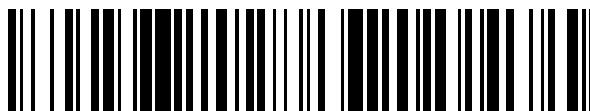


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 632**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2011 PCT/GB2011/000073**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO2011089392**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2011 E 11701541 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2526423**

54 Título: **Métodos y dispositivos para diagnosticar trastornos cardiacos**

30 Prioridad:

22.01.2010 GB 201001073

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

21.04.2017

73 Titular/es:

**ST GEORGE'S HEALTHCARE NHS TRUST
(100.0%)
Blackshaw Road Tooting
London, Greater London SW17 0QT, GB**

72 Inventor/es:

GAZE, DAVID

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 609 632 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

Métodos y dispositivos para diagnosticar trastornos cardiacos

5 Campo técnico

Esta invención pertenece al campo de la cardiología. En particular, la invención se refiere a métodos para diagnosticar trastornos cardiacos.

10 Técnica antecedente

Las cardiopatías y los trastornos cardiacos son una causa fundamental de muerte en el mundo desarrollado. Una categoría particular se describe como trastornos cardiacos agudos (ACD). Los ACD están causados por la rotura o erosión de las placas ateromatosas en las arterias coronarias epicárdicas. La exposición del núcleo de la placa activa la cascada de coagulación y da como resultado trombosis dentro de la placa. Esto inicia a continuación la agregación plaquetaria. Existen tres posibles mecanismos mediante los cuales puede producirse, a continuación, lesiones del miocardio.

En primer lugar, la agregación plaquetaria intraluminal puede causar suficiente oclusión vascular para que se produzcan lesiones de los cardiomiocitos. No es necesario que la oclusión sea total para producir mionecrosis. La oclusión parcial producirá una reducción en la tasa de suministro de sangre en el miocardio aguas abajo. Si ya existe una disparidad suministro/demanda en esta zona, la reducción del suministro de sangre puede ser suficiente para hacer a una zona del miocardio no viable. El tejido se volverá entonces suficientemente isquémico para que se produzca necrosis. Lo más probable es que esto afecte a zonas pequeñas del miocardio en las zonas limítrofes de diferentes ramas del suministro vascular.

El segundo mecanismo es la liberación de microagregados plaquetarios. Estos embolizarán vasos pequeños causando isquemia e infarto localizado (Davies et al, 1986; Falk E, 1995).

Finalmente, la progresión de la formación de un trombo blanco, hasta la activación de la cascada de coagulación dará como resultado oclusión parcial o total del vaso. La oclusión parcial producirá isquemia y necrosis si produce un flujo inadecuado para mantener la viabilidad tisular aguas abajo, tal como se ha descrito anteriormente. La oclusión total producirá inicialmente isquemia. Esta progresará a necrosis si se mantiene y existe un suministro de sangre colateral inadecuado o no existe ninguno.

Con el fin de limitar o prevenir lesiones del miocardio es deseable, por lo tanto, detectar isquemia causada por trastornos cardiacos antes de que progrese a necrosis/infarto. En teoría, si la isquemia puede detectarse antes de la progresión a necrosis, puede ser posible intervenir para limitar o prevenir lesiones del miocardio.

Se han realizado intentos de detectar isquemia usando una serie de biomarcadores, por ejemplo colina, ácidos grasos libres no unidos (FFAu, *unbound free fatty acids*) y albúmina modificada por isquemia (IMA[®]). Desafortunadamente, todos estos marcadores adolecen de la desventaja de que los ensayos que dependen de ellos no pueden discriminar fácilmente entre pacientes con o sin trastornos cardiacos. Además, aunque estos ensayos pueden ser sensibles, permitiendo detección temprana, carecen de especificidad. Además, los marcadores se obtienen a menudo químicamente y se producen en cualquier isquemia o como parte de la fisiología normal, por ejemplo lactato o ácidos grasos libres. Otros marcadores tempranos tales como mioglobina e isoenzima CK-MB son elevados en enfermedades no cardiacas tales como traumatismo/enfermedades del músculo esquelético e insuficiencia renal.

A la luz de los problemas asociados con biomarcadores de isquemia, se usan ensayos para biomarcadores de necrosis de miocardio para diagnosticar trastornos cardiacos. La medición de las troponinas cardiacas, troponina T cardiaca (cTnT) y troponina I cardiaca (cTnI), ha obtenido reconocimiento como el estándar de referencia de diagnóstico para necrosis de miocardio y, como tales, pueden ser predictivas de infarto de miocardio. La cinética de liberación muestra que la elevación de troponina se produce aproximadamente 4-6 horas después de la aparición de la necrosis de miocardio y alcanza un máximo a las 12-14 horas. Existe, por lo tanto, una ventana de 4-6 horas en las que se están produciendo lesiones del miocardio, pero no se puede realizar un diagnóstico y el tratamiento correcto no puede iniciarse.

Además, la naturaleza sensible de estos ensayos ha revelado también que la necrosis de miocardio también se encuentra en una serie de otras situaciones clínicas, destacando la necesidad de usar toda la información clínica para el diagnóstico de trastornos cardiacos.

El documento Doehner et al (2010) *Int J Cardiol*, 138, 19-24 desvela que, en pacientes no diabéticos con insuficiencia cardiaca crónica, el GLUT4 del músculo esquelético se reduce en paralelo a la gravedad de la enfermedad, independientemente de la composición corporal.

El documento Shave et al (2007) Curr Med Chem, 14, 1427-1436 revisa la influencia del ejercicio sobre una serie de biomarcadores cardiacos establecidos y novedosos.

