

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 491**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2010 PCT/EP2010/002513**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10124821**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2010 E 10719732 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2425245**

54 Título: **Uso de endostatina como marcador de la insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

27.04.2009 EP 09005801

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

31.03.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE;
BLOCK, DIRK y
HUEDIG, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 607 491 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de endostatina como marcador de la insuficiencia cardíaca

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para diagnosticar la insuficiencia cardíaca en un individuo que comprende los pasos de: a) medir en una muestra obtenida del individuo la concentración del marcador endostatina, b) medir de forma opcional en la muestra la concentración de uno o más marcadores de insuficiencia cardíaca, en los que uno o más de estos marcadores está seleccionado del grupo que consiste de un péptido natriurético marcador, una troponina marcadora, y un marcador de la inflamación y de c) el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca comparando la concentración determinada en el paso (a) y opcionalmente las concentraciones determinadas en el paso (b) con la concentración de este marcador o estos marcadores establecida en una muestra de control, en donde dicha muestra se selecciona del grupo consistente en suero, plasma y sangre completa. También se describe la utilización de endostatina como una proteína marcadora en el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca.

Antecedentes de la invención

20 La insuficiencia cardíaca (IC) es un importante y creciente problema de salud pública. En los Estados Unidos, por ejemplo, aproximadamente 5 millones de pacientes tienen IC y más de 550.000 pacientes son diagnosticados con insuficiencia cardíaca por primera vez cada año (en: American Heart Association, Estadísticas sobre enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular: 2008 Actualización, Dallas, Texas, American Heart Association (2008). Asimismo las estadísticas nos muestran que la IC es la razón principal de 12 a 15 millones de visitas y 6,5 millones de días de hospital cada año. Entre 1990 y 1999, el número anual de hospitalizaciones ha aumentado de aproximadamente 810.000 a más de 1 millón de IC como diagnóstico primario y de 2,4 a 3,6 millones para la IC como un diagnóstico primario o secundario. En 2001, cerca de 53.000 pacientes murieron de IC como causa primaria. La insuficiencia cardíaca es principalmente una enfermedad en ancianos, y por lo tanto es ampliamente reconocido como "envejecimiento de la población" también contribuye al aumento de la incidencia de la IC. La incidencia de IC se acerca a 10 de cada 1000 habitantes después de los 65 años de edad. En Estados Unidos solamente, se estima que el total de los costos directos e indirectos de la IC en 2005 fueron de aproximadamente de 27,9 mil millones de dólares y aproximadamente 2,9 mil millones de dólares de gasto anual en medicamentos para el tratamiento de la IC (cf. la citada estadística de la AHA).

35 Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca se caracteriza por una pérdida en la capacidad del corazón de bombear la cantidad de sangre que el cuerpo necesita. Insuficiencia no significa que el corazón haya dejado de bombear, pero que falla al bombear la sangre tan eficazmente como debería.

40 La NYHA (New York Heart Association) y la ACC/AHA [American Association of Cardiology/American Heart Association] han establecido clases funcionales de IC para medir la progresión de la enfermedad. El esquema de clasificación funcional de la NYHA tiene cuatro clases de estado de la enfermedad: clase 1 es asintomática, a cualquier nivel de esfuerzo. clase 2 es sintomático en esfuerzos intensos y las clases III y IV son sintomáticos en esfuerzo ligero o nulo, respectivamente.

50 En los cuatro estadios del esquema de la ACC/AHA, el estadio A es asintomático pero está en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. En el estadio B existe evidencia de la disfunción cardíaca sin síntomas. En el estadio C existe evidencia de la disfunción cardíaca con síntomas. En el estadio D, el sujeto tiene los síntomas de la insuficiencia cardíaca, a pesar de terapia máxima.

Etiología de la IC

55 Desde el punto de vista médico, la insuficiencia cardíaca (IC) debe ser apreciada como una enfermedad compleja. Puede estar causada por la aparición de un evento desencadenante, como un infarto de miocardio (ataque cardíaco) o ser secundaria a otras causas como la hipertensión arterial, la diabetes o malformaciones cardíacas como una enfermedad valvular. El infarto de miocardio u otras causas de insuficiencia cardíaca resultan en una disminución inicial en la capacidad de bombeo del corazón, por ejemplo, por daño en el músculo del corazón. Esta disminución de la capacidad de bombeo es perceptible inmediatamente, debido a la activación de uno o más mecanismos compensatorios. Sin embargo, la progresión de la IC se ha encontrado que es independiente del estado hemodinámico del paciente. Por lo tanto, los cambios provocados por los daños de la enfermedad están presentes y en curso, incluso mientras el paciente permanece asintomático. En efecto, los mecanismos compensatorios que mantienen la función cardiovascular normal durante las primeras fases de la IC en realidad pueden contribuir a la progresión de la enfermedad a largo plazo, por ejemplo, ejerciendo efectos deletéreos sobre el corazón y su capacidad para mantener un nivel suficiente de flujo sanguíneo en la circulación.

Algunas de las alteraciones fisiopatológicas más importantes que ocurren en la IC son (i) la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, (ii) disfunción endotelial sistémica y (iii) la remodelación miocárdica.

(i) Las terapias dirigidas específicamente a contrarrestar la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal incluyen agentes bloqueadores beta-adrenérgicos (B-bloqueantes), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), ciertos bloqueadores de los canales de calcio, nitratos y agentes de bloqueo de la endotelina-1. Los bloqueadores de canales de calcio y nitratos, mientras producen la mejoría clínica no han demostrado claramente que prolonguen la supervivencia, mientras que los bloqueadores β -adrenérgicos y los IECA han demostrado prolongar de forma significativa la vida, como antagonistas de la aldosterona. Estudios experimentales utilizando agentes de bloqueo de la endotelina-1 han demostrado un efecto beneficioso.

(ii) la disfunción endotelial sistémica es una característica reconocida de la IC y está claramente presente en signos del tiempo de la presencia de disfunción ventricular izquierda. La disfunción endotelial es importante con respecto a la íntima relación de la microcirculación miocárdica con miocitos cardiacos. La evidencia sugiere que la disfunción microvascular contribuye significativamente a la disfunción de los miocitos y los cambios morfológicos que conducen a la falla miocárdica progresiva. En términos de la fisiopatología subyacente, la evidencia sugiere que la disfunción endotelial puede ser causada por una relativa falta de NO que puede atribuirse a un incremento en la formación vascular de O_2 por una oxidasa dependiente de NADH y el exceso posterior de NO. Los posibles factores que contribuyen al aumento de la producción de O_2 incluyen el aumento de tono simpático, norepinefrina, angiotensina II, endotelina-1 y TNF- α . Además, los niveles de IL-10, una citoquina antiinflamatoria clave, están inadecuadamente bajos en relación con los niveles de TNF- α . Ahora se cree que los niveles elevados de TNF- α , asociada a citoquinas proinflamatorias como receptores de IL-6 y de TNF- α soluble, juegan un papel importante en la evolución de la IC al provocar una disminución de la contractilidad miocárdica, dilatación biventricular e hipotensión y probablemente están implicados en la activación y disfunción endotelial. También se cree que el TNF- α , puede jugar un papel en el hasta ahora inexplicable desgaste muscular que ocurre en pacientes con insuficiencia cardíaca severa. Los estudios preliminares en un pequeño número de pacientes con terapia de receptores de TNF soluble han mostrado mejoras en la clasificación funcional de la NYHA y en el bienestar del paciente, medidos por los índices de calidad de vida.

(iii) la remodelación miocárdica es un proceso complejo que acompaña la transición desde una insuficiencia cardíaca asintomática a una sintomática, y puede ser descrita como una serie de cambios de adaptación dentro del miocardio ventricular, como alteraciones en la forma, masa y volumen (Piano, M.R., et al., J. Cardiovasc. Nurs. 14 (2000), 1-23; Molkentin, J.D., Ann. Rev. Physiol. 63 (2001) 391-426). Los componentes principales de la remodelación miocárdica son alteraciones en la biología de los miocitos, como la hipertrofia de los miocitos, la pérdida de miocitos por necrosis o apoptosis, alteraciones en la matriz extracelular y alteraciones en la geometría de la cámara ventricular izquierda. No está claro si la remodelación miocárdica es sencillamente la respuesta final del órgano que ocurre después de años de exposición a los efectos tóxicos a largo plazo de la estimulación neuronal, o si la remodelación miocárdica contribuye de forma independiente a la progresión de la insuficiencia cardíaca. Hasta la fecha, las pruebas sugieren que la terapia apropiada puede retardar o detener la progresión de la remodelación miocárdica.

40 Marcadores y estadios de la enfermedad

Como se indicó anteriormente, es probable que la hipertrofia de los miocitos representen uno de los primeros pasos en el camino hacia la insuficiencia cardíaca. La hipertrofia de los miocitos se caracteriza por un incremento en la expresión de algunos de los genes que codifican las proteínas contráctiles, como la cadena pesada de la p-miosina y troponina T (TnT), y de algunas proteínas no contráctiles, tales como los péptidos natriuréticos de tipo A y de tipo B, por un aumento en el tamaño de célula y por alteración del citoesqueleto (Piano, M.R., et al., J. Cardiovasc. Nurs. 14 (2000), 1-23; Molkentin, J.D., Ann. Rev. Physiol. 63 (2001) 391-426).

La solicitud europea PE1967853 A1 describe un método para la evaluación de la insuficiencia cardíaca (IC) en un individuo que comprende la medición en una muestra obtenida de la persona la concentración del marcador Nogo-C, donde dicha muestra está seleccionada del grupo consistente en suero, plasma y sangre completa.

Los estudios de modelos animales y humanos de insuficiencia cardíaca sugieren una función deprimida de los miocitos en los últimos estadios de la insuficiencia cardíaca. Los mecanismos que subyacen a la disfunción de los miocitos han sugerido que implican alteraciones en la red de manejo de calcio, miofilamentos y citoesqueleto (de Tombe, P.P., Cardiovasc. Res. 37 (1998) 367-380). Por ejemplo, en modelos animales y humanos de la insuficiencia cardíaca, la actividad de la enzima ATPasa de calcio del retículo sarcoplasmático está reducida, mientras que los niveles de mRNA y de proteína del intercambiador sarcolémico Na^+/Ca^{2+} son mayores. Además, existe un cambio isofórmico de TnT, fosforilación reducida de la troponina I (TnI), disminución de la actividad ATPasa actomiosina miofibrilar y formación de microtúbulos mejorada en modelos humanos y animales de insuficiencia cardíaca. Inicialmente, los cambios en el corazón, lo que conduce a la remodelación miocárdica están destinados a compensar las partes enfermas del miocardio para sostener la demanda de oxígeno y nutrientes del cuerpo. Sin embargo, la fase de compensación de la insuficiencia cardíaca es limitada y, en última instancia, la insuficiencia cardíaca es incapaz de mantener el gasto cardíaco adecuado para satisfacer las necesidades del cuerpo. Por lo tanto, hay una transición de una fase compensatoria a una fase descompensada. En la fase descompensatoria, la cascada de cambios en el corazón continúa pero ya no es beneficioso, llevando al paciente hacia una progresión de

la insuficiencia cardíaca a un estado crónico y eventualmente a la muerte. De acuerdo con la "ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult" (S. Hunt et al., www.acc.org = directrices prácticas de ACC/AHA) el continuum de enfermedades en el área de insuficiencia cardíaca está actualmente agrupado en cuatro estadios, como se señaló anteriormente. En los estadios A y B se encuentran las personas en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, mientras que los estadios C y D representan los grupos de pacientes con signos y síntomas de insuficiencia cardíaca. Detalles para definir los diferentes estadios de la A a la D como se indica en la referencia anterior.

