida (mayor que 140/190 mmHg o mayor que 160 mmHg si eran mayores de 65 años); insuficiencia renal conocida, diabetes conocida, embarazo, cáncer diagnosticado dentro de los 5 últimos años o neoplasia evolutiva, patología hepática crónica, conectivitis, enfermedad de Crohn, tuberculosis evolutiva, angina de esfuerzo, síndrome coronario agudo, historial de coronopatía, endoarteriectomía carotídea y aneurisma aórtico abdominal conocido.

El nivel plasmático de Lcn2/NGAL de los sujetos sanos en general estaba comprendido entre los 40 y 80 μ g/ml.

60 También se midió el nivel plasmático de Lcn2/NGAL de pacientes afectados de una enfermedad cardiovascular, diabetes, obesidad o síndrome metabólico. Es mayor que el de los sujetos sanos.

EJEMPLO 3

65 La sobreexpresión crónica del RM o del RG en cardiomiocitos puede conducir a rutas de señalización modificadas, lo que representa adaptaciones de las células, que no son las inducidas mediante el tratamiento de corto plazo con

corticosteroide. Para analizar las consecuencias moleculares de la activación crónica del RM en el corazón *in vivo*, los inventores investigaron la expresión génica cardíaca de ratones con RM cardíaco utilizando Cardiochips®, es decir, micromatrices que incluían 5419 genes que se habían seleccionado por su implicación en el funcionamiento normal y patológico del músculo cardiovascular y/o esquelético. La sobreexpresión del RM de cardiomiocitos durante 6 semanas dio como resultado aproximadamente 24 genes regulados de forma positiva y 23 regulados de forma negativa. Cabe destacar que la mayoría de ellos difirieron de los genes regulados por el RG, que se determinaron en paralelo en ratones con RG cardíaco (aproximadamente 74 genes regulados de forma positiva de RG y 70 genes regulados de forma negativa de RG). Además, la mayoría de los genes regulados por RM no cambiaron en el modelo de ratón de GR cardíaco, indicando que cada receptor esteroide controla un patrón distinto de expresión génica en cardiomiocitos.

Ratones transgénicos para RM y RG: Los ratones transgénicos para el receptor de mineralocorticoides (RM) y el receptor de glucocorticoides (RG) permitieron la expresión condicional del RM y el RG de ser humano, respectivamente. Los ratones transgénicos para RM y RG se obtuvieron mediante reproducción del ratón aceptor generado en el laboratorio, que permitió la expresión condicional inducible del RMh y del RGh cuando se cruzó con el ratón transactivador apropiado. Estos modelos transgénicos condicionales se han descrito en Ouvrard-Pascaud *et al.* (2005) y Sainte-Marie *et al.* (2007). Para identificar genes modulados de forma selectiva en el corazón mediante el RM, los ratones aceptores RM y RG se cruzaron el ratón transactivador MHC-tTA que proporcionó G. Fishman, Universidad de Columbia, NY, EUA) (Yu *et al.* 1996), lo que permitió la expresión específica en cardiomiocitos del RMh y del RGh, respectivamente. Esto dio como resultado la sobreexpresión de 4 veces del RM y el aumento en 3 veces de la unión de glucocorticoide en el corazón de los ratones condicionales para RM y RG, respectivamente, en comparación con los miembros de la misma camada de control. Para evitar la letalidad embrionaria prematura, la progenie RM se trató con Dox desde la gestación hasta el nacimiento, lo que permitió que se produzca la expresión solo en el día 7 después del nacimiento.

Muestras, aislamiento de ARN, etiquetado e hibridación: Se aisló ARN total de corazones enteros de 5 ratones transgénicos para RM de 1 mes y 5 ratones transgénicos para RG de un mes utilizando reactivo TRIZOL® (Life technologies). Las muestras de referencia para los ratones transgénicos para RM consistieron en ARN total de corazón entero extraído de 5 miembros de control de la misma camada (misma edad, misma reproducción) de los ratones transgénicos para RM. Las muestras de referencia para los ratones transgénicos para RG consistieron en ARN total de corazón entero extraído de 5 miembros de control de la misma camada (misma edad, misma reproducción) de los ratones transgénicos para RG. El ARNm se aisló utilizando el kit Oligotex ARNm (Qiagen). La calidad del ARN y del ARNm se evaluó utilizando un bioanalizador Agilent 2100. El ARNm procedente de ratones transgénicos para RM se agrupó y marcó con Cy5 en tres reacciones distintas. El ARNm procedente de la referencia para los ratones transgénicos para RM se agrupó y marcó con Cy3 en tres reacciones distintas. El ARNm procedente de ratones transgénicos para RG se combinó en tres grupos que se marcaron, cada uno, con Cy5 en dos reacciones distintas. El ARNm procedente de la referencia para los ratones transgénicos para RG se agrupó y marcó con Cy3 en seis reacciones distintas. El ADNc marcado con Cy3 y Cy5 se preparó utilizando el kit CyScribe ADNc Post Labeling (Amersham Pharmacia Biotech). Las reacciones de etiquetado se realizaron de forma separada para cada micromatriz. Se realizaron tres hibridaciones de micromatriz para los ratones transgénicos para RM y seis para los ratones transgénicos para RG. La mezcla de hibridación se preincubó con ADN de Cot-I de ser humano (Gibco-BRL), ARNt de levadura y ARN poliA, y se hibridó con una micromatriz.

Micromatrices: Las micromatrices se prepararon en el laboratorio utilizando sondas de oligonucleótidos de 50-meros (MWG Biotech®). Las sondas se aplicaron puntualmente sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con epoxisilano, utilizando el Lucidea Array Spotter de Amersham. Los 5419 genes que estaban representados en la micromatriz se habían seleccionado por su implicación en el funcionamiento normal y patológico del músculo cardiovascular y/o esquelético. La selección estaba basada en 1) experimentos de hibridación sustractiva (Steenman *et al.* 2005), 2) hibridaciones en micromatriz de barrido genómico (Steenman *et al.* 2003) y 3) datos de la bibliografía. La micromatriz contenía oligonucleótidos específicos de ratón y oligonucleótidos de ser humano con homología de por lo menos el 80 % con la secuencia de ratón correspondiente. Cada sonda génica se aplicó puntualmente por triplicado.