5 El documento EP 1 913 949 desvela un método para incrementar específicamente la captación de glucosa en una célula muscular donde se proporciona un estímulo a dicha célula, estímulo tras el cual el GLUT4 es translocado desde el compartimento de almacenamiento de GLUT4 directamente al sarcolema.

10 El documento Adams et al (1993) Circulation, 88, 101-106 desvela que las elevaciones de cTnI son altamente específicas de lesión de miocardio.

10 El documento Okazaki et al (2003) Nature Medicine, 9, 1477-1483 desvela que autoanticuerpos contra troponina I cardiaca son responsables de cardiomiopatía dilatada en ratones deficientes en PD-1.

15 El documento La Vecchia et al (2000) The Journal of Heart and Lung Transplantation, 19, 644-652 desvela que cTnI se detecta en la sangre del 25 %-33 % de los pacientes con insuficiencia cardiaca grave.

20 Existe, por lo tanto, una necesidad en la técnica de métodos que sean capaces de detectar de forma sensible, específica y rápida la aparición de isquemia cardiaca y necrosis de miocardio causadas por trastornos cardiacos en el punto más temprano posible.

Divulgación de la invención

25 El inventor ha constatado sorprendentemente que pueden usarse polipéptidos de membrana específicos cardiacos para superar los problemas asociados con la técnica anterior y proporcionar biomarcadores novedosos para uso en métodos que son capaces de detectar de forma sensible, específica y rápida la aparición de isquemia cardiaca y necrosis de miocardio.

30 Por consiguiente, la invención proporciona un método de diagnóstico de trastorno cardiaco agudo, caracterizado por lesiones celulares de tejido cardiaco en un paciente, que comprende detectar el nivel de Glut4 en una muestra del paciente y comparar dicho nivel con un nivel de control, en el que un nivel que es mayor que dicho nivel de control es indicativo del trastorno, y en el que la muestra del paciente es una muestra de sangre.

35 Los trastornos cardiacos agudos comienzan con isquemia. Si la isquemia no se resuelve, una compleja ruta de acontecimientos conduce a la desorganización de la membrana plasmática, que, a su vez, conduce a la liberación del contenido celular al entorno circundante y, finalmente, al torrente sanguíneo.

40 Los ensayos de troponina conocidos en la técnica dependen de la liberación del contenido celular con el fin de ser capaces de detectar cTnT y/o cTnI. Sin embargo, tanto cTnT como cTnI son polipéptidos intracelulares y la gran mayoría (>90 %) de estas moléculas están unidas al aparato contráctil de miofibrillas dentro de la célula. Una vez que la membrana plasmática ha sido desorganizada, hay un periodo de latencia, en el que el aparato contráctil se desorganiza, las troponinas se liberan y se produce migración a través del citoplasma al entorno circundante y, finalmente, la circulación. Este periodo de latencia es la razón de que los niveles de troponina no se eleven hasta 4-6 horas después de la aparición del infarto de miocardio. Se están desarrollando ensayos más sensibles para detectar troponina más temprano en muestras clínicas.

45 El uso de polipéptidos de membrana específicos cardiacos como biomarcadores para isquemia supera este problema. A diferencia de las troponinas, la liberación de polipéptidos de membrana específicos cardiacos no requiere que se produzca necrosis o la desorganización completa de la membrana plasmática. La isquemia causa cambios de permeabilidad en las membranas celulares, haciendo que éstas se vuelvan "fluidas" e inconexas. Por lo tanto, la pérdida de polipéptidos de membrana específicos cardiacos puede producirse sin que la célula se vuelva necrótica, permitiendo una detección más temprana.

50 Una vez que se produce la necrosis, polipéptidos de membrana específicos cardiacos adicionales son liberados casi inmediatamente al entorno circundante y son fácilmente detectables en el torrente sanguíneo del paciente. Por lo tanto, el periodo de latencia de 4-6 horas observado con ensayos de troponina se evita y un diagnóstico e intervención terapéutica correctos pueden realizarse en una fase más temprana, incrementando la probabilidad de que las lesiones del miocardio se reduzcan o se prevengan y se administre un tratamiento más temprano.

60 No es necesario que se produzca necrosis para liberar polipéptidos integrales de membrana. En isquemia, se producen cambios de permeabilidad y las membranas se vuelven "fluidas" e inconexas. La pérdida de polipéptidos de membrana puede producirse sin que la célula se vuelva necrótica.

65 En la presente invención, el polipéptido de membrana específico cardiaco usado como biomarcador para isquemia es la isoforma 4 del transportador de glucosa (Glut4). Glut4 es un polipéptido transportador unido que se encuentra en la membrana de la superficie celular. Además de otorgar las ventajas descritas anteriormente para polipéptidos de membrana, el uso de Glut4 como biomarcador otorga una ventaja adicional.

5 Durante periodos de isquemia de miocardio, los cardiomiocitos tienen que depender exclusivamente de la glucólisis anaerobia para la producción de energía; para esto, las células tienen que depender de una mayor entrada de glucosa dentro de la célula así como un incremento de la glucólisis. Esto se consigue mediante la estimulación de α 1-adrenorreceptores, lo que incrementa el transporte de glucosa al interior de los cardiomiocitos, translocando el transportador de glucosa Glut4 desde el citoplasma a la membrana plasmática. Por lo tanto, existe una mayor concentración de Glut4 en las membranas plasmáticas de células en condiciones isquémicas.