Métodos de diagnóstico en la insuficiencia cardíaca

La prueba diagnóstica única más útil en la evaluación de pacientes con IC es el ecocardiograma bidimensional acoplado a los estudios de flujo Doppler para determinar si las anomalías del miocardio, válvulas del corazón o pericardio están presentes y qué cámaras están involucradas. Tres preguntas fundamentales se debe abordar: 1) está el FEVI conservado o reducido, 2) es la estructura del ventrículo izquierdo normal o anormal, y 3) ¿existen otras anomalías estructurales como anomalías valvulares, pericárdicas o del ventrículo derecho que pudieran explicar la presentación clínica?. Esta información debe cuantificarse con un cálculo numérico de la FE, la medición de las dimensiones y/o volúmenes ventriculares, la medición del espesor de la pared, y la evaluación de la geometría de la cámara y el movimiento de la pared regional. Debe evaluarse el tamaño ventricular derecho y el rendimiento sistólico. El tamaño auricular también debe determinarse semicuantitativamente y medirse las dimensiones y/o volúmenes de la aurícula izquierda.

Los datos hemodinámicos no invasivos adquiridos en el momento de la ecocardiografía es una correlación adicional importante para los pacientes con la FE reducida o conservada. Combinar la cuantificación del patrón de influjo de la válvula mitral, el patrón de influjo venoso pulmonar y la velocidad anular mitral proporciona datos sobre las características de llenado del VI y la presión auricular izquierda. La evaluación del gradiente regurgitante de la válvula tricúspide junto con el gradiente de medición de la dimensión de la vena cava inferior y su respuesta durante la respiración proporciona una estimación de la presión sistólica de la arteria pulmonar y la presión venosa central.

El volumen sistólico puede determinarse con la medida de la dimensión combinada y Doppler pulsado en el flujo de salida del VI. Sin embargo, las anomalías pueden estar presentes en cualquiera de estos parámetros en ausencia de IC. Ninguno de estos no se correlaciona necesariamente específicamente con IC; sin embargo, un patrón de llenado completamente normal es un argumento en contra de IC clínica.

Desde una perspectiva clínica, la enfermedad es clínicamente asintomática en las fases compensatorias y descompensatoria temprana (completamente asintomáticos en el estadio A y con cardiopatía estructural pero sin signos ni síntomas de IC en el estadio B, cf. directrices prácticas de ACC/AHA). Los signos externos de la enfermedad (como la falta de aliento) no aparecen hasta bien entrada la fase descompensatoria (es decir, estadios C y D según las directrices de la AHA/ACC). El diagnóstico actual se basa en las manifestaciones de los pacientes en estadios C y D.

Por lo general, los pacientes con insuficiencia cardíaca reciben un tratamiento estándar con medicamentos que interactúan con los mecanismos específicos implicados en la insuficiencia cardíaca. No existen pruebas diagnósticas que reflejen esos mecanismos específicos de forma fiable y ayuden al médico a elegir el medicamento correcto (y dosis) para el paciente correcto (por ejemplo, IECA, AT II, β -bloqueantes, etc.).

Evaluación precoz de los pacientes con marcadores de IC

La evaluación precoz de pacientes con riesgo de insuficiencia cardíaca parece ser posible sólo mediante marcadores bioquímicos, ya que el individuo en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca en esa etapa todavía está libre de síntomas clínicos de insuficiencia cardíaca. No existen marcadores bioquímicos disponibles actualmente para la preevaluación fiable sintomática de la enfermedad. Por el momento el diagnóstico de IC es establecido en la actualidad, cuando la enfermedad está ya en marcha.

La familia del péptido natriurético, especialmente la familia del péptido natriurético atrial y la familia del péptido natriurético cerebral en los últimos años han demostrado ser de gran valor en la evaluación de la IC.

Pronóstico y necesidades de la IC

Al menos parcialmente debido al diagnóstico tardío, el 50% de los pacientes con IC mueren a los dos años del diagnóstico. La tasa de supervivencia a los 5 años es inferior al 30%. Hay una gran necesidad de nuevos marcadores bioquímicos para ayudar en el diagnóstico temprano de la insuficiencia cardíaca.

Está justificada una mejora en la evaluación temprana de las personas en riesgo de insuficiencia cardíaca, es decir, de las personas que son clínicamente asintomáticas para la insuficiencia cardíaca.

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

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

10 Mientras que un valor bajo de NT-proBNP tiene un alto valor predictivo negativo para descartar IC o EVI, el valor predictivo positivo para la insuficiencia cardíaca en el anterior y otros estudios (cf. Triepels R.H., et al., Clin. Chem. 49, supl. A (2003), 37-38) se ha encontrado en el rango del 50-60%. Por lo tanto un marcador útil en la evaluación de las personas en riesgo de insuficiencia cardíaca que como tal, por ejemplo, tiene un alto, o en combinación con NT-proBNP, y en comparación con NT-proBNP solo tiene mayor valor predictivo positivo para IC es de gran importancia práctica/clínica.

15 Un marcador para ayudar en la evaluación de un paciente con insuficiencia cardíaca también es de gran importancia para lograr nuevos avances técnicos en este área de diagnóstico clínicamente muy importante y exigente.

Resumen de la invención

20 Se ha se ha encontrado y establecido que el marcador endostatina pueden ayudar en el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca.

25 En este documento se describe un método para diagnosticar la insuficiencia cardíaca en un individuo que comprende los pasos de medir en una muestra obtenida de la persona la concentración del marcador endostatina, de medir opcionalmente en la muestra la concentración de uno o más marcadores adicionales de insuficiencia cardíaca, en la que uno o más de estos marcadores está seleccionado del grupo que consiste de un péptido natriurético marcador, una troponina marcadora, y un marcador de la inflamación y de la evaluación de la insuficiencia cardíaca comparando la concentración de endostatina y opcionalmente la concentración de uno o más marcadores adicionales con la concentración de este marcador o estos marcadores establecidos en una muestra de control, en donde dicha muestra se selecciona a partir del grupo compuesto de suero, plasma y sangre completa.

30 La invención se refiere también a la utilización de la proteína endostatina como marcador molecular en el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca.

35 También se describe el uso de una combinación de marcadores que comprende endostatina y uno o más marcadores adicionales de la insuficiencia cardíaca en el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca.

40 También se describe un equipo para llevar a cabo el método para la evaluación de la insuficiencia cardíaca in vitro que comprende los pasos de medir en una muestra la concentración del marcador endostatina, medir opcionalmente en la muestra la concentración de uno o más marcadores adicionales de insuficiencia cardíaca, y evaluar la insuficiencia cardíaca comparando la concentración de endostatina y opcionalmente la concentración de uno o más marcadores adicionales con la concentración de este marcador o estos marcadores establecidos en una población de referencia, el equipo comprende los reactivos necesarios para medir específicamente endostatina y opcionalmente uno o más marcadores adicionales de insuficiencia cardíaca.

45 Descripción detallada de la invención

50 En una primera realización, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar la insuficiencia cardíaca en un individuo que comprende los pasos de a) medir en una muestra obtenida de una persona la concentración del marcador endostatina, b) medir opcionalmente en la muestra la concentración de uno o más marcadores adicionales de la insuficiencia cardíaca, y c) evaluar la insuficiencia cardíaca comparando la concentración determinada en el paso (a) y opcionalmente las concentraciones determinadas en el paso (b) con la concentración de este marcador o marcadores establecidos en una muestra de control.

55 Tal como se utiliza aquí, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en esta sección.

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

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

65 El término "marcador" o "marcador bioquímico" utilizado en el presente texto se refiere a una molécula que se utilizará como diana para analizar una muestra de prueba del paciente. En una realización ejemplos de tales objetivos moleculares son proteínas o polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos usados como marcador en la presente invención contemplan incluir fragmentos de proteínas que aparecen de forma natural en particular, fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables preferentemente

comprenden al menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 o 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. Un experto en la materia reconocerá que las proteínas que liberadas por las células o presentes en la matriz extracelular pueden estar dañadas, por ejemplo, durante la inflamación, y podrían llegar degradarse o escindidas en esos fragmentos. Ciertos marcadores se sintetizan en una forma inactiva, la cual puede ser activada posteriormente mediante proteólisis. Los expertos apreciarán, que las proteínas o fragmentos de éstas, también pueden estar presentes como parte de un complejo. Ese complejo también se puede utilizar como un marcador en el sentido de la presente invención. Además, o como alternativa un marcador polipéptido puede llevar una modificación postraduccionnal. Ejemplos de modificaciones postraduccionales entre otros son la glicosilación, acilación, y/o la fosforilación.

El término "evaluación de la insuficiencia cardíaca" se utiliza para indicar que el método ayudará a, p.ej. un médico, a evaluar si una persona está en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, o ayudará al médico en su evaluación de un paciente con IC en una o en otras áreas de relevancia en el diagnóstico de la IC. Las áreas de relevancia para el diagnóstico preferidas en la evaluación de un individuo con IC son el estadio de la insuficiencia cardíaca, el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica, juzgar el riesgo de progresión de la enfermedad, orientación para la selección de un fármaco adecuado, monitorización de la respuesta a la terapia y el seguimiento de pacientes con IC.

Un "marcador de insuficiencia cardíaca" en el sentido de la presente invención es un marcador que si se combina con el marcador endostatina añade información relevante para la evaluación de la IC a la pregunta de diagnóstico bajo investigación. La información se considera relevante o de un valor añadido si puede mejorarse en una especificidad determinada la sensibilidad, o en una sensibilidad determinada la especificidad, respectivamente, para la evaluación de la IC mediante la inclusión de dicho marcador en una combinación de marcadores que ya comprende el marcador endostatina. Preferentemente, la mejora en la sensibilidad y especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa a un nivel de significación de $p = 0,05, 0,02, 0,01$ o inferior. Preferiblemente, uno o más marcadores de insuficiencia cardíaca se seleccionado del grupo que consiste de un péptido natriurético marcador, una troponina marcadora, y un marcador de la inflamación.

El término "muestra" utilizado en el presente documento se refiere a una muestra biológica obtenida para el propósito de evaluación in vitro. En los métodos de la presente invención, la muestra o muestras del paciente pueden incluir preferentemente cualquier líquido corporal. Las muestras de prueba preferidas incluyen sangre, suero, plasma, orina, saliva y líquido sinovial. Las muestras preferidas son la sangre completa, suero, plasma o líquido sinovial, siendo el plasma o suero el tipo más conveniente de muestra. Los expertos apreciarán que dicha evaluación se realiza in vitro. La muestra del paciente se descarta después. La muestra del paciente se utiliza únicamente para el método in vitro de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere al cuerpo del paciente. Normalmente, la muestra es un líquido, por ejemplo, muestras de sangre completa, suero o plasma.

La expresión "comparar la concentración ... con la concentración tal como se estableció en una muestra de control" sólo se utiliza para ilustrar mejor lo que es obvio para los expertos. La muestra de control puede ser una muestra de control interna o externa. En una realización se utiliza una muestra de control interno, es decir, se analiza el nivel del marcador en la muestra de prueba, así como en una o más muestras diferentes tomadas del mismo sujeto para determinar si hay cambios en el nivel de dicho marcador(es). En otra realización se utiliza una muestra de control externo. Para una muestra de control externo la presencia o la cantidad de un marcador en una muestra obtenida de la persona es comparado con su presencia o cantidad en un individuo conocido que padece, o se sabe que está en riesgo de una determinada condición, o un individuo que se sepa que está libre de una determinada condición, es decir, "un individuo normal". Por ejemplo, un nivel de marcador en una muestra de pacientes puede compararse con un nivel conocido por estar asociado con un curso específico de la enfermedad en la IC. Normalmente el nivel del marcador en la muestra está directa o indirectamente relacionado con el diagnóstico y el nivel del marcador se utiliza, por ejemplo, para determinar si una persona está en riesgo de padecer insuficiencia cardíaca. Alternativamente, el nivel del marcador de la muestra puede por ejemplo compararse a un nivel de marcador que se sabe que está asociados con una respuesta a la terapia en pacientes con insuficiencia cardíaca, el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica, la orientación para la selección de un medicamento adecuado para el tratamiento de la IC, a la hora de juzgar el riesgo de progresión de la enfermedad, o en el seguimiento de pacientes con IC. Dependiendo del uso diagnóstico previsto, se elige una muestra de control adecuada y un control o valor de referencia para el marcador establecido en él. El experto apreciará que dicha muestra control en una realización se obtiene a partir de una población de referencia que es de edad similar y libre de enfermedades que puedan confundirse. También es obvio para los expertos, que los valores absolutos de marcador establecidos en una muestra de control dependerá de la prueba utilizada. Preferiblemente se utilizan muestras de 100 individuos bien caracterizados de la correspondiente población de referencia para establecer un control (valor de referencia). También es preferible que la población de referencia escogida sea de 20, 30, 50, 200, 500 o 1000 personas. Los individuos sanos representan una población de referencia preferida para establecer un valor de control.