Extracción de los datos sin procesar y consolidación: Las matrices hibridadas se escanearon mediante microscopía confocal de fluorescencia (Scanarray 4000XL, GSI-Lumonics). Las mediciones de la señal de fluorescencia se obtuvieron de forma separada para cada fluorocromo, a una resolución de 10 µm/píxel. Las intensidades de la señal de hibridación y de fondo, y los parámetros de control de calidad se midieron utilizando GenePix Pro 5.0 (Axon®). Se realizó un procedimiento de normalización Lowess (Yang *et al.* 2002) para corregir los sesgos técnicos. El procedimiento se aplicó canal por canal, como se describió anteriormente (Workman *et al.* 2002). Para cada micromatriz, las intensidades de señal de Cy3 y Cy5 se normalizaron de forma individual con respecto a un prototipo definido como el perfil promedio de todas las intensidades de señal de Cy3 o de Cy5.

Análisis estadístico de las micromatrices: Para identificar genes con expresión diferencial estadísticamente significativa, se utilizó el Análisis de Significación de Micromatrices (ASM) (Tusher *et al.* 2001) y los Modelos Lineales para datos de Micromatriz (Limma) (Smyth 2004). Se utilizó análisis de una clase para identificar genes expresados de forma diferencial entre ratones transgénicos y de referencia, y se utilizó análisis de dos clases para identificar genes expresados de forma diferencial entre ambos modelos de ratones transgénicos. El análisis de una clase de los ratones

transgénicos para RM dio como resultado la identificación de 520 genes que se identificaron mediante ASM (TFD (tasa de falso descubrimiento) = 0,05 %) y Limma (corrección "TFD", $p < 0,01$). El análisis de una clase de los ratones transgénicos para RG dio como resultado la identificación de 1232 genes que se identificaron mediante ASM (TFD = 0,03 %) y Limma (corrección "TFD", $p < 0,01$). El análisis de dos clases dio como resultado la identificación de 529 genes que se identificaron mediante ASM (TFD = 0,09 %) y Limma (corrección "TFD", $p < 0,01$).

Expresión de *serpina3* en modelos de ratón transgénico con activación del RM o del RG: La expresión cuantitativa del ARNm de *Serpina3* se analizó mediante PCR cuantitativa (Q-PCR, Light Cycler, Biorad) utilizando los cebadores directo 5'-CATCCCTGTGGGAAGTCAGT-3' (SEQ ID NO: 5) e inverso 5'-CTTTTGGGTGGAGGCAGATA-3' (SEQ ID NO: 6), en 25 μ l de RT-PCR (utilizando el kit qPCR Core para Sybr Green I de Eurogentec), preparados utilizando 2 μ g de ARN total sin ADN extraído de corazón de ratones transgénicos para RM de uno, dos y tres meses y en comparación con los miembros de la misma camada correspondientes, así como con ratones transgénicos para RM de dos meses (y los miembros de la misma camada de control respectivos).

15 Expresión de *Serpina3* en un modelo celular de cardiomiocitos de rata (células H9C2) que sobreexpresan de forma estable RM de rata (Fejes-toth, Endocrinology, 2007)

La expresión cuantitativa del ARNm de *Serpina3* se analizó mediante PCR cuantitativa (Q-PCR, Light Cycler, Biorad) utilizando los cebadores directo 5'-AGACAAGGGGACACAACACTGG-3' (SEQ ID NO: 7) e inverso 5'-TGAGATGCTAAGTGGGGAGAA-3' (SEQ ID NO: 8), en 25 μ l de RT-PCR (utilizando el kit qPCR Core kit para Sybr Green I de Eurogentec), preparados utilizando 2 μ g de ARN total sin ADN extraído de células H9-C2/RM de rata tratadas con diversas concentraciones de aldosterona o con corticosterona 10^{-8} M o con antagonista del RM RU 28318 10^{-6} M, solos o en combinación.

25 Expresión de *Serpina3* en un modelo de rata de insuficiencia cardíaca inducida por caquexia. Efecto del antagonismo farmacológico del RM con espirolactona

La expresión cuantitativa del ARNm de *Serpina3* se analizó mediante PCR cuantitativa (Q-PCR, Light Cycler, Biorad) utilizando los cebadores directo 5'-AGACAAGGGGACACAACACTGG-3' (SEQ ID NO: 7) e inverso 5'-TGAGATGCTAAGTGGGGAGAA-3' (SEQ ID NO: 8), en 25 μ l de RT-PCR (utilizando el kit qPCR Core para Sybr Green I de Eurogentec), preparados utilizando 2 μ g de ARN total sin ADN extraído de ventrículos izquierdos.

Resultados:

35 La expresión del ARNm del inhibidor de la serina proteasa SERPINA3 (o alfa1-antiquimotripsina), estaba regulado de forma positiva x25 en el corazón de ratones con RM cardíaco, aunque que no varió significativamente en ratones con RG cardíaco, como se determinó mediante PCR en tiempo real.

(Figura 7).

40 Para investigar los posibles vínculos entre los efectos crónicos del RM y los producidos más temprano, se analizaron en la línea celular H9C2/RM+ algunos de los genes regulados por el RM *in vivo* identificados en los ratones con RM cardíaco. En presencia de dosis bajas de aldosterona (1 nM) durante 24 horas, el ARNm de SERPINA3 se indujo aproximadamente 8 veces (Figura 8). La inducción se suprimió en presencia del antagonista de RM RU 28318, lo que demostró que está implicado en interacciones específicas con el RM. Se debe destacar que la corticosterona 10 nM tiene efectos similares que la aldosterona, que se evitaron con el antagonista del RM (Figura 8). La evolución temporal del experimento (Figura 9A) indicó que la *serpina3* se induce mediante Aldosterona 10 nM después de 10 horas, con una fuerte inducción (x 15) después de 24 horas. Se observa inducción dependiente de la concentración, comenzando con aldosterona 1 nM (Figura 9B).

50 En un modelo de rata de insuficiencia cardíaca (IC) asociada con caquexia, la expresión cardíaca del ARNm de *Serpina3*, estimado mediante PCR en tiempo real, se induce hasta 6 veces (simulado frente a IC) (Figura 10). Cuando se administra espirolactona a una concentración eficaz para prevenir el desarrollo de síntomas de insuficiencia cardíaca (IC +espiro 50 mg/kg/d frente a IC), se evita de forma completa la inducción del ARNm de *Serpina3* (Figura 10).