10 Dado que existe una mayor concentración de Glut4 en la membrana plasmática de células en condiciones isquémicas, la desorganización de estas células liberará una mayor cantidad de Glut4 al torrente sanguíneo del paciente cuando se comparan con la desorganización de células cardíacas causada por la muerte celular normal. Este contraste permite una detección más sensible de Glut4 y, por lo tanto, isquemia cardíaca y necrosis.

15 En la invención, el trastorno cardíaco se caracteriza por lesiones celulares de tejido cardíaco. Dichas enfermedades incluyen, aunque sin limitarse a: hipertensión, angina, isquemia, infarto de miocardio, enfermedad cardiorenal y lesión por reperfusión.

La muestra del paciente es una muestra de sangre.

20 Preferentemente, el nivel del Glut4 se determina poniendo en contacto una muestra del paciente con un reactivo de detección que se une específicamente al Glut4. Preferentemente, el reactivo de detección es un anticuerpo.

25 La invención también incluye un método para evaluar la eficacia de un tratamiento para un trastorno cardíaco agudo, caracterizado por lesiones celulares de tejido cardíaco, que comprende detectar el nivel de Glut4 en una muestra del paciente antes, durante y/o después del tratamiento y comparar dicho nivel con un nivel de control, en el que la muestra del paciente es una muestra de sangre.

Un método de diagnóstico

30 La invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno cardíaco agudo. Se apreciará que "diagnóstico" de acuerdo con la invención puede variar entre un diagnóstico clínico definitivo de un trastorno y una indicación de que el paciente debe someterse a ensayos adicionales que pueden conducir a un diagnóstico definitivo. Por ejemplo, el método de la invención puede usarse en combinación con otros métodos para diagnosticar trastornos cardíacos, por ejemplo determinación física de los síntomas de un paciente, que incluye electrocardiogramas (ECG), así como otros ensayos bioquímicos, por ejemplo determinación de los niveles de troponina.

35 Además, se apreciará que "diagnóstico", de acuerdo con la invención, puede indicar que un paciente corre el riesgo de padecer un trastorno cardíaco agudo y, por lo tanto, requiere monitorización adicional, usando los métodos de la invención o con otros métodos para diagnosticar un trastorno cardíaco. Por ejemplo, un paciente puede mostrar un mayor nivel de Glut4 cuando se compara con un control. Sin embargo, este nivel puede ser solamente marginalmente mayor y, por lo tanto, el paciente puede requerir monitorización adicional para determinar si el nivel está cambiando. En esta situación, los métodos proporcionan un medio de determinación del riesgo para un paciente.

45 Además, el diagnóstico incluye monitorizar el progreso de un trastorno cardíaco agudo en un paciente del que ya se sospecha o se sabe que tiene un trastorno cardíaco agudo. Además, el diagnóstico incluye proporcionar una indicación de pronóstico para pacientes que se sabe que tienen un trastorno cardíaco agudo. Por ejemplo, diferentes niveles de Glut4 pueden indicar un diferente desenlace clínico para un paciente.

50 La eficacia de un régimen de tratamiento para el tratamiento de trastornos cardíacos agudos también puede monitorizarse mediante los métodos de la invención, por ejemplo para determinar su eficacia.

Todas estas técnicas están dentro del significado general de "diagnóstico" en la presente invención.

Trastorno cardíaco

55 Tal como se ha descrito anteriormente, la invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que los polipéptidos de membrana específicos cardíacos son liberados rápidamente a la circulación del paciente después de la desorganización de la membrana plasmática. Por lo tanto, los métodos de la invención son adecuados para detectar cualquier tipo de trastorno cardíaco en el que se producen lesiones celulares cardíacas. Por lo tanto, la expresión "trastorno cardíaco", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno en el corazón en el que se producen lesiones celulares. En la invención, el trastorno cardíaco es un trastorno cardíaco agudo.

65 Preferentemente, el trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en hipertensión, angina, isquemia, infarto de miocardio y lesión por reperfusión.

Polipéptido de membrana específico cardiaco

La expresión “polipéptido de membrana específico cardiaco” se refiere a cualquier polipéptido que está fijado a o asociado con la membrana de una célula cardiaca. Preferentemente, el polipéptido será específico de células cardiacas, es decir del polipéptido presente en el cuerpo del paciente, más del 80 % se encontrará en células cardiacas, es decir al menos el 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,5 % o más.

Los polipéptidos de membrana específicos cardiacos incluyen polipéptidos de membrana integrales y periféricos. En la presente invención, el polipéptido de membrana específico cardiaco es Glut4.

Los métodos de la invención pueden incluir medir más de una proteína de membrana específica cardiaca. Por ejemplo, el nivel de dos o más proteínas de membrana específicas cardiacas puede medirse en una muestra del paciente. Por lo tanto, la expresión “proteína de membrana específica cardiaca”, tal como se usa en el presente documento, también incluye el plural, es decir dos o más proteínas de membrana específicas cardiacas.

Glut4

Tal como se ha descrito anteriormente, Glut4 es un polipéptido transportador unido que se encuentra en la membrana de la superficie celular de células cardiacas. Glut4 es un transportador de glucosa regulado por insulina. En ausencia de insulina, el Glut4 es secuestrado en el interior de la célula dentro de las bicapas lipídicas de vesículas. La insulina induce la translocación de Glut4 desde sitios de almacenamiento intracelular a la membrana plasmática. La presencia de insulina estimula el Glut4 para ser expresado en la membrana plasmática.