Endostatina

La endostatina se aisló originalmente de hemangioendoteloma murino como un fragmento proteolítico de 20 kDA del colágeno tipo XVIII (O'Reilly, M.S. et al., Cell 88 (1997) 277-285).

Los colágenos constituyen una familia de proteínas de la matriz extracelular con características de conformación helicoidal triple formando supra-agregados moleculares que juegan un papel preponderante en el mantenimiento de la integridad estructural de los tejidos. La deposición de colágeno excesivo produce fibrosis que perturba el funcionamiento normal de los tejidos circundantes.

El Colágeno XVIII (COL18A1, FLJ27325, FLJ34914, KNO, KNO1, MGC74745, gxHOMSA10749, colágeno, tipo XVIII, Alfa 1) es un miembro de la familia multiplexina de colágenos con varias interrupciones en el dominio helicoidal triple central y un único dominio no-triple-helicoidal en C-terminal principalmente en la membrana basal. La secuencia de la isoforma corta de la cadena alfa-1 del colágeno XVIII de tipo humano (SwissProt: P39060) se proporciona en Id. de Sec. N°:1.

La endostatina se libera de la cadena alfa 1 del colágeno XVIII por la acción de diversas enzimas proteolíticas (para más detalles véase Ortega, N. y Werb, Z., *Journal of Cell Science* 115 (2002) 4201-4214). Esencialmente la endostatina está representada por el fragmento de colágeno XVIII que abarca desde la posición de aminoácido 1337 a la posición de aminoácido 1519 de Id. de Sec. N°: 1. La bisagra en la región C-terminal de la cadena alfa del colágeno XVIII contiene varios sitios sensibles a proteasa y a una serie de enzimas, incluyendo la elastasa de neutrófilos, catepsinas y metaloproteinasas de matriz son conocidas por generar endostatina por escisión de la cadena de colágeno en esta región. Estas proteasas no liberan exclusivamente endostatina sino también pueden liberar otros fragmentos de mayor tamaño, que contienen la secuencia endostatina. Como es evidente para los expertos tales fragmentos más grandes también se medirán mediante un inmunoensayo para endostatina.

Los niveles fisiológicos en suero de endostatina monomérica (agente antiangiogénico, proteína multifuncional MFP) juegan un papel en la estimulación de la migración, proliferación, apoptosis o supervivencia de diferentes tipos celulares y en la represión de diversos acontecimientos morfogenéticos (morfogénesis del ojo y la maduración de los vasos sanguíneos).

La endostatina es un potente inhibidor de la angiogénesis y el crecimiento de vasos sanguíneos. La relación entre redes de citoquinas y endostatina no está determinada, pero se sabe que la endostatina es capaz de alterar la expresión de una amplia gama de genes (Abdollahi, A. et al., *Mol. Cell* 13 (2004) 649-663).

Los cambios en la angiogénesis, a través del desequilibrio de la producción de VEGF y endostatina resulta en la patogénesis de las enfermedades relacionadas con la angiogénesis (esclerosis sistémica, enfermedad vascular aterotrombótica, preeclampsia).

La endostatina es conocida por inhibir la proliferación endotelial y para suprimir el crecimiento tumoral. Los niveles circulantes elevados de endostatina están asociados con muchas formas de cáncer (Dubois, S. et al., *Cancer* 109 (2007), 814-819).

Además se encontraron niveles elevados de endostatina en el espacio alveolar de los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Richter, A.G. et al., *Thorax* 64 (2009) 156-161).

Se sabe muy poco acerca de la fisiopatología de la endostatina en enfermedades cardíacas. Los datos preliminares informan de los cambios de los niveles séricos de endostatina en paralelo con las de VEGF en respuesta a la isquemia/reperfusión miocárdica (Seko, Y. et al., *Clinical Science* 106 (2004), 439-442). La PE 1719779 está relacionada con la utilización terapéutica de endostatina tras un infarto de miocardio. La insuficiencia cardíaca ventricular izquierda aguda ha sido descrita como un efecto colateral cardíaco del tratamiento de un paciente con cáncer con endostatina humana recombinante (Jing, Q. et al., *Clin. Oncol.* 20 (2008) 268).

La expresión diferencial del mRNA de colágeno XVIII se midió en pacientes que padecen endometriosis (US 2003/0077589).

Varias solicitudes de patentes se refieren a una utilidad potencial de polipéptidos de colágeno XVIII o endostatina como agentes de diagnóstico, agentes preventivos y agentes terapéuticos para una amplia variedad de enfermedades. Por ejemplo, la PE 1925940 reivindica que la endostatina sería uno de varios marcadores séricos que predicen el éxito de un tratamiento antitumoral y WO 1998/056399 propone la detección inmunológica del colágeno XVIII en suero y en asociación con la fibrosis hepática o carcinoma hepatocelular.

Parecerá que en la técnica anterior, la presencia o el nivel de la proteína de la proteína endostatina en un líquido corporal no es conocido por tener ni sugerir que tiene una utilidad diagnóstica en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

Los inventores de la presente invención han encontrado ahora y pueden establecer que un valor aumentado para endostatina medido a partir de una muestra de líquido corporal derivado de un individuo es indicativa de insuficiencia cardíaca.

Los valores de endostatina medidos en un grupo de control o un control de la población se utilizan, por ejemplo, para establecer un valor de corte o un rango de referencia. Un valor por encima de ese valor de corte o fuera del intervalo de referencia y su extremo superior es considerado como elevado.

- 5 En una realización se establece un valor de corte fijo. Ese valor de corte se elige de acuerdo con la cuestión diagnóstica de interés.

10 En una realización los valores para la endostatina tal como se mide en un grupo de control o un control de la población se utilizan para establecer un rango de referencia. En una realización preferida una concentración de endostatina se considera como elevada si el valor medido está por encima del percentil 90% del rango de referencia. En otras realizaciones se considera una concentración elevada de endostatina preferiblemente, si el valor medido es superior al percentil 95%, el percentil 96%, el percentil 97%, o el percentil 97,5% del rango de referencia.

15 En una realización de la muestra de control será una muestra de control interno. En esta realización se obtienen muestras en serie de la persona que está siendo investigada y se comparan los niveles del marcador. Por ejemplo, esto puede ser útil para evaluar la eficacia de la terapia.

20 El método de acuerdo con la presente invención se basa en una muestra de líquido que se obtiene a partir de un individuo y sobre la medición de endostatina en dicha muestra. Un "individuo" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un solo organismo humano o no humano. Así, las composiciones y los métodos aquí descritos son aplicables a ambas enfermedades humanas y veterinarias. Preferentemente, el individuo es un ser humano.

25 Preferiblemente el marcador endostatina se mide específicamente a partir de una muestra de líquido mediante el uso de un agente aglutinante.

La muestra de líquido se selecciona del grupo consistente en suero, plasma y sangre completa.

30 Un agente de unión específico, por ejemplo, un receptor para endostatina, una lectina que se une a endostatina o un anticuerpo para endostatina. Un agente de unión específico tiene al menos una afinidad de 10^7 l/mol para su correspondiente molécula diana. El agente de unión específico preferiblemente tiene una afinidad de 10^8 l/mol o incluso más preferido de 10^9 l/mol para su molécula diana. Como podrá apreciar el experto, se utiliza el término específico para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente con el agente de unión específico para endostatina. Preferiblemente, el nivel de enlace a una biomolécula distinta de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que es sólo el 10% o menos, preferiblemente sólo el 5% o menos de la afinidad a la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específico preferido cumplirá los dos criterios mínimos anteriores tanto para la afinidad, como para la especificidad.

40 Un agente de unión específico preferiblemente es un anticuerpo que reacciona con endostatina. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos, anticuerpos de cadena simple así como construcciones genéticas que componen el dominio de unión de un anticuerpo.

45 Cualquier fragmento de anticuerpo que retiene los criterios anteriores de un determinado agente de unión puede ser utilizado. Los anticuerpos son generados por los procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo, como se describe en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1990), todo el libro, especialmente las páginas 43-78). Además, el experto es bien consciente de los métodos basados en inmunosorbentes que puede ser utilizados para el aislamiento de anticuerpos específicos. Mediante estos medios puede aumentar la calidad de los anticuerpos policlonales y, por ende, su rendimiento en los inmunoensayos (Tijssen, P., supra, págs. 108-115).

50 Para los logros como se describen en la presente invención pueden utilizarse anticuerpos policlonales obtenidos en cabras. No obstante, como es obvio también pueden utilizarse anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo, ratas, conejos o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Dado que los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos en cualquier cantidad requerida con propiedades constantes, representan herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica.

60 La generación y el uso de anticuerpos monoclonales contra endostatina en un método de acuerdo con la presente invención representan, respectivamente, otras realizaciones preferidas.

No es fácil para purificar endostatina desde una fuente natural. La producción de endostatina recombinante es un método de elección para obtener altas cantidades de endostatina. En una realización preferida la endostatina es producida por expresión recombinante mediante un sistema eucariótico. Ejemplos de sistemas eucarióticos son los sistemas de expresión baculovirus, en levaduras y en un sistema de expresión en mamíferos. En una realización preferida la expresión de endostatina se realizará en un sistema de expresión en mamíferos. Ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos son células CHO, células HEK, células del mieloma, etc. En una nueva realización

preferida la endostatina producida de forma recombinante se utiliza como antígeno en la fabricación de anticuerpos poli o monoclonales contra la endostatina. También puede ser preferible purificar anticuerpos policlonales mediante inmunoadsorción sobre un inmunosorbente de endostatina utilizando una endostatina producida de forma recombinante tal como se ha descrito anteriormente.

5 Tal como apreciarán los expertos, ahora que la endostatina se ha identificado como un marcador útil en la evaluación de la IC, se pueden utilizar caminos alternativos para llegar a un resultado comparable a los logros de la presente invención. Por ejemplo, pueden utilizarse estrategias alternativas para generar anticuerpos. Estas estrategias comprenden, entre otros, el uso de péptidos sintéticos o recombinantes, que representan un epítipo clínicamente relevante para la inmunización de endostatina. Alternativamente, puede utilizarse la inmunización con DNA también conocida como vacunación con DNA.

15 Para la medición de la muestra de líquido obtenida a partir de un individuo, esta se incuba con el agente de unión específico para endostatina bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo-agente de unión a endostatina. Tales condiciones no necesitan ser especificadas, ya que los expertos podrán identificar fácilmente sin ningún esfuerzo las condiciones de incubación apropiadas. La cantidad de complejo-agente de unión a endostatina se mide y se utiliza en la evaluación de la IC. Como apreciarán los expertos, existen numerosos métodos para medir la cantidad de complejo-agente de unión a endostatina descritos en detalle en los libros de texto pertinentes (cf., por ejemplo, Tijssen P., supra, o Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (eds.), *Immunoassay*, Academic Press, Boston (1996).