60 Estos datos muestran que SERPINA3 está implicada en la respuesta temprana a la aldosterona en cardiomiocitos, así como en la adaptación crónica a la señalización potenciada del RM, como se observa en ratones que sobreexpresan el RM. Debido a que *serpina3* es una enzima secretada, puede utilizarse como marcador del daño cardíaco vinculado a la activación del RM.

REFERENCIAS:

65 A lo largo de esta aplicación diversas referencias describen el estado de la técnica a la cual pertenece la presente invención.

- Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*. 1995 Dic 15;83(6):851-7.
- Blaser J, Triebel S, Tschesche H. A sandwich enzyme immunoassay for the determination of neutrophil lipocalin in body fluids. *Clin Chim Acta*. 1995;235(2):137-145.
- 5 Bonvalet JP, Alfaidy N, Farman N, Lombes M. Aldosterona: intracellular receptors in human heart. *Eur Heart J*. 1995 Dic;16 Sup. N:92-7.
- Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med*. 1992 Dic;120(6):893-901.
- 10 Caprio M, Feve B, Claes A, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J*. 2007;21(9):2185-94.
- Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R. (1996) Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 380, 548-50.
- Cote RJ, Morrissey DM, Houghton AN, Beattie EJ Jr, Oettgen HF, Old LJ. Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983 Abr;80(7):2026-30.
- 15 Farquharson CA, Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000 Feb 15;101(6):594-7.
- Fiebler A, Nussberger J, Shagdarsuren E, Rong S, Hilfenhaus G, Al-Saadi N, Dechend R, Wellner M, Meiners S, Maser-Gluth C, Jeng AY, Webb RL, Luft FC, Muller DN. Aldosterona synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage. *Circulation*. 2005 Jun 14;111(23):3087-94. Epub 2005 Jun 6.
- 20 Funder JW. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. *Annu Rev Med*. 1997;48:231-40. Revisión.
- Funder JW. Mineralocorticoid receptors and cardiovascular damage: it's not just aldosterona *Hypertension*. 2006; 47(4):634-5. Revisión.
- 25 Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H. Vascular aldosterona. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1994 Sep 30;269(39):24316-20.
- Kjeldsen L, Johnsen A, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. 1993 May 15;268(14):10425-32.
- 30 Kjeldsen L, Koch C, Arnljots K, Borregaard N. Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils. *J Immunol Methods*. 1996 Nov 13;198(2):155-64.
- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Ago 7;256(5517):495-7.
- 35 Lamounier-Zepter V, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Mineralocorticoid-stimulating activity of adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005 19(4):567-75. Revisión.
- Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res*. 1992 Sep;71(3):503-10.
- Mishra J, Dent C, Tarabishi R *et al*. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury following cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365: 1231-1238.
- 40 Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara S, Noda A, Kimata H, Kato T, Izawa H, Murohara T, Yokota M. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterona hypertensive rats. *Hypertension*. 2006 47(4):656-64.
- Ouvrard-Pascaud A, Sainte-Marie Y, Benitah JP, Perrier R, Soukaseum C, Cat AN, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Demolombe S, Mechta-Grigoriou F, Beggah AT, Maison-Blanche P, Oblin ME, Delcayre C, Fishman GI, Farman N, Escoubet B, Jaisser F. Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2005 Jun 14;111(23):3025-33. Epub 2005 Jun 6.
- 45 Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M; Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. Eplerenone, a selective aldosterona blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003 Abr 3;348(14):1309-21. Epub 2003 Mar 31. Erratum in: *N Engl J Med*. 2003 May 29;348(22):2271.
- 50 Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *andomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2;341(10):709-17.
- Sainte-Marie Y, Cat AN, Perrier R, Mangin L, Soukaseum C, Peuchmaur M, Tronche F, Farman N, Escoubet B, Benitah JP, Jaisser F. Conditional glucocorticoid receptor expression in the heart induces atrio-ventricular block. *FASEB J*. 2007 May 21.
- 55 Schepkens H, Vanholder R, Billiouw JM, Lameire N. Life-threatening hyperkalemia during combined therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors and spironolactone: an analysis of 25 cases. *Am J Med*. 2001 Abr 15;110(6):438-41.
- 60 Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, *et al*. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(2):407-413.
- Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C. Myocardial production of aldosterona and corticosterone in the rat. *Physiological regulation*. *J Biol Chem*. 1998 Feb 27;273(9):4883-91.
- 65 Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3[1], Artículo 3. 2004.

Steenman M, Chen Y-W, Le Cunff M, Lamirault G, Varro A, Hoffman E, Leger JJ (2003) Transcriptional analysis of failing and non-failing human hearts. *Physiol Genomics* 12:97-112

Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Cunff M, Escande D, Leger JJ. Distinct molecular portraits of human failing hearts identified by dedicated cDNA microarrays. *Eur.J.Heart Fail.* 7[2], 157-165. 2005.

5 Sun JF, Phung T, Shiojima I, Felske T, Upalakalin JN, Feng D, Kornaga T, Dor T, Dvorak AM, Walsh K, Benjamin LE. Microvascular patterning is controlled by fine-tuning the Akt signal. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:128-33.

Takeda M, Tatsumi T, Matsunaga S, Hayashi H, Kimata M, Honsho S, Nishikawa S, Mano A, Shiraishi J, Yamada H, Takahashi T, Matoba S, Kobara M, Matsubara H. Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in post-infarct rat hearts. *Hypertens Res.* 2007 May;30(5):427-37.

10 Tanaka J, Fujita H, Matsuda S, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia.* 1997 May;20(1):23-37.

Tuerk C., Using the SELEX combinatorial chemistry process to find high affinity nucleic acid ligands to target molecules. *Methods Mol Biol.* 1997; 67: 219-30.

15 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5116-5121

Ullian ME, Schelling JR, Linas SL. Aldosterona enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension.* 1992 Jul;20(1):67-73.

Wang Y, Lam KS, Kraegen EW, Sweeney G, Zhang J, Tso AW, Chow WS, Wat NM, Xu JY, Hoo RL, Xu A.: Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. *Clinical Chemistry* 2007 En;53(1):34-41.

20 Workman C, Jensen LJ, Jarmer H, Berka R, Gautier L, Nielser HB, Saxild HH, Nielsen C, Brunak S, Knudsen S (2002) A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. *Genome Biol* 3:research0048

25 Xu SY, Petersson CG, Carlosn M, *et al.* The development of an assay for human neutrophil lipocalin (HNL)--to be used as a specific marker of neutrophil activity in vivo and vitro. *J Immunol Methods.* 1994 ;171 (2):245-252.

Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30:e15

Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J. Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest.* 1994 Jun;93(6):2578-83.

30 Yu Z, Redfern CS, Fishman GI. Conditional transgene expression in the heart. *Circ Res.* 1996;79:691- 697

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> INSERM

<120> BIOMARCADORES DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES

<130> BI007345

40 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

45 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Cebador

<400> 1
ggaccagggc tgctgctact 20

55 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Cebador

<400> 2
ggtggcact tgacattgt 20

65

ES 2 579 210 T3

5	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador	
10	<400> 3 tcacctgta cggaagaacc	20
15	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador	
20	<400> 4 ggtggaaca gagaaaacga	20
25	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador	
30	<400> 5 catcctgtg ggaagtcagt	20
35	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador	
40	<400> 6 ctttgggtg gaggcagata	20
45	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador	
50	<400> 7 agacaagggg acacaactgg	20
55	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador	
60	<400> 8 tgagatgcta agtggggaga a	21
65		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la predicción de la respuesta de un paciente afectado por una enfermedad cardiovascular a un tratamiento con un antagonista del RM, comprendiendo dicho método determinar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, el nivel de expresión de un primer biomarcador que es el gen de la Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL), en el que un nivel de expresión del gen de NGAL mayor que un valor predeterminado obtenido de la población general o de sujetos sanos, es indicativo de que dicho paciente es sensible a dicho tratamiento.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho método comprende adicionalmente determinar el nivel de expresión de un segundo biomarcador que es el gen de SERPINA3.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho nivel de expresión de dicho biomarcador (o biomarcadores) se determina mediante la determinación de la cantidad de ARNm del biomarcador (o biomarcadores) y dicha muestra biológica es una muestra de células o de tejido.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha muestra de células es una muestra de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) o una muestra de células endoteliales.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el nivel de expresión de dicho biomarcador (o biomarcadores) se determina mediante RT-PCR.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho nivel de expresión del biomarcador (o biomarcadores) se determina midiendo la concentración de las una o dos proteínas biomarcadoras en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma o una muestra de orina.
- 40 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho paciente está afectado por insuficiencia cardíaca congestiva o hipertensión.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho paciente se ha tratado ya con un tratamiento convencional seleccionado del grupo que consiste en inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, diuréticos, vasodilatadores, betabloqueantes, digital y anticoagulantes.
10. Un antagonista del RM para su uso en el tratamiento de un paciente afectado por una enfermedad cardiovascular, en el que dicho paciente se ha predicho como sensible a un antagonista del RM mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. El antagonista del RM para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicho paciente está afectado por insuficiencia cardíaca congestiva o hipertensión.