El Glut4 también se expresa en la membrana celular durante periodos de isquemia de miocardio. Durante dichos periodos los cardiomiocitos tienen que depender exclusivamente de la glucólisis anaerobia para la producción de energía; para esto, las células tienen que depender de una mayor entrada de glucosa dentro de la célula, así como una mayor glucólisis. Esto se consigue mediante la estimulación de alfa-adrenorreceptores, lo que incrementa el transporte de glucosa al interior de los cardiomiocitos, translocando el transportador de glucosa Glut4 desde el citoplasma a la membrana plasmática.

En la superficie celular, el Glut4 facilita la difusión de glucosa circulante hacia abajo en su gradiente de concentración en las células.

El Glut4 (también conocido como SLC2A4) es un polipéptido de 509 aminoácidos descrito en el número de acceso del NCBI NP_001033 y dado en el presente documento como la SEQ ID NO: 1. El Glut4 se mapea en el cromosoma 17: 7,13-7,13 Mb.

El término “Glut4” se refiere al polipéptido de longitud completa, tal como se ha descrito anteriormente, así como fragmentos y variantes del polipéptido que resultan de la degradación normal del polipéptido dentro del cuerpo y a partir de la diversidad genética normal dentro de una población.

Por ejemplo, una vez que Glut4 es liberado desde la membrana celular, puede estar expuesto a proteasas dentro del cuerpo, lo que causa su degradación. El término “Glut4” también incluye (a) un polipéptido que comprende un fragmento de al menos *aa* aminoácidos de un polipéptido Glut4 y (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el *bb* % de identidad a un polipéptido Glut4. Estos polipéptidos incluyen variantes (por ejemplo variantes alélicas, homólogos, ortólogos, mutantes, etc.).

El valor porcentual de *bb*, tal como se usó anteriormente, puede ser 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 o 100.

El valor de *aa*, tal como se usó anteriormente, puede ser 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o más. El valor de *aa* puede ser menor de 509 (por ejemplo menor de 500, 250 o 50).

Referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos significa que, cuando están alineadas, ese porcentaje de aminoácidos son iguales al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia puede determinarse usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en la sección 7.7.18 del documento “Current Protocols in Molecular Biology”. Un alineamiento preferido se determina mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización por apertura de huecos de 12 y una penalización por extensión de huecos de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en el documento Smith & Waterman (1981).

Muestra del paciente

En los métodos de la invención, la muestra del paciente es una muestra de sangre.

- 5 El paciente es generalmente un ser humano, preferentemente un ser humano adulto. En algunas realizaciones, el paciente es un paciente de diabetes, por ejemplo un paciente de diabetes de tipo II que está recibiendo insulina.

10 Los polipéptidos de membrana específicos cardiacos pueden detectarse en la propia muestra del paciente, o pueden detectarse en material derivado de la muestra. Se sigue considerando que estos son "muestras del paciente" dentro del significado de la invención.

Detección del nivel de un polipéptido de membrana específico cardiaco

15 Están disponibles diversas técnicas para detectar el nivel de polipéptidos particulares en una muestra. Estas técnicas dependerán habitualmente de un reactivo de detección específico del polipéptido de membrana específico cardiaco, es decir un reactivo que se unirá preferentemente al polipéptido de membrana específico cardiaco diana.

20 Estas técnicas incluyen técnicas de inmunoensayo generales que se basan en la interacción específica entre un anticuerpo y una secuencia de aminoácidos antigénica en el polipéptido. Las técnicas adecuadas incluyen métodos inmunohistológicos estándar, ELISA, RIA, FIA, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, etc.

25 Donde se usan anticuerpos como el reactivo de detección, estos pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo IgA, IgG, IgM es decir una cadena pesada α , γ o μ). Los anticuerpos pueden tener una cadena ligera κ o λ . Dentro del isotipo IgG, los anticuerpos pueden ser de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El término "anticuerpo" incluye cualquier inmunoglobulina o derivado de la misma natural o artificial adecuado. En general, el anticuerpo comprenderá una región Fv que posee actividad de unión al antígeno específica. Esto incluye, aunque sin limitarse a: inmunoglobulinas completas, fragmentos de inmunoglobulina de unión al antígeno (por ejemplo Fv, Fab, F(ab')₂ etc.), anticuerpos monocatenarios (por ejemplo scFv), oligocuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos revestidos, etc.

30 Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales.

Otros reactivos de detección incluyen aptámeros y péptidos que se unen al polipéptido de membrana específico cardiaco.

35 Los polipéptidos de membrana específicos cardiacos también pueden detectarse mediante ensayos funcionales, por ejemplo, ensayos para detectar actividad de unión o actividad enzimática. El experto en la materia estará al tanto de ensayos adecuados.

40 Otra manera de detectar polipéptidos de membrana específicos cardiacos es usar técnicas proteómicas estándar, por ejemplo, purificar o separar polipéptidos y a continuación detectar la proteína de interés basándose en el tamaño o usar técnicas de inmunoafinidad tales como transferencias de Western. Por ejemplo, los polipéptidos pueden separarse usando SDS PAGE y las manchas de polipéptidos pueden compararse con una proteína de tamaño correspondiente. Las proteínas pueden transferirse a continuación a nitrocelulosa u otro medio adecuado para realizar transferencia de Western. Las proteínas también pueden detectarse/secuenciarse mediante espectroscopía de masas.

50 También se desvela que el polipéptido de membrana específico cardiaco se detectará usando un "ensayo de diagnóstico inmediato" (POCT). Dichos ensayos están concebidos para usarlos para ensayos de diagnóstico en o cerca del lugar de atención al paciente. Los POCT son habitualmente instrumentos transportables, portátiles y de mano (por ejemplo, glucosímetro, dispositivo de estudio de la conducción nerviosa) y kits de ensayo (por ejemplo, CRP, HBAIC, Homocisteína, ensayo salival de HIV, etc.).