20 Se detecta endostatina preferentemente en un formato de ensayo de tipo sándwich. En dicho ensayo un primer agente de unión específico se utiliza para capturar endostatina, por un lado, y un segundo agente de unión específico, que se etiqueta para ser directamente o indirectamente detectable, se utiliza en el otro lado. Preferiblemente, un anticuerpo para endostatina se utiliza en un inmunoensayo cualitativo (endostatina presente o ausente) o cuantitativa (se determina la cantidad de endostatina).

30 Los inventores de la presente invención, sorprendentemente, son capaces de detectar proteínas endostatina en una muestra de líquido corporal. Más sorprendente aún es que son capaces de demostrar que la presencia de endostatina en dicha muestra de líquido obtenida de un individuo puede correlacionarse con la IC. No es necesaria ninguna muestra de biopsia ni de tejido para hacer uso del marcador endostatina en la evaluación de la IC. Medir el nivel de proteína endostatina se considera muy ventajoso en el campo de la IC.

35 En una realización preferida el método de acuerdo con la presente invención se practica con suero líquido como material de muestra. En una realización más preferida el método de acuerdo con la presente invención se practica con plasma como material de muestra líquida. En una realización aún más preferida el método de acuerdo con la presente invención se practica con sangre completa como material de muestra líquida.

40 En otra realización preferida, la presente invención se refiere a la utilización de la proteína endostatina como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca a partir de una muestra de líquido obtenido a partir de un individuo.

45 El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en que un único evento o proceso podría causar la correspondiente enfermedad como, por ejemplo, en las enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, el diagnóstico correcto puede ser muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se entiende por completo como es el caso de la IC. Como apreciarán los expertos, ningún marcador bioquímico en el campo de la IC sirve de diagnóstico con un 100% de especificidad y, al mismo tiempo, 100% de sensibilidad para el diagnóstico de una determinada cuestión. Más bien, los marcadores bioquímicos son utilizados para evaluar con cierta probabilidad o valor predictivo una cuestión diagnóstica subyacente. Los expertos están completamente familiarizados con los métodos estadísticos y matemáticos que habitualmente se utilizan para calcular el riesgo relativo o la probabilidad para la pregunta diagnóstico a evaluar. En la práctica clínica rutinaria generalmente un médico considera conjuntamente diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos en el diagnóstico, el tratamiento y la gestión de la enfermedad subyacente.

55 Preferiblemente, en otra realización preferida de la presente invención, el método para la evaluación de la IC se lleva a cabo midiendo la concentración de endostatina y de uno o más marcadores diferentes y utilizando la concentración de endostatina y de uno o más marcadores diferentes en la evaluación de la IC.

60 En la evaluación de la IC, el marcador endostatina ayudará al médico en uno o más de los siguientes aspectos: evaluar el riesgo de un individuo para insuficiencia cardíaca o evaluar un paciente con insuficiencia cardíaca, por ejemplo, con la intención de identificar el estadio de la insuficiencia cardíaca, diferenciar entre la insuficiencia cardíaca aguda y crónica, juzgar el riesgo de progresión de la enfermedad, proporcionar orientación en la selección de una terapia apropiada, monitorizar la respuesta del paciente a la terapia y monitorizar el curso de la enfermedad, es decir, en el seguimiento de pacientes con IC.

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

La presente descripción se refiere a un método in vitro para evaluar si un individuo está en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador endostatina, de medir opcionalmente en la muestra la concentración de uno o más marcadores diferentes de la insuficiencia cardíaca y para evaluar el riesgo de dicho individuo de desarrollar insuficiencia cardíaca comparando la concentración de endostatina y opcionalmente las concentraciones determinadas para los diferentes marcadores opcionales a la concentración de este marcador o estos marcadores respecto a sus valores de referencia.

El cribado se refiere a la evaluación no sesgada de individuos con respecto a su riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Mientras que este examen puede realizarse en teoría en cualquier muestra, en la práctica clínica tal opción de detección generalmente se dará a individuos que de alguna manera están en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Como se discutió anteriormente, tales individuos pueden ser clínicamente asintomáticos, es decir, no presentan signos o síntomas de IC. En una realización preferida, el cribado de IC se proporcionará a individuos con riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca, por ejemplo, que están en los estadios A o B según lo definido por las guías de práctica de ACC/AHA.

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

El riesgo de insuficiencia cardíaca se evalúa mediante métodos matemáticos/estadísticos plenamente conocidos y entendidos por el experto en la técnica. Preferiblemente, el riesgo de insuficiencia cardíaca de un individuo se expresa en términos relativos y se da como el denominado riesgo relativo (= RR). Con el fin de calcular dicho RR para la insuficiencia cardíaca, se compara el valor para la endostatina de un individuo con los valores establecidos para la endostatina en una población de referencia, preferiblemente individuos sanos que no desarrollan insuficiencia cardíaca. También se prefiere que la evaluación de dicho RR para la insuficiencia cardíaca se base en un grupo de individuos que han desarrollado insuficiencia cardíaca dentro del período de estudio, preferiblemente dentro de uno o también de dos años, y un grupo de individuos que no desarrollaron insuficiencia cardíaca en el mismo período de estudio.

Se describe el uso del marcador endostatina en el cribado de la insuficiencia cardíaca. Como experto en la técnica sabe el término "uso como marcador" implica que la concentración de una molécula marcador se cuantifica por medios apropiados y que el valor medido para dicho marcador se utiliza para indicar, es decir, marcar la presencia o ausencia de una enfermedad o condición clínica. Los medios apropiados para la cuantificación, por ejemplo, son agentes de unión específicos, como los anticuerpos.

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

También se prefiere el uso del marcador endostatina para evaluar el riesgo de insuficiencia cardíaca futura para un individuo en el estadio B de acuerdo con las pautas de práctica de ACC/AHA, es decir, un individuo que presenta un cambio estructural en el corazón pero que no muestra síntomas de la insuficiencia cardíaca.

Se describe el uso de endostatina como un marcador de una combinación de marcadores de IC para fines de cribado de IC.

En el cribado, ajustar un nivel elevado de endostatina es un indicador positivo para el riesgo aumentado de un individuo de desarrollar insuficiencia cardíaca.

Estadificación de pacientes

La presente descripción se refiere a un método in vitro que ayuda en la estadificación de pacientes con insuficiencia cardíaca, que comprende las etapas de: a) medir en una muestra la concentración del marcador endostatina, b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más marcadores diferentes de insuficiencia cardíaca, y estatificar la insuficiencia cardíaca comparando la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente las concentraciones determinadas en la etapa (b) con la concentración de este marcador o de estos marcadores respecto a sus valores de referencia. Preferiblemente, el nivel de marcador endostatina se utiliza como una ayuda para clasificar los individuos investigados en los grupos de individuos que son clínicamente "normales" (es decir, individuos en el estadio A de acuerdo con la clasificación ACA/ACC), pacientes asintomáticos con cardiopatía estructural (estadio B según la clasificación ACA/ACC) y el grupo de pacientes con insuficiencia cardíaca (es decir, pacientes en estadio C o estadio D según la clasificación ACA/ACC).

Diferenciación entre un evento cardíaco agudo y una enfermedad cardíaca crónica

Se describe un método in vitro que ayuda en el diagnóstico diferencial entre un evento cardíaco agudo y una enfermedad cardíaca crónica, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador endostatina, de medir opcionalmente en la muestra la concentración de uno o más marcadores diferentes de insuficiencia cardíaca y establecer un diagnóstico diferencial entre un evento cardíaco agudo y una enfermedad cardíaca crónica comparando la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente las concentraciones determinadas en la etapa (b) con la concentración de este marcador o de estos marcadores respecto sus valores de referencia.

El experto en la materia conoce los significados de "evento cardíaco agudo" y de "enfermedad cardíaca crónica".

Preferiblemente, un "evento cardíaco agudo" se refiere a una condición aguda, enfermedad o mal funcionamiento del corazón, particularmente a insuficiencia cardíaca aguda, por ejemplo, infarto de miocardio (IM) o arritmia. Dependiendo de la extensión de un IM, puede ser seguido por DVI y ICC.

Preferiblemente, una "enfermedad cardíaca crónica" es un debilitamiento de la función cardíaca, por ejemplo, debido a isquemia del corazón, enfermedad de las arterias coronarias, o infarto previo del miocardio, posiblemente seguido de DVI progresiva. También puede ser un debilitamiento debido a enfermedades inflamatorias, defectos de la válvula cardíaca (por ejemplo, defectos de la válvula mitral), cardiomiopatía dilatativa, cardiomiopatía hipertrófica, defectos del ritmo cardíaco (arritmias) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Por lo tanto, está claro que una enfermedad cardíaca crónica también puede incluir pacientes que habían sufrido de un síndrome coronario agudo, por ejemplo, IM, pero que actualmente no padecen un evento cardíaco agudo.

Es importante diferenciar entre un evento cardíaco agudo y una enfermedad cardíaca crónica, porque un evento cardíaco agudo y una enfermedad cardíaca crónica pueden requerir regímenes de tratamiento muy diferentes. Por ejemplo, para un paciente que presenta un infarto agudo de miocardio, el tratamiento temprano para la reperfusión puede ser de suma importancia. Mientras que un tratamiento para la reperfusión realizada en un paciente con insuficiencia cardíaca crónica en el mejor de los casos es de ningún o poco daño a este paciente.

La endostatina marcadora se utiliza en el diagnóstico diferencial de insuficiencia cardíaca aguda y crónica.

Evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad

Se describe un método in vitro para evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad de un paciente con IC, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración del marcador endostatina, de medir opcionalmente en la muestra la concentración de uno o más marcadores diferentes de la insuficiencia cardíaca, y de establecer el riesgo de progresión de la enfermedad de dicho individuo comparando la concentración de endostatina y opcionalmente las concentraciones determinadas opcionalmente de uno o más marcadores respecto a la concentración de estos marcadores respecto a su valor de referencia.

En la actualidad es muy difícil evaluar o incluso predecir con una probabilidad razonable si un paciente diagnosticado con IC tiene un estado más o menos estable o si la enfermedad progresará y el estado de salud del paciente como resultado es probable que empeore. La gravedad y progresión de la insuficiencia cardíaca se establece clínicamente por medio de la evaluación de los síntomas clínicos o por la identificación de los cambios adversos mediante el uso de tecnologías de imagen como la ecocardiografía. El empeoramiento de la insuficiencia cardíaca se establece mediante el seguimiento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI). Un deterioro de la FEVI en un 5% o más se considera progresión de la enfermedad.

La presente descripción se refiere por lo tanto al uso de la endostatina como marcador en la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad para un paciente que sufre de IC. En la evaluación de la progresión de la enfermedad para los pacientes que sufren de IC, un nivel elevado de endostatina es un indicador de un mayor riesgo de progresión de la enfermedad.

Orientación en la selección de una terapia adecuada para la IC

Se describe un método in Vitro que ayuda en la selección de una terapia apropiada para la IC, que comprende las etapas de medir en una muestra la concentración de la endostatina marcadora, de medir opcionalmente en la muestra la concentración de uno o más marcadores diferentes de insuficiencia cardíaca y de seleccionar una terapia apropiada comparando la concentración para la endostatina y opcionalmente la concentración o concentraciones determinadas para los marcadores opcionales a la concentración de este marcador o de estos marcadores respecto a sus valores de referencia.

Se espera que la endostatina marcadora sea de ayuda para ayudar al médico a seleccionar el régimen de tratamiento más apropiado de los diferentes regímenes de tratamiento disponibles en el área de la insuficiencia

cardíaca. Por lo tanto, la presente descripción se refiere al uso de la endostatina marcadora en la selección de un régimen de tratamiento para un paciente que sufre de IC.