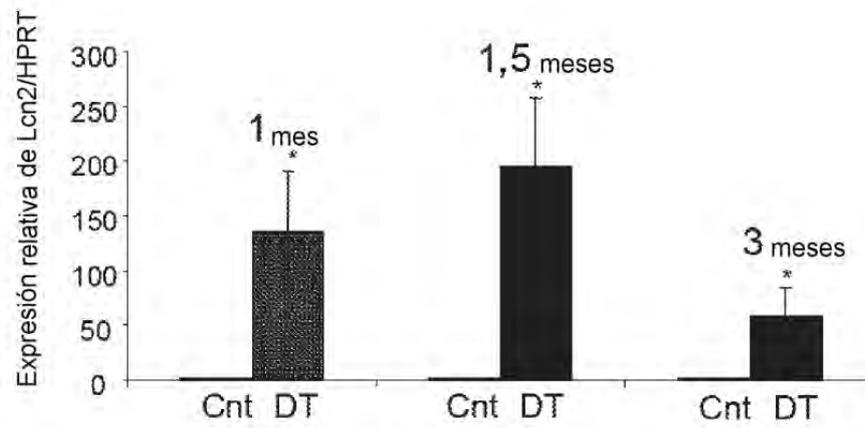


Figura 1A

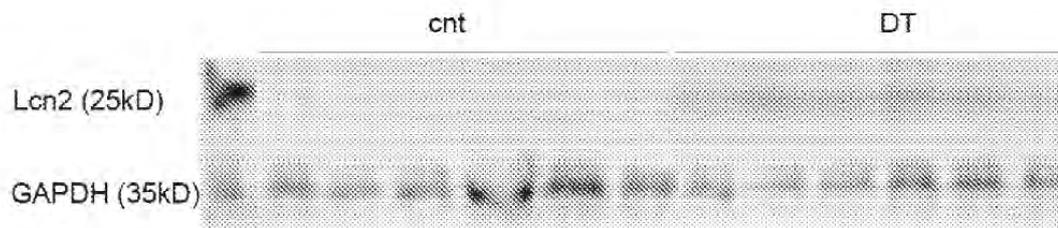


Figura 1B

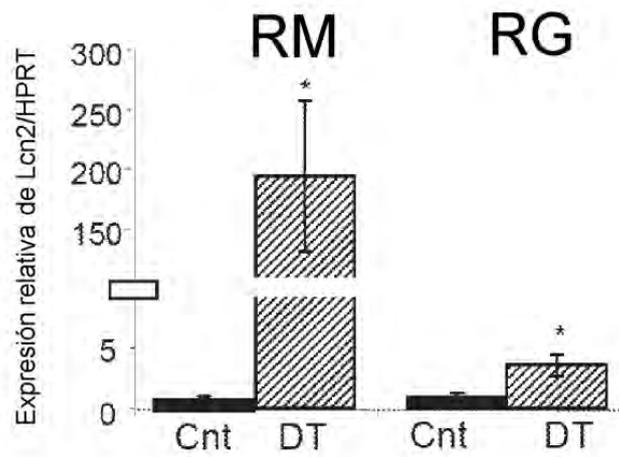


Figura 2