55 Un ejemplo preferido de un POCT es una tira reactiva basada en membrana, opcionalmente circundada por un cartucho de ensayo de plástico, que comprende un reactivo de detección que se une específicamente al polipéptido de membrana específico cardiaco que está siendo ensayado, junto con un control. Estos ensayos requieren pequeñas cantidades de muestra del paciente, por ejemplo pueden requerir solamente una única gota de sangre completa, orina o saliva, y pueden realizarse e interpretarse mediante cualquier facultativo general en el plazo de minutos.

60 Los beneficios fundamentales se obtienen cuando la salida de un dispositivo de POCT se hace disponible inmediatamente dentro de una historia clínica electrónica. Los resultados pueden compartirse instantáneamente con todos los miembros del equipo médico a través de la interfaz de software mejorando la comunicación disminuyendo el tiempo de movimiento de pacientes (TAT). Una reducción de la morbilidad y la mortalidad se ha asociado con técnicas de terapia dirigida a un objetivo (GDT) cuando se usan junto con POCT y la historia clínica electrónica.

65

El término "superior", cuando se refiere al nivel de proteína de membrana específica cardiaca, significa un nivel mayor. La invención se basa en el descubrimiento de que las proteínas de membrana específicas cardiacas son liberadas desde células cardiacas en condiciones isquémicas y por lo tanto, habrá más proteínas de membrana específicas cardiacas presentes en una muestra del paciente si ese paciente está padeciendo un trastorno cardiaco.

Por ejemplo, se considera que el nivel de polipéptido de membrana específico cardiaco es superior en la muestra del paciente si hay un mayor porcentaje del polipéptido cuando se compara con el nivel del polipéptido en la muestra de control. Preferentemente, hay más del 150 % de proteína de membrana específica cardiaca en la muestra del paciente en comparación con el control negativo, es decir al menos el 200, 300, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000 % o más.

La expresión "detectar el nivel" también incluye situaciones donde existe una ausencia del polipéptido a detectar. Una muestra puede contener o ser sospechosa de contener una proteína de membrana específica cardiaca cuya detección se pretende. Incluso si la proteína específica cardiaca está ausente, sin embargo, el método sigue siendo "para detectar" la proteína de membrana específica cardiaca.

Las técnicas pueden requerir el enriquecimiento de polipéptidos diana antes de la detección y técnicas adecuadas serán evidentes para el experto en la materia.

Controles

Tal como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos de membrana específicos cardiacos son liberados desde células cardiacas al entorno circundante y, por lo tanto, al torrente sanguíneo del paciente. Para detectar estos polipéptidos, normalmente se necesita un punto de referencia, es decir un control. El análisis de la muestra de control da un nivel estándar de polipéptido con el que una muestra del paciente puede compararse. Dado que la presencia de polipéptidos de membrana específicos cardiacos es despreciable en condiciones normales y ligeramente elevada en trastornos cardiacos, sin embargo, un punto de referencia puede no siempre ser necesario - niveles significativos indican un trastorno. Aun así, el uso de controles es preferible, particularmente para estandarización o para ensayos cuantitativos.

Un control negativo da un fondo o nivel basal de expresión con el que una muestra del paciente puede compararse. Niveles superiores de polipéptidos de membrana específicos cardiacos con respecto a un control negativo indican que el paciente del que se tomó la muestra está padeciendo un trastorno cardiaco. A la inversa, niveles equivalentes de polipéptidos de membrana específicos cardiacos indican que el paciente no tiene un trastorno cardiaco.

Un control negativo comprenderá generalmente material de pacientes que no padecen un trastorno cardiaco. El control negativo podría ser una muestra del mismo paciente que la muestra del paciente, pero tomada en una fase más temprana en la vida del paciente. Normalmente, el control negativo será el mismo tejido que la muestra del paciente que está siendo ensayada (por ejemplo, una muestra de sangre).

En algunas realizaciones, el control negativo es de un paciente de diabetes que no tiene un trastorno cardiaco agudo y preferentemente no tiene un trastorno cardiaco o es de un grupo de dichos pacientes. En algunas realizaciones, el paciente de diabetes es un paciente de diabetes de tipo II que está recibiendo insulina.

Un control positivo da un nivel de expresión con el que una muestra del paciente puede compararse. Niveles equivalentes o superiores de polipéptidos de membrana específicos cardiacos con respecto a un control positivo indican que el paciente del que se tomó la muestra tiene un trastorno cardiaco. A la inversa, niveles inferiores de polipéptidos de membrana específicos cardiacos indican que el paciente no tiene un trastorno cardiaco.

Un control positivo comprenderá, generalmente, material de un paciente que se sabe que tiene un trastorno cardiaco.

Aunque sin desear quedar ligado por esta teoría, el inventor propone que niveles de origen natural de proteínas de membrana específicas cardiacas pueden variar de acuerdo con la edad y la etnia del paciente. Los niveles también pueden variar de acuerdo con el nivel de forma cardiovascular de pacientes y los pacientes con mejor forma pueden tener niveles de base elevados de proteínas de membrana específicas cardiacas. Además, los pacientes que han participado recientemente en ejercicio físico pueden tener niveles elevados. Por lo tanto, puede ser necesario equiparar la una o más muestras de control basándose en edad, etnia, estado de forma cardiovascular y/o tiempo desde el último ejercicio físico. Preferentemente, donde la muestra de control se toma de otro paciente, ese paciente se seleccionará para coincidir con la edad y/o etnia del paciente que está siendo ensayado.

Otros controles positivos y negativos adecuados serán evidentes para el experto en la materia.