Monitorización de la respuesta de un paciente a la terapia

La presente descripción se refiere a un método in vitro para monitorizar la respuesta de un paciente a la terapia de IC, que comprende las etapas de: a) medir en una muestra la concentración del marcador endostatina, b) opcionalmente medir en la muestra la concentración de uno o más marcadores diferentes de insuficiencia cardíaca, y de monitorizar la respuesta de un paciente a la terapia de IC comparando la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente las concentraciones determinadas en la etapa (b) con la concentración de este marcador o estos marcadores respecto a su valor de referencia.

Alternativamente, el método anterior para motorizar la respuesta de un paciente a la terapia se puede practicar estableciendo el nivel pre y post-terapéutico para la endostatina marcadora y para los otros marcadores opcionales y comparando el nivel pre y post-terapéutico del marcador.

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

Como se indica más arriba, los valores medidos para NT-proBNP están altamente correlacionados con la gravedad de la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, tanto BNP como NT-proBNP parecen no ser ideales en el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia, cf. por ejemplo, Beck-da-Silva, L., et al., *Congest. Heart Fail.* 11 (2005) 248-253, cuestionario 254-255.

La endostatina marcadora parece apropiada para monitorizar la respuesta de un paciente a la terapia. En ese área de diagnóstico, la endostatina marcadora también puede usarse para establecer un valor basal antes de la terapia y para medir la endostatina en un punto de tiempo o varios puntos de tiempo después de la terapia. En el seguimiento de los pacientes con IC, un nivel reducido de endostatina es un indicador positivo para un tratamiento eficaz de la IC.

Combinación de marcadores

Los marcadores bioquímicos se pueden determinar individualmente o, en una realización preferida de la invención, se pueden medir simultáneamente usando una tecnología de matriz basada en chip o en una cuenta. Las concentraciones de los biomarcadores se interpretan entonces independientemente usando un punto de corte individual para cada marcador o se combinan para la interpretación, es decir, forman una combinación de marcadores.

Como apreciará el experto en la técnica la etapa de correlacionar un nivel de marcador con una cierta probabilidad o riesgo se puede realizar y conseguir de diferentes maneras. Preferiblemente, los valores medidos para la endostatina marcadora y uno o más marcadores diferentes se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la pregunta diagnóstica subyacente. Los valores de marcador pueden combinarse con la medición de la endostatina por cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica.

Preferiblemente, el algoritmo matemático aplicado en la combinación de marcadores es una función logística. El resultado de aplicar tal algoritmo matemático o tal función logística preferiblemente es un valor único. Dependiendo de la pregunta diagnóstica subyacente, dicho valor puede correlacionarse fácilmente, por ejemplo, con el riesgo de que un individuo sufra insuficiencia cardíaca o con otros usos diagnósticos previstos útiles en la evaluación de pacientes con IC. De una manera preferida tal función logística se obtiene mediante a) la clasificación de los individuos en los grupos, por ejemplo, en individuos normales, individuos en riesgo de insuficiencia cardíaca, pacientes con insuficiencia cardíaca aguda o crónica, etc. b) la identificación de marcadores que difieren significativamente entre estos grupos por análisis univariante, c) análisis de regresión logística para evaluar los valores discriminatorios independientes de los marcadores útiles en la evaluación de estos diferentes grupos y d) construcción de la función logística para combinar los valores discriminatorios independientes. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes, sino que representan una combinación de marcadores.

En una realización preferida, la función logística utilizada para combinar los valores de endostatina y el valor de al menos un marcador adicional se obtiene por a) clasificación de individuos en los grupos de individuos normales y en riesgo de insuficiencia cardíaca, respectivamente, b) establecer los valores para la endostatina y el valor de al menos otro marcador adicional, c) realizar el análisis de regresión logística y d) construir la función logística para combinar los valores de marcador para la endostatina y el valor de al menos otro marcador.

Una función logística para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad emplea preferiblemente un algoritmo desarrollado y obtenido aplicando métodos estadísticos. Métodos estadísticos

apropiados, son por ejemplo, análisis discriminativo (AD) (es decir, AD lineal, cuadrático, regularizado), métodos Kernel (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores k del vecino más cercano), PLS (mínimos cuadrados parciales), modelos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, métodos de selvas aleatorias, métodos de boosting/bagging), modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística), métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica difusa, redes neuronales y métodos basados en algoritmos genéticos. El experto en la técnica no tendrá ningún problema en seleccionar un método estadístico apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención y, de este modo, obtener un algoritmo matemático apropiado. Preferiblemente, el método estadístico empleado para obtener el algoritmo matemático utilizado en la evaluación de la insuficiencia cardíaca se selecciona de AD (es decir, análisis discriminativo lineal, cuadrático, regularizado), métodos Kernel (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores k del vecino más cercano), PLS (mínimos cuadrados parciales), modelos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, métodos de selvas aleatorias, métodos de boosting) o modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística). Los detalles relativos a estos métodos estadísticos se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I., et al., *J. of Computational and Graphical Statistics* 12 (2003) 475-511; Friedman, J.H., *J. of the American Statistical Association* 84 (1989) 165-175; Hastie, T., et al., *The Elements of Statistical Learning*, Springer Verlag (2001); Breiman, L., et al., *Classification and regression trees*, Wadsworth International Group, California (1984); Breiman, L., *Machine Learning* 45 (2001) 5 - 32; Pepe, M.S., *The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction*, Oxford Statistical Science Series, 28, Oxford University Press (2003); y Duda, R.O., et al., *Pattern Classification*, John Wiley & Sons, Inc., 2ª ed. (2001).

Es una realización preferida de la invención usar un punto de corte multivariado optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y discriminar el estadio A del estadio B, por ejemplo, los individuos normales y los individuos en riesgo de insuficiencia cardíaca, los pacientes con IC que responden a terapia y fracasos terapéuticos, pacientes con insuficiencia cardíaca aguda y pacientes con insuficiencia cardíaca que tienen insuficiencia cardíaca crónica, pacientes con IC que muestran progresión de la enfermedad y pacientes con IC que no muestran progresión de la enfermedad, respectivamente.

El área bajo la curva del operador receptor (= AUC) es un indicador del rendimiento o la precisión de un procedimiento de diagnóstico. La exactitud de un método de diagnóstico se describe mejor por sus características de operador receptor (ROC) (véase especialmente Zweig, M.H., y Campbell, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC es una representación de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua del umbral de decisión sobre toda la gama de datos observados.

El rendimiento clínico de una prueba de laboratorio depende de su precisión diagnóstica, o de la capacidad de clasificar correctamente los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La precisión diagnóstica mide la capacidad de la prueba para distinguir correctamente dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Tales condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad o progresión de la enfermedad versus ninguna progresión de la enfermedad.

En cada caso, el gráfico ROC representa la superposición entre las dos distribuciones trazando la sensibilidad frente a 1 - especificidad para el intervalo completo de umbrales de decisión. En el eje de las y es la sensibilidad o la fracción verdaderamente positiva [definida como (número de resultados de las pruebas verdaderamente positivas)/(número de resultados verdaderamente positivos + número de resultados de pruebas falsos positivos)]. Esto también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x se encuentra la fracción falso-positiva, o 1 - especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de negativos verdaderos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula completamente del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones verdaderas y falsas positivas se calculan por separado, utilizando los resultados de dos subgrupos diferentes, la gráfica ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto en el gráfico ROC representa un par de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Una prueba con discriminación perfecta (sin superposición en las dos distribuciones de resultados) tiene un gráfico ROC que pasa por la esquina superior izquierda, donde la fracción verdaderamente positiva es 1,0 o 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción falso positivo es 0 (especificidad perfecta). La gráfica teórica para una prueba sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda hasta la esquina superior derecha. La mayoría de las gráficas caen entre estos dos extremos. (Si el gráfico ROC cae completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "superior a" a "inferior a" o viceversa.) Cualitativamente, cuanto más cerca está la curva superior izquierda, mayor será la precisión general de la prueba.

Una meta conveniente para cuantificar la precisión diagnóstica de una prueba de laboratorio es expresar su rendimiento por un solo número. La medida global más común es el área bajo la gráfica ROC (AUC). Por convención, este área es siempre $\geq 0,5$ (si no es así, se puede invertir la regla de decisión para que así sea). Los valores oscilan entre 1,0 (separación perfecta de los valores de prueba de los dos grupos) y 0,5 (diferencia de distribución aparente entre los dos grupos de valores de prueba). El área no depende solamente de una porción particular de la gráfica tal como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad al 90% de especificidad, sino en

toda la gráfica. Se trata de una expresión cuantitativa y descriptiva de lo cerca que está la gráfica ROC de la gráfica perfecta (área = 1.0).

La sensibilidad global del ensayo dependerá de la especificidad requerida para practicar el método descrito aquí. En ciertas configuraciones preferidas una especificidad del 75% puede ser suficiente y los métodos estadísticos y los algoritmos resultantes pueden basarse en este requisito de especificidad. En una realización preferida, el método utilizado para evaluar individuos con riesgo de insuficiencia cardíaca se basa en una especificidad del 80%, del 85%, o también preferida del 90% o del 95%.

Como se discutió anteriormente, la endostatina marcadora ayuda en la evaluación del riesgo de un individuo de desarrollar insuficiencia cardíaca, así como en la evaluación diagnóstica adicional *in vitro* de un paciente que tiene insuficiencia cardíaca. Una realización preferida en consecuencia es el uso de endostatina como molécula marcadora en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

El uso de una combinación de marcadores que comprende endostatina y uno o más marcadores diferentes de IC en la evaluación de pacientes con IC o en la evaluación de individuos en riesgo de IC, representa otra realización preferida de la presente invención. En dicha combinación de marcadores, los marcadores adicionales se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación.

El marcador o marcadores adicionales seleccionados de IC preferidos con los que se pueden combinar la medición de endostatina preferiblemente se seleccionan del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación. Estos marcadores adicionales preferidos cuya medición se combina preferiblemente con la medición de endostatina o que forman parte de la combinación de marcadores de IC que comprende endostatina, respectivamente, se discuten con más detalle a continuación.

Marcador de péptido natriurético

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

Los marcadores polipeptídicos en la familia de péptidos natriuréticos atriales o en la familia de péptidos natriuréticos cerebrales derivan de las preproformas de las correspondientes hormonas activas.

Los marcadores de péptidos natriuréticos preferidos de acuerdo con la presente invención son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP y fragmentos fisiológicos inmunológicamente detectables de los mismos. Como el experto en la técnica apreciará fácilmente, el fragmento inmunológicamente detectable debe comprender al menos un epítipo que permita la detección específica de tal fragmento fisiológico. Un fragmento fisiológico es un fragmento que está presente naturalmente en la circulación de un individuo.

Los marcadores en ambas familias de péptidos natriuréticos representan fragmentos de las pro-hormonas correspondientes, es decir, proANP y proBNP, respectivamente. Dado que consideraciones similares se aplican a ambas familias, sólo la familia de marcadores BNP se describirá con algún detalle. La pro-hormona de la familia BNP, es decir, proBNP consta de 108 aminoácidos. ProBNP se escinde en los 32 aminoácidos C-terminales (77-108) que representan la hormona BNP biológicamente activa y los aminoácidos N-terminal 1-76 llamados proBNP N-terminal (o NT-proBNP). BNP, proBNP N-terminal (1-76), así como otros productos de degradación (Hunt, P.J. et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.* 214 (1995) 1175-1183) circulan en sangre. Si la molécula precursora completa (proBNP 1-108) también se produce en el plasma no está completamente aclarado. Sin embargo, se describe (Hunt, P.J. et al., *Peptides* 18 (1997) 1475-1481) que una baja liberación de proBNP (1-108) en el plasma es detectable pero que debido a la rápida degradación parcial en los N-terminales algunos aminoácidos están ausentes. Actualmente se acepta generalmente que, por ejemplo, para NT-proBNP, la parte central de la molécula, que reside entre los aminoácidos 10 a 50, representa una parte fisiológicamente más estable. Las moléculas de NT-proBNP que comprenden esta parte central de NT-proBNP se pueden medir de forma fiable a partir de fluidos corporales. En el documento WO 00/45176 se da una descripción detallada de los métodos basados en la detección inmunológica de esta parte central de la molécula de NT-proBNP y se hace referencia al lector para conocer los detalles. Puede ser de ventaja adicional medir sólo una cierta subfracción de NT-proBNP para la cual se ha propuesto el término NT-proBNP nativo. Se puede encontrar una descripción detallada relacionada con esta sustracción de NT-proBNP en el documento WO 2004/099253. El experto encontrará allí todas las instrucciones necesarias. Preferiblemente, el NT-proBNP medido es o corresponde al NT-proBNP medido con el ensayo Elecsys® NT-proBNP de Roche Diagnostics, Alemania.