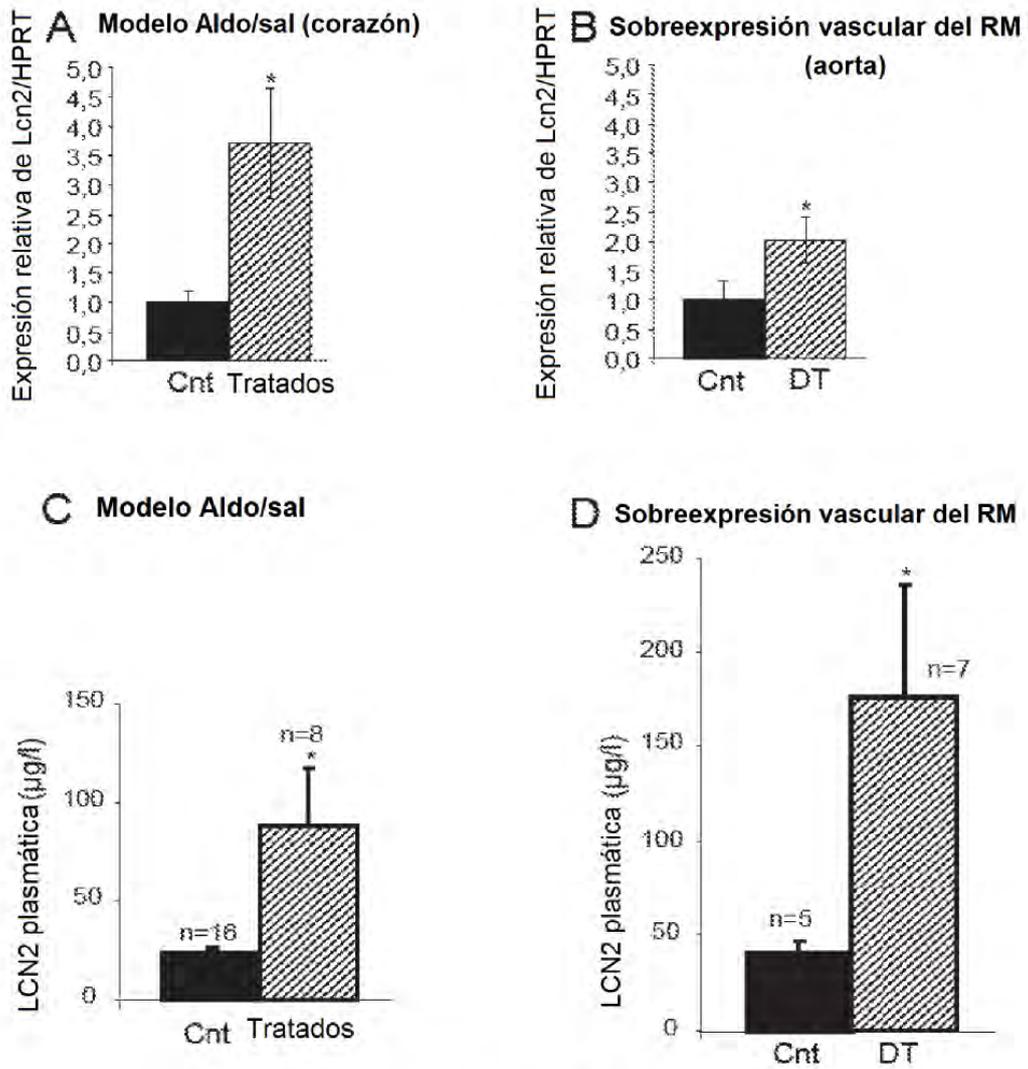


Figura 3

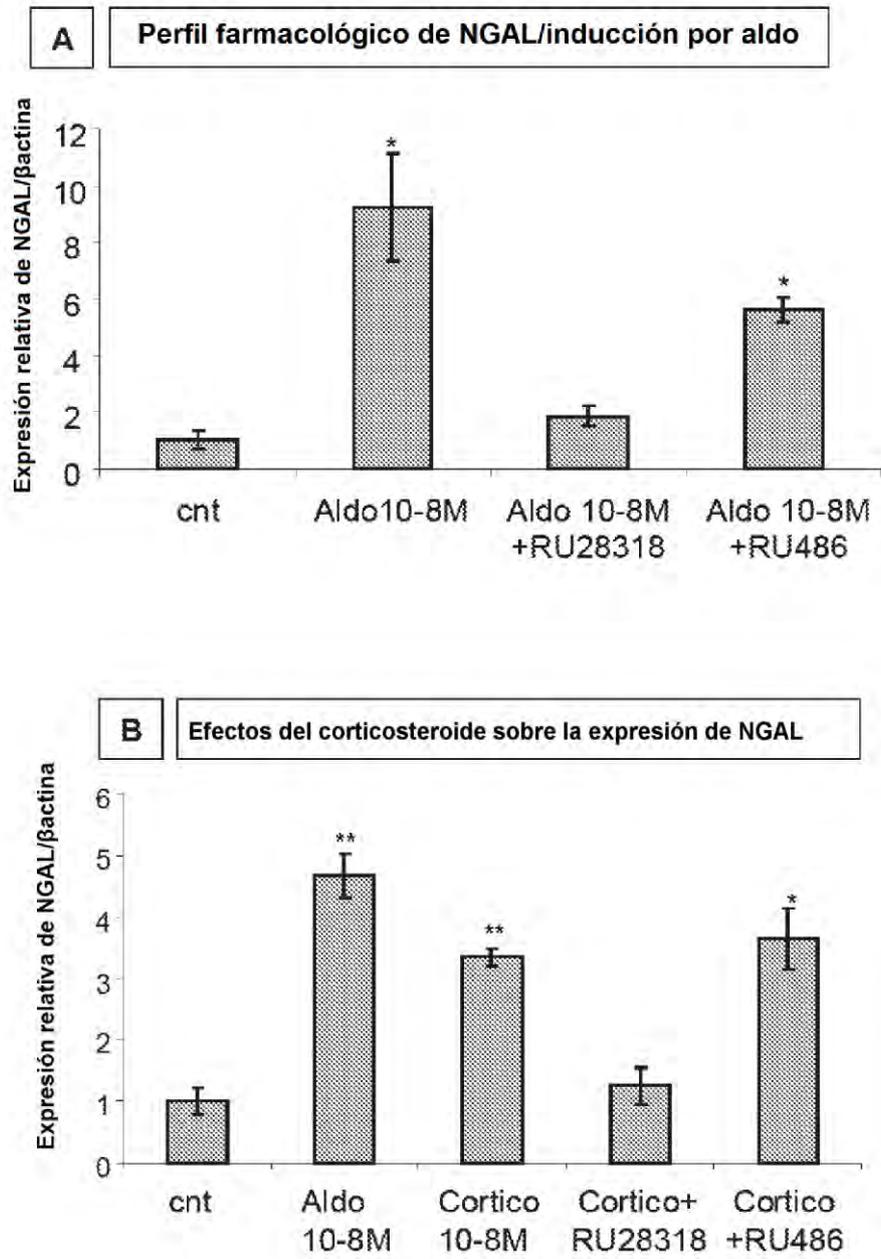


Figura 4A y Figura 4B

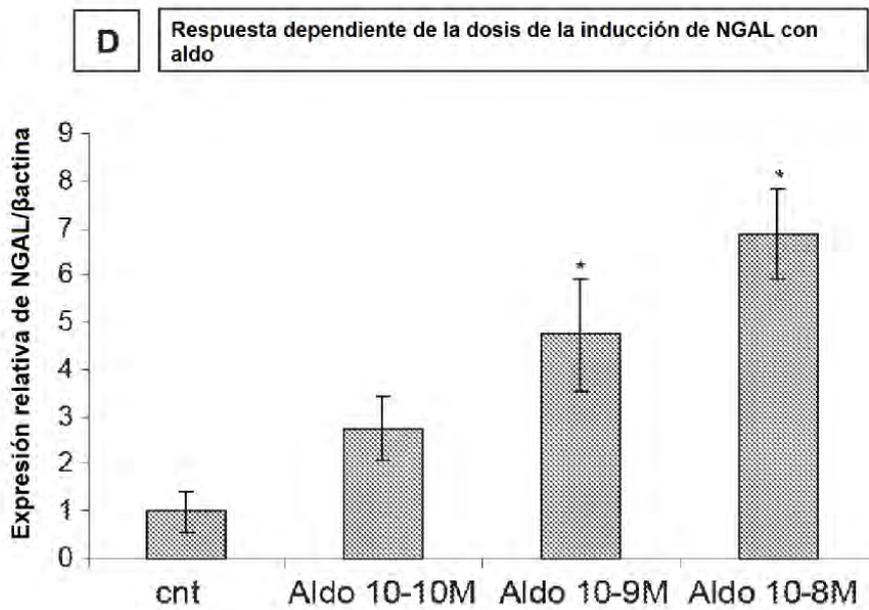
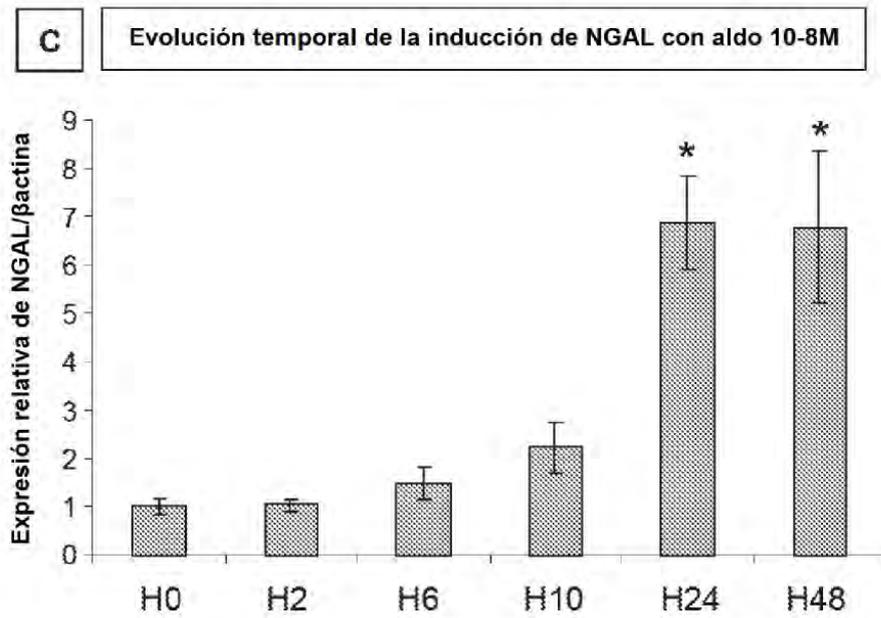