Métodos para evaluar la eficacia de un tratamiento para un trastorno cardiaco

Tal como se ha descrito anteriormente, los métodos de la invención también son adecuados para monitorizar la eficacia de un régimen de tratamiento para el tratamiento de trastornos cardiacos agudos.

5 El método comprende determinar el nivel de Glut4 en una muestra del paciente antes, durante y/o después del tratamiento y comparar dicho nivel con un nivel de control.

10 El nivel de Glut4 se medirá normalmente en múltiples puntos durante todo el tratamiento del paciente. Preferentemente, el nivel de Glut4 se medirá antes de que comience el tratamiento. Preferentemente, el nivel de Glut4 se medirá a continuación en uno o más puntos temporales durante todo el desarrollo del tratamiento del paciente. El nivel de Glut4 también se medirá tras el cese del tratamiento.

15 Una reducción del nivel de Glut4 durante el tratamiento indica que el tratamiento es eficaz en el tratamiento de trastornos cardiacos.

General

20 La expresión "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en" por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

25 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Donde sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1: expresión de GLUT-4 en 11 sujetos voluntarios sanos (Carriles 2-12). Todos fueron negativos para cTnI ($<0,02 \mu\text{g/l}$) y negativos para IMA ($<85 \text{ KU/l}$). Exposición a autorradiografía 2 minutos.

35 Figura 2: expresión de GLUT-4 en 11 sujetos voluntarios sanos (Carriles 2-12). Todos fueron negativos para cTnI ($0,02 \mu\text{g/l}$) y negativos para IMA ($<85 \text{ KU/l}$). Exposición a autorradiografía 5 minutos.

Figura 3: expresión de GLUT-4 en 9 pacientes (carriles 2-10) que se presentan con infarto de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI). Todos fueron positivos para cTnI ($>0,04 \mu\text{g/l}$, intervalo $0,52\text{-}22,52 \mu\text{g/l}$) y positivos para IMA ($>85 \text{ KU/l}$, intervalo $98\text{-}151 \text{ KU/l}$). Exposición a autorradiografía 5 minutos.

40 Figura 4: secuencia cinética de la expresión de GLUT-4 a intervalos cronometrados de 0 h (carril 2), 3 h (carril 3), 6 h (carril 4), 12 h (carril 5), 24 h (carril 6), 48 h (carril 7), 36 h (carril 8), 120 h (carril 9) y 200 h (carril 10) desde la admisión en un paciente con un diagnóstico final de infarto de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI). Las concentraciones de cTnI e IMA correspondientes se muestran en la tabla, debajo de las transferencias de Western.

45 Figura 5: Cuantificación de las transferencias de Western. Comparación de la intensidad de banda del grupo de control con la intensidad de banda del grupo de pacientes de AMI. Usando la prueba de las medianas, había una diferencia estadísticamente significativa en el área de las bandas del grupo de control (mediana (intervalo de confianza al 95 %) = 392 píxeles, 95 %IC = 1964 a 2516) frente al grupo de AMI (mediana 2092 píxeles, 95 %IC = 196 a 1318), $p = 0,0014$.

Modos de llevar a cabo la invenciónEjemplo 1 - Ensayo de los niveles de Glut4Muestras de suero

55 Se obtuvieron muestras de suero de sangre completa extraída en tubos con gel separador de suero Vacutainer™ simples (Beckton Dickinson) de once donantes sanos. Los donantes declararon ningún antecedente de infarto de miocardio anterior, sin antecedentes familiares inmediatos (hermanos o progenitores) de infarto de miocardio y sin antecedentes pasados conocidos de arteriopatía coronaria.

65 Se obtuvieron muestras de suero redundantes de sangre completa extraída en tubos con gel separador de suero Vacutainer™ simples (Beckton Dickinson) de nueve pacientes que tenían un diagnóstico final de infarto de miocardio agudo con elevación del segmento ST (STEMI) de acuerdo con la definición universal de AMI (Circulation 2007; 116: 2634-2653).

Se obtuvo suero redundante de sangre completa extraída en tubos con gel separador de suero Vacutainer™ simples (Beckton Dickinson) a intervalos cronometrados de 0, 3, 6, 12, 24, 48, 36, 120 y 200 horas desde la admisión de un paciente que tenía un diagnóstico final de infarto de miocardio agudo con elevación del segmento ST (STEMI) de acuerdo con la definición universal de AMI (Circulation 2007; 116: 2634-2653).

5

Métodos analíticos:

Todas las muestras de suero se ensayaron para troponina I cardíaca (cTnI) y albúmina modificada por isquemia (IMA). La cTnI se determinó usando el ensayo Centaur TnI-Ultra™ (Siemens Healthcare Diagnostics). La imprecisión de ensayo total del ensayo edra del 5,3 % a 0,08 µg/l y el 3,0 % a 27,2 µg/l, con un límite de detección de 0,006 µg/l y un intervalo de calibración de 50 µg/l. El percentil 99º superior de una población de referencia sana era del 0,04 µg/l. La IMA se determinó usando el ensayo de unión de cobalto de albúmina (ACB®) (Inverness Medical) 30 medida de forma espectrofotométrica en el Cobas MIRA (Roche Diagnostics). El coeficiente de variación del ensayo era el 5,09 % en el intervalo de 56,67 a 66,57 KU/l y el 3,05 % en el intervalo de 147,17 a 158,03 KU/l. El intervalo de calibración fue de 6 a 125 KU/l. El percentil 95º superior de 283 personas aparentemente sanas era 85 KU/l.