Las preanalíticas son robustas con NT-proBNP, que permite el transporte fácil de la muestra a un laboratorio central (Mueller, T., y col., *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 942-944). Las muestras de sangre pueden almacenarse a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo. Por el contrario, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C produce una pérdida de concentración de al menos el 20% (Mueller, T., et al., *Supra*, Wu, AH y col., *Clin. Chem.* 50 (2004) 867 - 873).

La familia de péptidos natriuréticos derivados del cerebro (especialmente BNP y NT-proBNP) ha sido investigada a fondo en el cribado de ciertas poblaciones de IC. Los resultados con estos marcadores, especialmente con NT-proBNP son bastante alentadores. Los valores elevados de NT-proBNP incluso en "pacientes" asintomáticos son claramente indicativos de "problemas cardíacos" (Gremmler, B., et al., Exp. Clin. Cardiol. 8 (2003) 91-94). Estos autores demostraron que un NT-proBNP elevado indica la presencia de "malestar cardio-renal" y debería solicitar la derivación para una investigación posterior. De acuerdo con varios otros grupos de investigadores, Gremmler y col. También encuentran que una concentración anormal de NT-proBNP es una prueba diagnóstica precisa tanto para la exclusión de IC en la población como para descartar la disfunción ventricular izquierda asignaturas (=DVI) en sujetos con falta de aliento. El papel de los valores negativos de BNP o NT-proBNP en la exclusión de IC o DVI está corroborado por otros grupos de investigadores, por ejemplo, McDonagh, T.A., et al., Eur. J. Heart Fail. 6 (2004) 269 - 273; y Gustafsson, F., et al., J. Card. Fail. 11, Supl. 5 (2005) S15-20.

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

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

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

En la evaluación de un individuo en riesgo de insuficiencia cardíaca, el valor medido para la endostatina se combina preferiblemente con el valor para NT-proANP y/o NT-proBNP. Preferiblemente, el valor de NT-proBNP se combina con el valor de la endostatina. Consideraciones similares se aplican para seleccionar una terapia apropiada, juzgar el riesgo de progresión de la enfermedad y para monitorizar el curso de la enfermedad.

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

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

Marcador de troponina cardíaca

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

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

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

Las isoformas cardíacas únicas de troponina I y T permiten diferenciarlas inmunológicamente de las otras troponinas del músculo esquelético. Por lo tanto, la liberación en la sangre de la troponina I y T del músculo cardíaco dañado puede estar específicamente relacionada con el daño del tejido cardíaco. En la actualidad también es apreciado por el experto en la técnica que las troponinas cardíacas puedan detectarse de la circulación ya sea en su forma libre o como parte de un complejo (ver, por ejemplo, US 6 333 397, US 6 376 206 y US 6 174 686).

En la evaluación de un individuo en riesgo de insuficiencia cardíaca así como en la evaluación de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, el valor medido para la endostatina se combina preferiblemente con el valor para la isoforma cardíaca de troponina T y/o troponina I. Una troponina cardíaca preferida usada en combinación con el marcador endostatina es la troponina cardíaca T.

5 Marcador de inflamación

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

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

15 La proteína C reactiva (CRP) es una proteína homopentamérica de fase aguda de unión a Ca²⁺ con subunidades de 21 kDa que está implicada en la defensa del huésped. La síntesis de la CRP es inducida por la IL-6, e indirectamente por la IL-1, ya que la IL-1 puede desencadenar la síntesis de IL-6 por las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. La concentración plasmática normal de PCR es <3 μ g/ml (30 nM) en el 90% de la población sana y <10 μ g/ml (100 nM) en el 99% de los individuos sanos. Las concentraciones de CRP en plasma pueden, por ejemplo, medirse mediante amiloide A sérica (= SAA) que es una proteína de fase aguda de bajo peso molecular de 11,7 kDa. Se sintetiza predominantemente por el hígado en respuesta a la estimulación de IL-1, IL-6 o TNF- α y está implicada en la regulación de la respuesta inmune dependiente de células T. En los eventos agudos, la concentración de SAA aumenta hasta 1000 veces alcanzando un miligramo por mililitro. Se utiliza para controlar la inflamación en enfermedades como la fibrosis quística, rechazo de injerto renal, traumas o infecciones. En la artritis reumatoide se ha utilizado en algunos casos como un sustituto de la PCR, pero SAA todavía no está tan ampliamente aceptada.

20 Las proteínas S100 forman una familia en constante aumento de proteínas de unión a Ca²⁺ que hoy incluye más de 20 miembros. La estructura fisiológicamente relevante de las proteínas S100 es un homodímero, pero algunas también pueden formar heterodímeros entre sí, por ejemplo, S100A8 y S100A9. Las funciones intracelulares van desde la regulación de la fosforilación de proteínas, de las actividades enzimáticas, o de la dinámica del citoesqueleto a la participación en la proliferación y diferenciación celular. Como algunas proteínas S100 también se liberan de las células, se han descrito también funciones extracelulares, por ejemplo, supervivencia neuronal, proliferación de astrocitos, inducción de apoptosis y regulación de procesos inflamatorios. S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12 se han encontrado en la inflamación con S100A8 que responde a la inflamación crónica, mientras que S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se incrementan en la inflamación aguda. S100A8, S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se han relacionado con diferentes enfermedades con componentes inflamatorios incluyendo algunos tipos de cáncer, rechazo de aloinjerto renal, colitis y, lo que es más importante, a la AR (Burmeister, G. y Gallacchi, G., *Inflammopharmacology* 3, (1995) 221-230; Foell, D., et al., *Reumatology* 42 (2003) 1383 - 1389). Los marcadores S100 más preferidos para evaluar un individuo en riesgo de IC o un paciente que tiene IC, por ejemplo, para uso en una combinación de marcadores de acuerdo con la presente invención son S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12.

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

30 En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de endostatina como molécula marcadora para IC en combinación con una o más moléculas marcadoras para IC, en el que dicha una o más moléculas marcadoras se seleccionan del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación, en el diagnóstico de IC a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo, donde dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en suero, plasma y sangre completa.

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

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de la combinación de marcadores endostatina y NT-proBNP en el diagnóstico de insuficiencia cardíaca.

5 En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de la combinación de marcadores endostatina y troponina T en el diagnóstico de insuficiencia cardíaca.

También se describe el uso de la combinación de marcadores endostatina y PCR en la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

10 También se describe una combinación de marcadores que comprende los marcadores endostatina, troponina T, NT-proBNP y PCR. En aún otra realización preferida, la presente invención se refiere a un panel marcador utilizado en un método para diagnosticar IC in vitro mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de endostatina y de uno o más marcadores diferentes de IC, en el que dicho marcador o marcadores adicionales se seleccionan del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación, y usando las concentraciones determinadas en el diagnóstico de IC.

15 Un panel marcador de acuerdo con la presente invención se mide preferiblemente utilizando una técnica de matriz o "array" de proteínas. Una matriz o "array" es una colección de marcadores individuales detectables. Dichos marcadores pueden detectarse espacialmente, tales como las matrices contenidas en placas de microtitulación o impresas en superficies planas donde cada marcador está presente en coordenadas X e Y distintas. Alternativamente, los marcadores pueden detectarse de acuerdo a etiquetas, perlas, nanopartículas o propiedades físicas. Los microarrays se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, el documento US 5.807.522, Robinson, WH, et al., Nat. Med. 8 (2002) 295-301 y Robinson, WH, et al., Arthritis Rheum. 46 (2002) 885 - 893). El chip como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier ensayo inmunológico con marcadores detectables múltiples. En una realización, los marcadores detectables son antígenos. En otra realización, los elementos detectables son autoanticuerpos. Un microarray es una forma miniaturizada de un "array". El antígeno, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula que pueda unirse específicamente a un anticuerpo. El término autoanticuerpo está bien definido en la técnica.

20 Una matriz o "array" de proteínas que comprende el marcador endostatina y opcionalmente uno o más marcadores de IC, en el que se describe dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación.

25 También se describe una matriz de proteínas que comprende los marcadores endostatina y NT-proBNP.

30 También se describe una matriz de proteínas que comprende los marcadores endostatina y troponina T, una matriz de proteínas que comprende los marcadores endostatina y PRC, y una matriz de proteínas que comprende los marcadores endostatina, troponina T, NT-proBNP y PRC.

35 También se describe un equipo que comprende los reactivos necesarios para medir específicamente la endostatina. También se prefiere un equipo que comprende los reactivos requeridos para medir específicamente la endostatina y los reactivos necesarios para medir uno o más marcadores diferentes de insuficiencia cardíaca que se usan juntos en una combinación de marcadores de IC.

40 Los siguientes ejemplos, lista de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción del listado de secuencias

45 Id. de Sec. Nº: 1 Secuencia de aminoácidos de la isoforma corta de la cadena alfa 1 del colágeno humano de tipo XVIII.

Descripción de las figuras

50 Figura 1 Endostatina medida en muestras de 37 pacientes con IC y 38 muestras de control, respectivamente. Las concentraciones en ng/ml se dan en el eje y. Las muestras derivadas de pacientes con insuficiencia cardíaca se denominan IC (IC = cuadrados) y SHN para controles sanos (suero humano normal = SHN = rombos), respectivamente.

55 Figura 2 La endostatina se midió en muestras de 37 pacientes con IC y 38 muestras de control, respectivamente. Los cuartiles se han calculado basándose en concentraciones en ng/ml, tanto para las muestras derivadas de pacientes con insuficiencia cardíaca, marcadas con IC (IC = cuadrados) y las muestras de controles sanos (suero humano normal = SHN = rombos), respectivamente. Los diagramas de cajas y bigotes muestran los cuartiles inferior y superior (cajas) así como los valores más altos y más bajos (bigotes).

60

Ejemplo 1

1.1 ELISA para la medición de endostatina en muestras de suero y plasma humano

5 Para la medición de la endostatina en suero o plasma humano, se utiliza un ELISA en sándwich disponible comercialmente (Quantikine Human Endostatin Immunoassay, Número de catálogo DNST0, R & D Systems). Las mediciones se realizan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

10 1.2 ELISA de endostatina con sueros de pacientes con IC obtenidos de la rutina clínica y donantes aparentemente sanos, respectivamente

15 Para evaluar adicionalmente la utilidad de los ensayos de endostatina en condiciones clínicas rutinarias se investiga un panel de sueros de pacientes con IC (n = 37 - ver Tabla 1) y de 38 sueros de pacientes control aparentemente sanos (ver Tabla 2) .

La Tabla 1 muestra el resultado para pacientes con insuficiencia cardiaca.