Figura 4C y Figura 4D

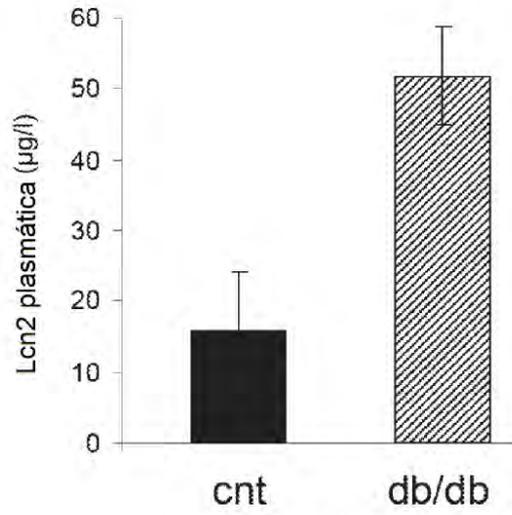


Figura 5A

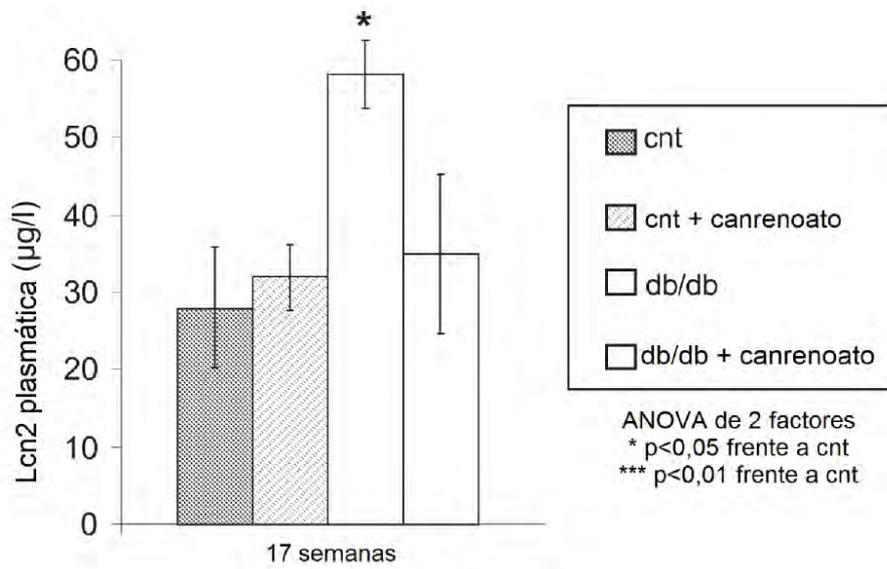
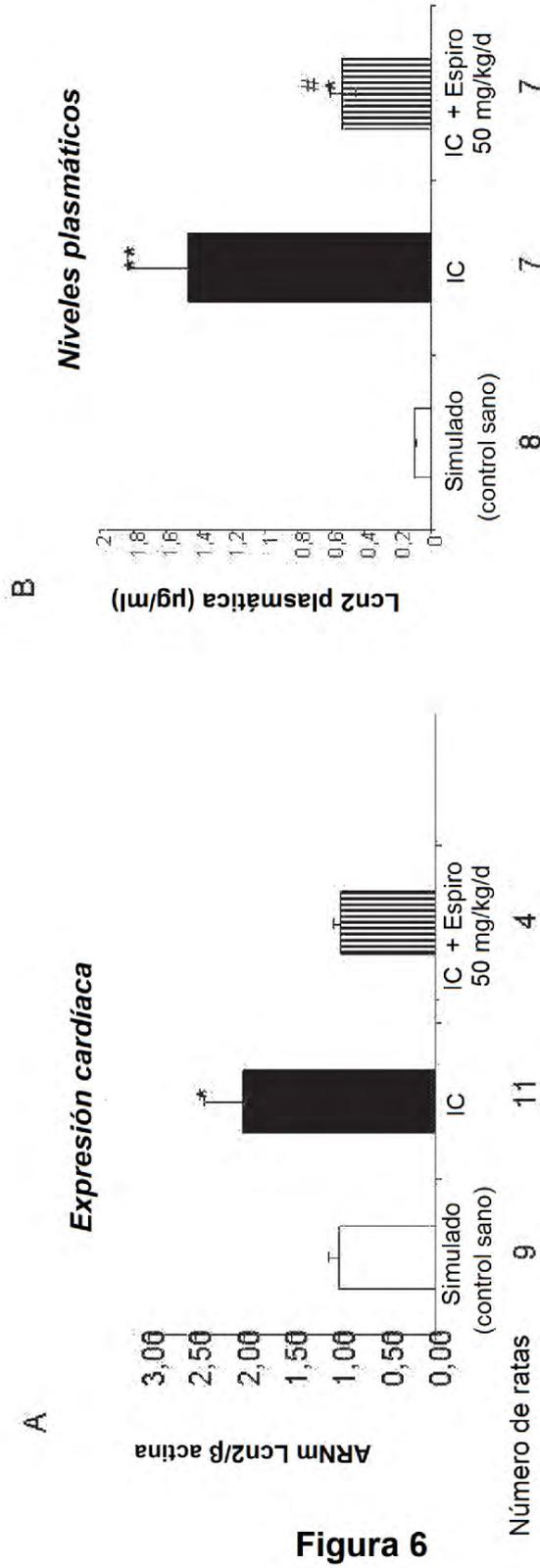


Figura 5B



* $p < 0,05$ frente a simulado, ** $p < 0,01$ frente a simulado, # $p < 0,05$ frente a placebo, prueba t