10

15

Electroforesis e (Inmuno)transferencia de Western

Se separaron proteínas del suero usando electroforesis en mini-gel Bis-Tris (SDS-PAGE) con poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (12 %) usando el sistema Xcell II (Invitrogen). Se cargaron 10 µl de proteína total sobre el gel de acuerdo con los métodos de Laemmli (Laemmli, 1970) y se separaron durante 1 hora a 200 V. Las proteínas separadas se transfirieron a continuación electroforéticamente sobre membranas de nitro-celulosa (Amersham Pharmacia Biotech) usando el sistema x-cell II. Las membranas se bloquearon durante una noche a 4 °C usando leche desnatada en polvo al 5 % en PBS. Las membranas se incubaron a continuación con anti-GLUT-4 policlonal de conejo purificado a una concentración de 2 µg/ml. Se añadió anticuerpo secundario anti-IgG de conejo AI:1000 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma) para la detección y se desarrollaron usando sustrato quimioluminescente ECL™ de acuerdo con el método recomendado del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech). La emisión de luz se detectó usando película autorradiográfica (Kodak) en una cámara compacta X2 (x-ograph Ltd).

20

25

30

35

Usando el software Image-J, las imágenes de transferencia de Western (archivos jpeg) se convierten a 8-bit para cambiar a escala de grises. El fondo se sustrae usando un radio de esfera rodante de 50. La imagen se invierte y usando la herramienta de selección con manos libres se traza una línea alrededor de la banda. La medición se da como intensidad de píxeles dentro de la banda. Los datos se transfieren a Microsoft Excel y se comparan formalmente mediante la prueba de las Medianas usando el complemento Analyse-it para Excel. El gráfico de caja y bigotes se generó usando el software SPSS de IBM versión 16.0. Los resultados de las imágenes de transferencia de Western se presentan, por lo tanto, como la figura 5 en un gráfico de caja y bigotes.

Resultados

Todo el suero de voluntarios sanos se consideró negativo tanto para cTnI como para IMA, dado que todos los valores estuvieron por debajo del límite superior de lo normal indicado por el fabricante. Las muestras de suero se inmunotransfirieron en busca de la presencia de GLUT-4. Después de exposición autorradiográfica durante dos minutos, no fueron detectables bandas correspondientes al peso molecular de GLUT-4 (figura 1). A exposición de 5 minutos, algunos sujetos sanos (carriles 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12 demostraron bandas débiles (figura 2) correspondientes a aproximadamente 50 KDa. En contraste, se demostraron bandas más pesadas (figura 3) en todos los sujetos con un diagnóstico final de STEMI. Todos los pacientes de STEMI fueron positivos para cTnI (intervalo 0,52-22,52 µg/l) e IMA (98-151 KU/l) respectivamente. Un perfil cinético de GLUT-4 se determinó muestreando secuencialmente un paciente de STEMI a intervalos de tiempo regulares desde la admisión hasta 200 h después de la admisión (figura 4). Estos datos demuestran un cambio de la intensidad de banda y, por lo tanto, un cambio de la concentración de GLUT-4 durante la evolución temporal del muestreo.

40

45

50

Discusión

Muestras de suero de voluntarios sanos han mostrado la presencia de una baja concentración circulante de fondo de GLUT-4. En pacientes que se presentan en la sala de urgencias con dolor torácico y se les diagnosticó posteriormente infarto de miocardio con segmento ST, las concentraciones de GLUT-4 observadas en el suero son significativamente superiores. Un perfil cinético se ha demostrado en un paciente a lo largo del tiempo que muestra la fluctuación de la concentración de GLUT-4 en suero.

55

60

Ejemplo 2 - Grupos de muestra de pacientes clínicos y de control mediante ELISA

a) Poblaciones de control

a-i) Individuos aparentemente sanos sin un trastorno cardíaco agudo.

65

El grupo de control servirá para determinar la concentración de fondo del marcador en la población general sin un trastorno cardíaco conocido. Se obtuvo suero de sujetos >45 años de edad, seleccionados aleatoriamente entre las listas de centros de salud de siete centros de salud comunitarios locales representativos: se invitó a 1.392 sujetos de la población general a participar. Los detalles de los sujetos se recopilaron mediante un cuestionario. Se realizaron medición de la frecuencia cardíaca y tensión arterial (la media de dos lecturas), espirometría, electrocardiografía (ECG) y ecocardiografía. La fracción de expulsión ventricular izquierda (LVEF) se calculó cuantitativamente usando el método biplano apical de Simpson tomando la media de tres lecturas. Se definió disfunción sistólica ventricular izquierda (LVSD) límite o peor como LVEF <50 %. La masa del LV se calculó usando la ecuación de la American Society of Echocardiography modificada por Devereux, con hipertrofia ventricular izquierda (LVH) definida como indica de masa LV >134 g/m² para hombres y >110 g/m² para mujeres. Los sujetos normales se definieron como todos los sujetos de la población general que acudieron sin antecedentes de enfermedad vascular, diabetes mellitus, hipertensión, o ingesta abundante de alcohol y que no recibían ningún medicamento cardíaco; cuya tensión arterial era <160/90 mmHg como media de dos lecturas; cuya glucemia en ayunas era <6 mmol/l, cuyo aclaramiento de creatinina estimado (calculado mediante la modificación de la dieta de la ecuación de nefropatía corregida para un método de creatinina de referencia) fue >60 ml/min/1,73 m²; y que no tenían ninguna cardiopatía valvular significativa, LVH, DHF, LVEF <50 % o anomalías en el movimiento de las paredes regionales en ecocardiografía.