Tabla 1:

Resultados de ELISA de endostatina (panel con muestras de IC procedentes de la rutina clínica)	
Muestras de insuficiencia cardiaca	
Nº Muestra	Endostatina-ELISA [ng/ml]
5078	163,8
5084	274,1
5085	243,6
5100	147,6
5101	265,8
5104	200,1
5107	208,0
5112	203,4
5113	262,3
5114	158,3
5301	223,5
5311	355,7
5314	160,2
5328	146,2
5382	198,7
5388	169,1
5397	144,5
5410	142,4
5421	174,1
5423	135,7
5439	167,8
5444	220,2
5449	275,8
5451	253,5
5455	192,7
5464	284,0
5469	164,1
5472	173,8
5474	298,4
5481	281,0
5482	145,2
5483	141,6
5491	119,9
5495	206,6
5502	300,3
5516	252,5
5517	207,6
Media	207,1

La Tabla 2 muestra los resultados de endostatina para voluntarios sanos

Tabla 2:

Resultados de ELISA de endostatina (muestras de controles sanos) SHN (controles sanos)		
	Nº	ELISA Endostatina [ng/ml]
Panel SHN 1	9	120,6
	16	123,7
	19	85,5
	29	128,5
	30	133,6
	32	149,0
	39	116,8
	40	151,7
	44	109,9
	45	142,8
	46	142,2
	47	139,5
	53	121,8
	68	129,8
	72	131,1
	73	125,3
	74	153,6
	78	117,3
	79	144,5
	80	166,5
panel SHN 2	1	114,5
	2	106,0
	3	127,3
	4	120,8
	5	106,5
	6	95,4
	7	132,1
	8	120,6
	9	137,0
	10	114,0
	11	107,8
	13	109,8
	14	156,2
	16	96,0
	17	102,8
	18	131,9
	19	123,8
	20	125,1
	Media	125,3

5 Los datos resumidos en las Tablas 1 y 2, respectivamente, se muestran también gráficamente en la Figura 1. Los datos de estas Tablas también se han utilizado para calcular las gráficas en caja mostradas en la Figura 2. Las Figuras 1 y 2 demuestran que existe una diferencia considerable en los valores medios de endostatina, medidos en sueros derivados de pacientes con insuficiencia cardíaca en comparación con los valores de endostatina, medidos en sueros derivados de individuos control aparentemente sanos.

10 Ejemplo 2
Combinaciones de marcadores que comprenden el marcador endostatina en la evaluación de la insuficiencia cardíaca

15 Ejemplo 2.1
Combinación de marcadores NT-proBNP y endostatina

20 La combinación de marcador NT-proBNP y endostatina se evalúa para la diferenciación de pacientes en estadio B y estadios C más D, respectivamente. La precisión diagnóstica se evalúa analizando muestras líquidas individuales obtenidas de grupos de individuos bien caracterizados, es decir, 50 individuos en el estadio B de acuerdo con los

5 criterios ACA/ACC para la clasificación de IC y 50 pacientes que padecen de IC y que tienen el estadio C de acuerdo con los criterios ACA/ACC para la clasificación de IC. El NT-proBNP medido por un ensayo comercialmente disponible (Roche Diagnostics, NT-proBNP-assay (Nº Cat. 03 121 640 160 para el analizador de inmunoensayo Elecsys® Systems) y la endostatina medida como se ha descrito anteriormente se cuantifican en una muestra de suero obtenida de cada uno de estos individuos El análisis de ROC se realiza de acuerdo con Zweig, MH, y Campbell, G., supra. El poder discriminativo para diferenciar a los pacientes en estadio C de los individuos en estadio B para los combinación de endostatina con el marcador establecido NT-proBNP se calcula mediante análisis discriminativo regularizado (Friedman, J.H., Regularized Discriminant Analysis, Journal of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175).

10

Ejemplo 2.2

Combinación de marcadores troponina T y endostatina

15 La combinación de marcadores troponina T y endostatina se evalúa para la diferenciación de pacientes que sufren de un evento cardíaco agudo de pacientes que sufren de cardiopatía crónica, respectivamente. La precisión diagnóstica se evalúa analizando muestras líquidas individuales obtenidas de grupos bien caracterizados de individuos, es decir, 50 individuos diagnosticados con un evento cardíaco agudo y 50 individuos diagnosticados con enfermedad cardíaca crónica. La troponina T medida por un ensayo comercialmente disponible (Roche Diagnostics, ensayo de troponina T (nº de cat. 201 76 44 para el analizador de inmunoensayo Elecsys® Systems) y endostatina medida como se ha descrito anteriormente se cuantifican en una muestra de suero obtenida de cada uno de estos individuos. El análisis de ROC se realiza de acuerdo con Zweig, MH, y Campbell, G., supra. El poder discriminativo para diferenciar a los pacientes en estadio C de los individuos en estadio B para la combinación de endostatina con el marcador establecido troponina T se calcula mediante análisis discriminativo regularizado (Friedman, J.H., J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175).

25

Ejemplo 2.3

La combinación de marcadores endostatina y PCR

30 La combinación de marcadores de proteína C reactiva y endostatina se evalúa para la diferenciación de pacientes diagnosticados que tienen una cardiomiopatía versus controles que no sufren de ninguna enfermedad cardíaca de confusión, respectivamente. La precisión diagnóstica se evalúa analizando muestras líquidas individuales obtenidas de grupos bien caracterizados de 50 individuos con cardiomiopatía y de 50 individuos control sanos. La PCR medida por un ensayo comercialmente disponible (Roche Diagnostics, ensayo de PCR (ensayo de alta sensibilidad de la proteína C reactiva Tina-quant (látex) - Roche nº Cat. 11972855216) y la endostatina medida como se ha descrito anteriormente se cuantifican en una muestra de suero obtenida de cada uno de estos individuos. El análisis de ROC se realiza de acuerdo con Zweig, MH, y Campbell, G., supra. El poder discriminativo para diferenciar los pacientes en estadio C de los individuos en estadio B para la combinación de endostatina con el marcador establecido PCR se calcula mediante análisis discriminativo regularizado (Friedman, JH, J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175).

40

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Uso de endostatina como marcador para la insuficiencia cardaica
 5 <130> 26087 WO
 <150> EP09005801.7
 <151> 2009-04-27
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.3
 10 <210> 1
 <211> 1519
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 1

Met Ala Pro Tyr Pro Cys Gly Cys His Ile Leu Leu Leu Leu Phe Cys
 1 5 10 15
 Cys Leu Ala Ala Ala Arg Ala Asn Leu Leu Asn Leu Asn Trp Leu Trp
 20 25 30
 Phe Asn Asn Glu Asp Thr Ser His Ala Ala Thr Thr Ile Pro Glu Pro
 35 40 45
 Gln Gly Pro Leu Pro Val Gln Pro Thr Ala Asp Thr Thr Thr His Val
 50 55 60
 Thr Pro Arg Asn Gly Ser Thr Glu Pro Ala Thr Ala Pro Gly Ser Pro
 65 70 75 80
 Glu Pro Pro Ser Glu Leu Leu Glu Asp Gly Gln Asp Thr Pro Thr Ser
 85 90 95
 Ala Glu Ser Pro Asp Ala Pro Glu Glu Asn Ile Ala Gly Val Gly Ala
 100 105 110
 Glu Ile Leu Asn Val Ala Lys Gly Ile Arg Ser Phe Val Gln Leu Trp
 115 120 125
 Asn Asp Thr Val Pro Thr Glu Ser Leu Ala Arg Ala Glu Thr Leu Val
 130 135 140

ES 2 607 491 T3

Leu Glu Thr Pro Val Gly Pro Leu Ala Leu Ala Gly Pro Ser Ser Thr
 145 150 155 160

Pro Gln Glu Asn Gly Thr Thr Leu Trp Pro Ser Arg Gly Ile Pro Ser
 165 170 175

Ser Pro Gly Ala His Thr Thr Glu Ala Gly Thr Leu Pro Ala Pro Thr
 180 185 190

Pro Ser Pro Pro Ser Leu Gly Arg Pro Trp Ala Pro Leu Thr Gly Pro
 195 200 205

Ser Val Pro Pro Pro Ser Ser Glu Arg Ile Ser Glu Glu Val Gly Leu
 210 215 220

Leu Gln Leu Leu Gly Asp Pro Pro Pro Gln Gln Val Thr Gln Thr Asp
 225 230 235 240

Asp Pro Asp Val Gly Leu Ala Tyr Val Phe Gly Pro Asp Ala Asn Ser
 245 250 255

Gly Gln Val Ala Arg Tyr His Phe Pro Ser Leu Phe Phe Arg Asp Phe
 260 265 270

Ser Leu Leu Phe His Ile Arg Pro Ala Thr Glu Gly Pro Gly Val Leu
 275 280 285

Phe Ala Ile Thr Asp Ser Ala Gln Ala Met Val Leu Leu Gly Val Lys
 290 295 300

Leu Ser Gly Val Gln Asp Gly His Gln Asp Ile Ser Leu Leu Tyr Thr
 305 310 315 320

Glu Pro Gly Ala Gly Gln Thr His Thr Ala Ala Ser Phe Arg Leu Pro
 325 330 335

Ala Phe Val Gly Gln Trp Thr His Leu Ala Leu Ser Val Ala Gly Gly
 340 345 350

Phe Val Ala Leu Tyr Val Asp Cys Glu Glu Phe Gln Arg Met Pro Leu
 355 360 365

Ala Arg Ser Ser Arg Gly Leu Glu Leu Glu Pro Gly Ala Gly Leu Phe
 370 375 380

ES 2 607 491 T3

Val Ala Gln Ala Gly Gly Ala Asp Pro Asp Lys Phe Gln Gly Val Ile
 385 390 395 400

Ala Glu Leu Lys Val Arg Arg Asp Pro Gln Val Ser Pro Met His Cys
 405 410 415

Leu Asp Glu Glu Gly Asp Asp Ser Asp Gly Ala Ser Gly Asp Ser Gly
 420 425 430

Ser Gly Leu Gly Asp Ala Arg Glu Leu Leu Arg Glu Glu Thr Gly Ala
 435 440 445

Ala Leu Lys Pro Arg Leu Pro Ala Pro Pro Pro Val Thr Thr Pro Pro
 450 455 460

Leu Ala Gly Gly Ser Ser Thr Glu Asp Ser Arg Ser Glu Glu Val Glu
 465 470 475 480

Glu Gln Thr Thr Val Ala Ser Leu Gly Ala Gln Thr Leu Pro Gly Ser
 485 490 495

Asp Ser Val Ser Thr Trp Asp Gly Ser Val Arg Thr Pro Gly Gly Arg
 500 505 510

Val Lys Glu Gly Gly Leu Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Val Pro
 515 520 525

Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Pro Pro Gly Ser Pro Cys Leu Pro Gly
 530 535 540

Pro Pro Gly Leu Pro Cys Pro Val Ser Pro Leu Gly Pro Ala Gly Pro
 545 550 555 560

Ala Leu Gln Thr Val Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
 565 570 575

Arg Asp Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Glu Pro Gly Asp Pro Gly Glu
 580 585 590

Asp Gly Lys Pro Gly Asp Thr Gly Pro Gln Gly Phe Pro Gly Thr Pro
 595 600 605

Gly Asp Val Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Asp Pro Gly Val Gly Glu
 610 615 620

ES 2 607 491 T3

Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser
625 630 635 640

Phe Arg His Asp Lys Leu Thr Phe Ile Asp Met Glu Gly Ser Gly Phe
645 650 655

Gly Gly Asp Leu Glu Ala Leu Arg Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Pro
660 665 670

Pro Gly Pro Pro Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Glu Pro Gly Arg Phe
675 680 685

Gly Val Asn Ser Ser Asp Val Pro Gly Pro Ala Gly Leu Pro Gly Val
690 695 700

Pro Gly Arg Glu Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Pro
705 710 715 720