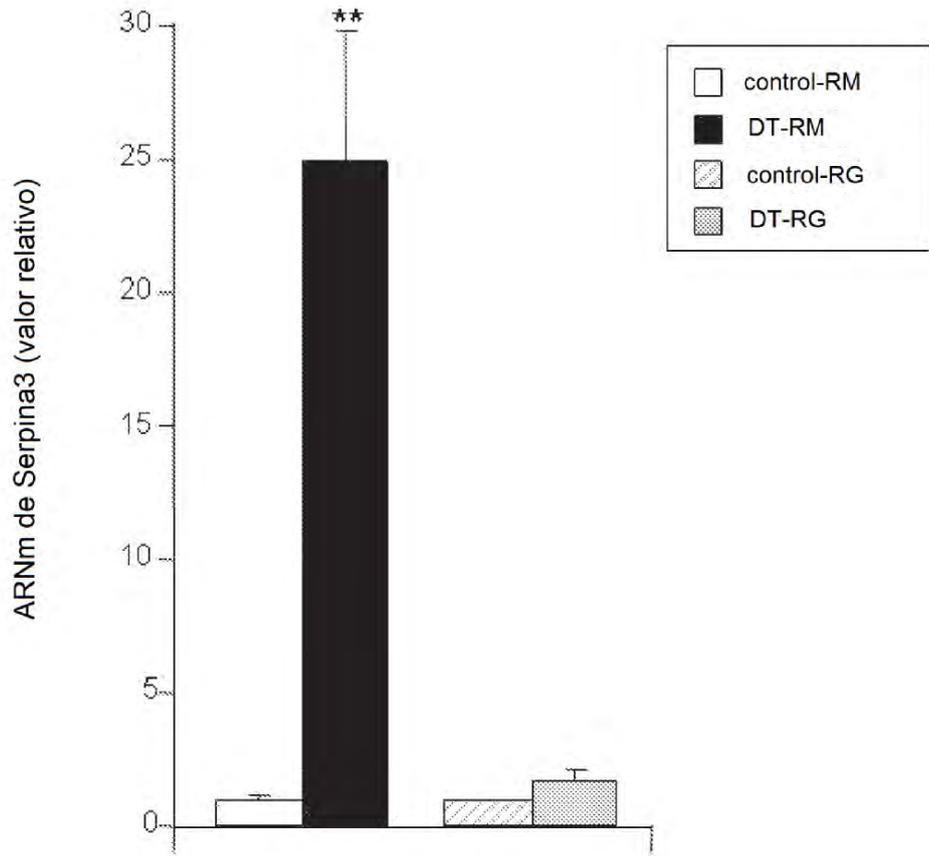


Figura 7

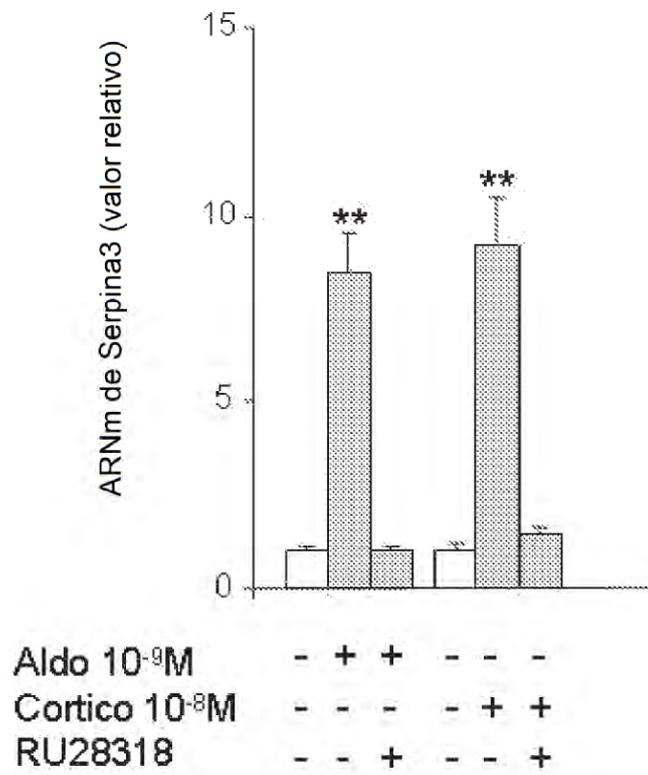


Figura 8

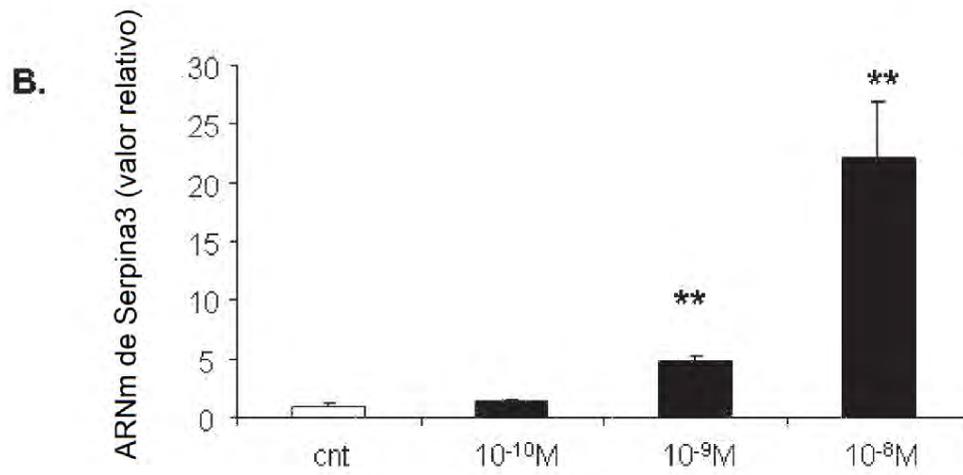
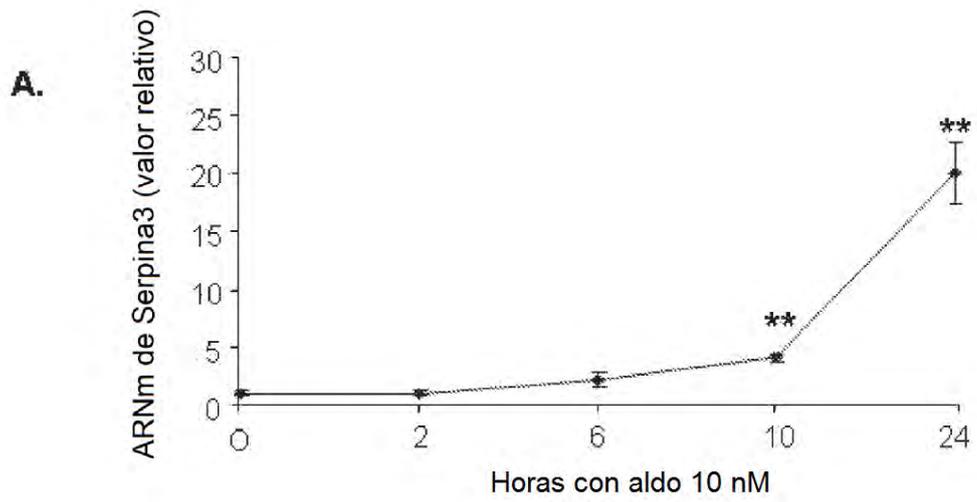


Figura 9

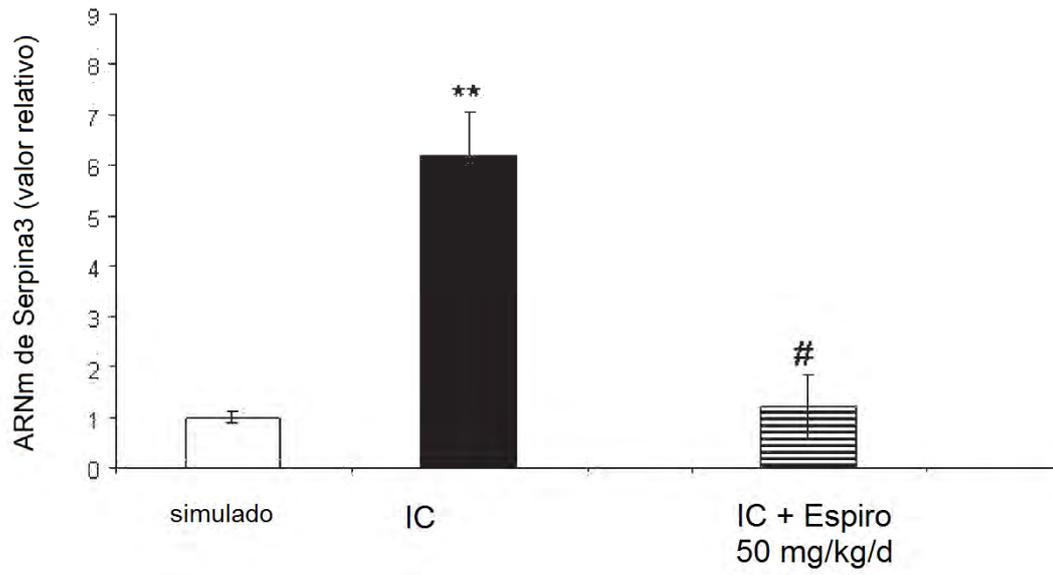


Figura 10