Gly Pro Pro Gly Arg Glu Gly Pro Pro Gly Arg Thr Gly Gln Lys Gly
725 730 735

Ser Leu Gly Glu Ala Gly Ala Pro Gly His Lys Gly Ser Lys Gly Ala
740 745 750

Pro Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Glu Ser Gly Leu Ala Gly Ala Pro
755 760 765

Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
770 775 780

Pro Gly Leu Pro Ala Gly Phe Asp Asp Met Glu Gly Ser Gly Gly Pro
785 790 795 800

Phe Trp Ser Thr Ala Arg Ser Ala Asp Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly
805 810 815

Leu Pro Gly Leu Lys Gly Asp Pro Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Ala
820 825 830

Lys Gly Glu Val Gly Ala Asp Gly Val Pro Gly Phe Pro Gly Leu Pro
835 840 845

Gly Arg Glu Gly Ile Ala Gly Pro Gln Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly

ES 2 607 491 T3

Leu Glu Ala Glu Met Lys Gly Glu Lys Gly Asp Arg Gly Asp Ala
 1085 1090 1095

Gly Gln Lys Gly Glu Arg Gly Glu Pro Gly Gly Gly Gly Phe Phe
 1100 1105 1110

Gly Ser Ser Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
 1115 1120 1125

Pro Arg Gly Tyr Pro Gly Ile Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ser Ile
 1130 1135 1140

Arg Gly Gln Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Ile
 1145 1150 1155

Gly Tyr Glu Gly Arg Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 1160 1165 1170

Gly Pro Pro Ser Phe Pro Gly Pro His Arg Gln Thr Ile Ser Val
 1175 1180 1185

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Thr
 1190 1195 1200

Met Gly Ala Ser Ser Gly Val Arg Leu Trp Ala Thr Arg Gln Ala
 1205 1210 1215

Met Leu Gly Gln Val His Glu Val Pro Glu Gly Trp Leu Ile Phe
 1220 1225 1230

Val Ala Glu Gln Glu Glu Leu Tyr Val Arg Val Gln Asn Gly Phe
 1235 1240 1245

Arg Lys Val Gln Leu Glu Ala Arg Thr Pro Leu Pro Arg Gly Thr
 1250 1255 1260

Asp Asn Glu Val Ala Ala Leu Gln Pro Pro Val Val Gln Leu His
 1265 1270 1275

Asp Ser Asn Pro Tyr Pro Arg Arg Glu His Pro His Pro Thr Ala
 1280 1285 1290

Arg Pro Trp Arg Ala Asp Asp Ile Leu Ala Ser Pro Pro Arg Leu
 1295 1300 1305

ES 2 607 491 T3

Pro Glu Pro Gln Pro Tyr Pro Gly Ala Pro His His Ser Ser Tyr
 1310 1315 1320

Val His Leu Arg Pro Ala Arg Pro Thr Ser Pro Pro Ala His Ser
 1325 1330 1335

His Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn Ser
 1340 1345 1350

Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln
 1355 1360 1365

Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg
 1370 1375 1380

Ala Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg
 1385 1390 1395

Arg Ala Asp Arg Ala Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu
 1400 1405 1410

Leu Leu Phe Pro Ser Trp Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly
 1415 1420 1425

Pro Leu Lys Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp
 1430 1435 1440

Val Leu Arg His Pro Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly
 1445 1450 1455

Ser Asp Pro Asn Gly Arg Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr
 1460 1465 1470

Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu
 1475 1480 1485

Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His
 1490 1495 1500

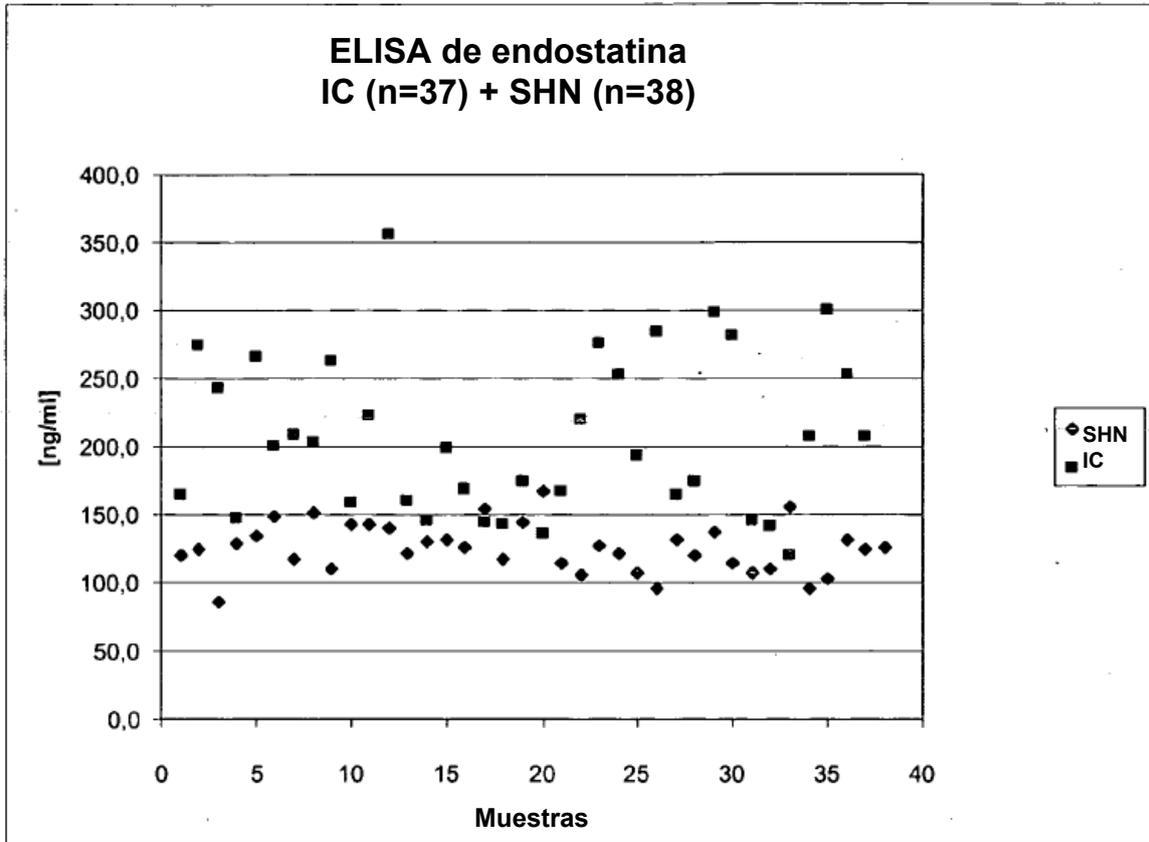
Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ala Ser
 1505 1510 1515

Lys

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca en un individuo que comprende las etapas de
- 5 a) medir en una muestra obtenida del individuo la concentración de la endostatina marcadora,
b) medir opcionalmente en la muestra la concentración de uno o más marcadores diferentes de insuficiencia
cardíaca, en el que dicho uno o más marcadores se selecciona del grupo que consiste en un marcador de péptido
natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de inflamación y
10 c) diagnosticar la insuficiencia cardíaca comparando la concentración determinada en la etapa (a) y opcionalmente
la concentración o concentraciones determinadas en la etapa (b) respecto a la concentración de este marcador o de
estos marcadores como se establece en una muestra control, en donde dicha muestra se selecciona del grupo que
consiste en suero, plasma y sangre completa.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza además porque dicha muestra se selecciona de
suero o plasma.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que se caracteriza además porque dicho
marcador o marcadores adicionales es un marcador de inflamación.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza además porque dicho marcador o marcadores
adicionales es NT-proBNP.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza además porque dicho marcador o marcadores
adicionales es troponina T.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la endostatina marcadora se mide en una muestra
obtenida de un individuo en riesgo de insuficiencia cardíaca.
- 30 7. El uso de la proteína endostatina como molécula marcadora en el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca en una
muestra seleccionada del grupo que consiste en suero, plasma y sangre completa.
8. El uso de una combinación de marcadores que comprende endostatina y uno o más marcadores de insuficiencia
cardíaca en el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca, en el que uno o más marcadores se seleccionan del grupo
que consiste en un marcador de péptido natriurético, un marcador de troponina cardíaca y un marcador de
35 inflamación en una muestra seleccionada del grupo que consiste en suero, plasma y sangre completa.
9. El uso de una combinación de marcadores de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende al menos
endostatina, y NT-proBNP.

Fig.1



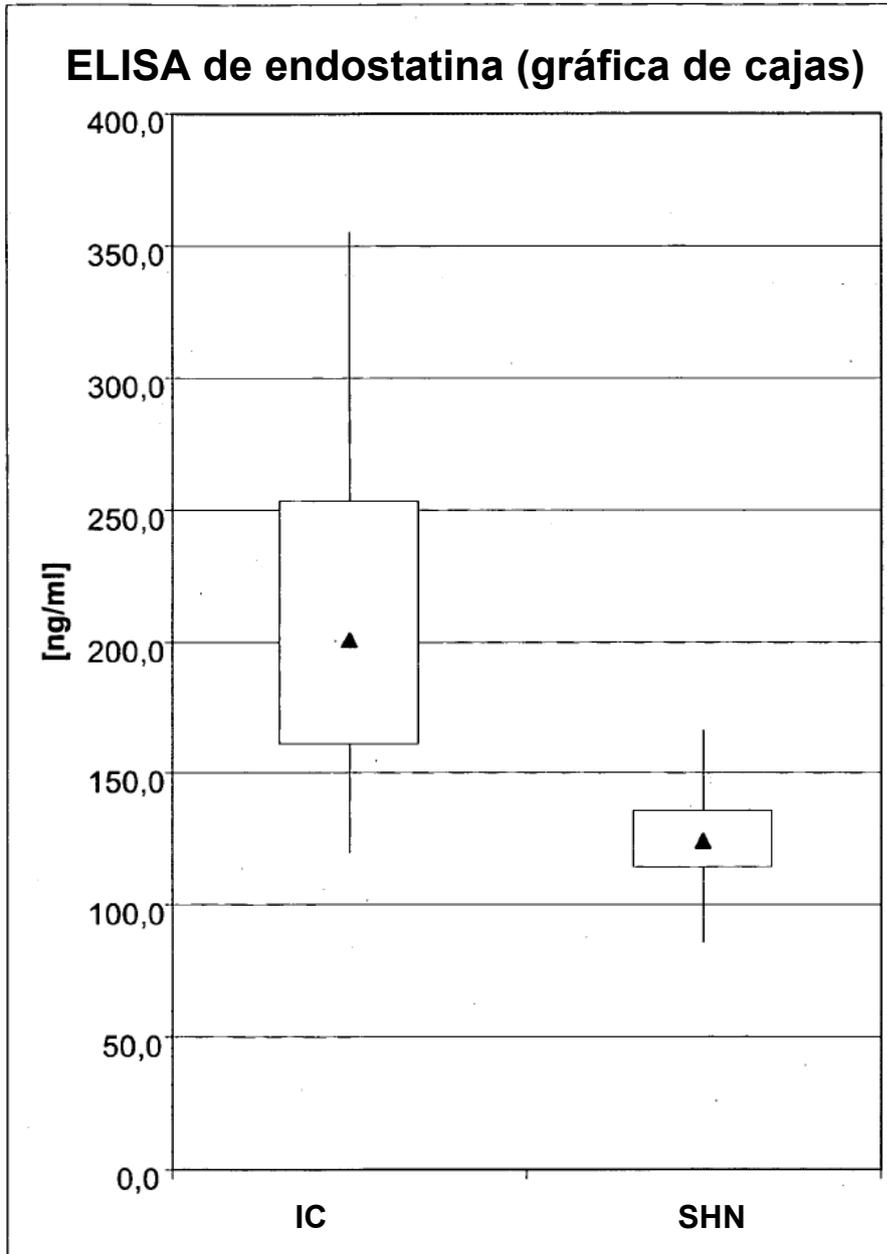


Fig.2