Esta población es un grupo de sujetos muy bien caracterizado seleccionados para parámetros bioquímicos y fisiológicos para excluir cualesquiera signos manifiestos de un trastorno cardíaco. Es muy raro obtener dicha población seleccionada especialmente con datos ecocardiográficos de apoyo que muestran normalización de la función cardíaca.

a-ii) Pacientes diabéticos sin trastorno cardíaco agudo.

La ubicación celular del marcador cardíaco se modifica mediante la acción de la insulina. La diabetes es un factor de riesgo para el desarrollo de cardiopatías. Esta población servirá como un grupo de control específico para investigar cualquier correlación entre diabetes y/o edad con la expresión del marcador. Cincuenta pacientes diabéticos conocidos con tipo I (diabetes mellitus dependiente de insulina, NIDDM) o tipo II (diabetes mellitus no dependiente de insulina, IDDM).

La incidencia de concentraciones positivas de troponina cardíaca fuera del ámbito del infarto de miocardio agudo (AMI) se está entendiendo ahora. La troponina es un marcador de lesiones celulares cardíacas no AMI que sigue siendo un diagnóstico clínico. Con ensayos sensibles, ahora se pueden detectar concentraciones de cTn en sujetos considerados previamente normales con ensayos de cTn menos sensibles. Los diabéticos corren un riesgo particular de enfermedad cardiovascular y el posterior desarrollo de AMI. La insulina puede modular la translocación de GLUT 4 a la membrana de la superficie celular de modo que, por lo tanto, los pacientes diabéticos de tipo II tratados con insulina son un grupo de pacientes importante para monitorizar el GLUT4.

b) Grupos clínicos

b-i) Pacientes de infarto de miocardio agudo (AMI).

La población de pacientes a ensayar cubrirá diversos grupos de edad con información sobre antecedentes clínicos. Se ensayarán al menos 30 pacientes. Se propone ensayar el biomarcador de una serie de muestras tomadas durante un periodo de tiempo.

b-ii) Pacientes con angina estable que tienen isquemia cardíaca en curso. La gravedad de la lesión cardíaca es menor que un síndrome coronario agudo.

b-iii) Sujetos que inicialmente se presentan con dolor torácico que no demuestran una liberación significativa de troponina cardíaca que a continuación se convierten mientras están en la sala de urgencias en positivos para troponina cardíaca. Esta población se ve raras veces.

Análisis de muestras:

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando placas de Usco Life Science Inc., Wuhan, China.

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 - Glut4

ES 2 609 632 T3

1	MPSGFQQIGS	EDGEPPQQRV	TGTLVLAVFS	AVLGSLQFGY	NIGVINAPQK	VIEQSYNETW
61	LGRQGPEGPS	SIPPGTLTTL	WALSVAIFSV	GGMISSFLIG	IISQWLGRKR	AMLVNNVLAV
121	LGGSLMGLAN	AAASYEMLIL	GRFLIGAYSG	LTSGLVPMYV	GEIAPTHLRG	ALGTLNQLAI
181	VIGILIAQVL	GLESLLG TAS	LWPLLLGLTV	LPALLQLVLL	PFCPESPRYL	YIIQNLEGPA
241	RKSLKRLTGW	ADVSGVLAEL	KDEKRKLERE	RPLSLLQLLG	SRTHRQPLII	AVVLQLSQQL
301	SGINAVFYYS	TSIFETAGVG	QPAYATIGAG	VVNTVFTLVS	VLLVERAGR	TLHLLGLAGM
361	CGAILMTVA	LLLLERPAM	SYVSIVAIFG	FVAFFEIGPG	PIPWFIWAEL	FSQGPRPAAM
421	AVAGFSNWTS	NFIIGMGFQY	VAEAMGPYVF	LLFAVLLLGF	FIFTFLRVPE	TRGRTFDQIS
481	AAFHRTPSLL	EQEVKPSTEL	EYLGPDEND			

Referencias

- 5 Davies MJ, Thomas AC, Knapman PA, Hangartner JR. *Circulation* 1986; 73: 418-427.
Falk E: *Circulation* 1985; 71: 699-708
Thygesen K, et al., *Circulation*. 2007, 116: 2634-53.
Gaze DC, *J Med Biochem* 2010, 29(4): 1-5
Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyn E, et al. *N Engl J Med* 2009; 361: 868-77.
- 10 Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, et al. *N Engl J Med* 2009; 361: 858-67.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de diagnóstico de un trastorno cardiaco agudo, **caracterizado por** lesiones celulares de tejido cardiaco en un paciente, que comprende detectar el nivel de Glut4 en una muestra del paciente y comparar dicho nivel con un nivel de control, en el que un nivel que es mayor que dicho nivel de control es indicativo del trastorno, y en el que la muestra del paciente es una muestra de sangre.
- 10 2. Un método para evaluar la eficacia de un tratamiento para un trastorno cardiaco agudo, **caracterizado por** lesiones celulares de tejido cardiaco, que comprende detectar el nivel de Glut4 en una muestra del paciente antes, durante y/o después del tratamiento y comparar dicho nivel con un nivel de control, en el que la muestra del paciente es una muestra de sangre.
- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el trastorno cardiaco agudo se selecciona entre el grupo que consiste en hipertensión, angina, isquemia, infarto de miocardio, enfermedad cardiorrenal y lesión por reperfusión.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel del Glut4 se determina poniendo en contacto una muestra del paciente con un reactivo de detección que se une específicamente al Glut4.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el reactivo de detección es un anticuerpo, por ejemplo en el que el anticuerpo está marcado.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección se lleva a cabo usando un ELISA, RIA o un ensayo de inmunofluorescencia.

Figura 1

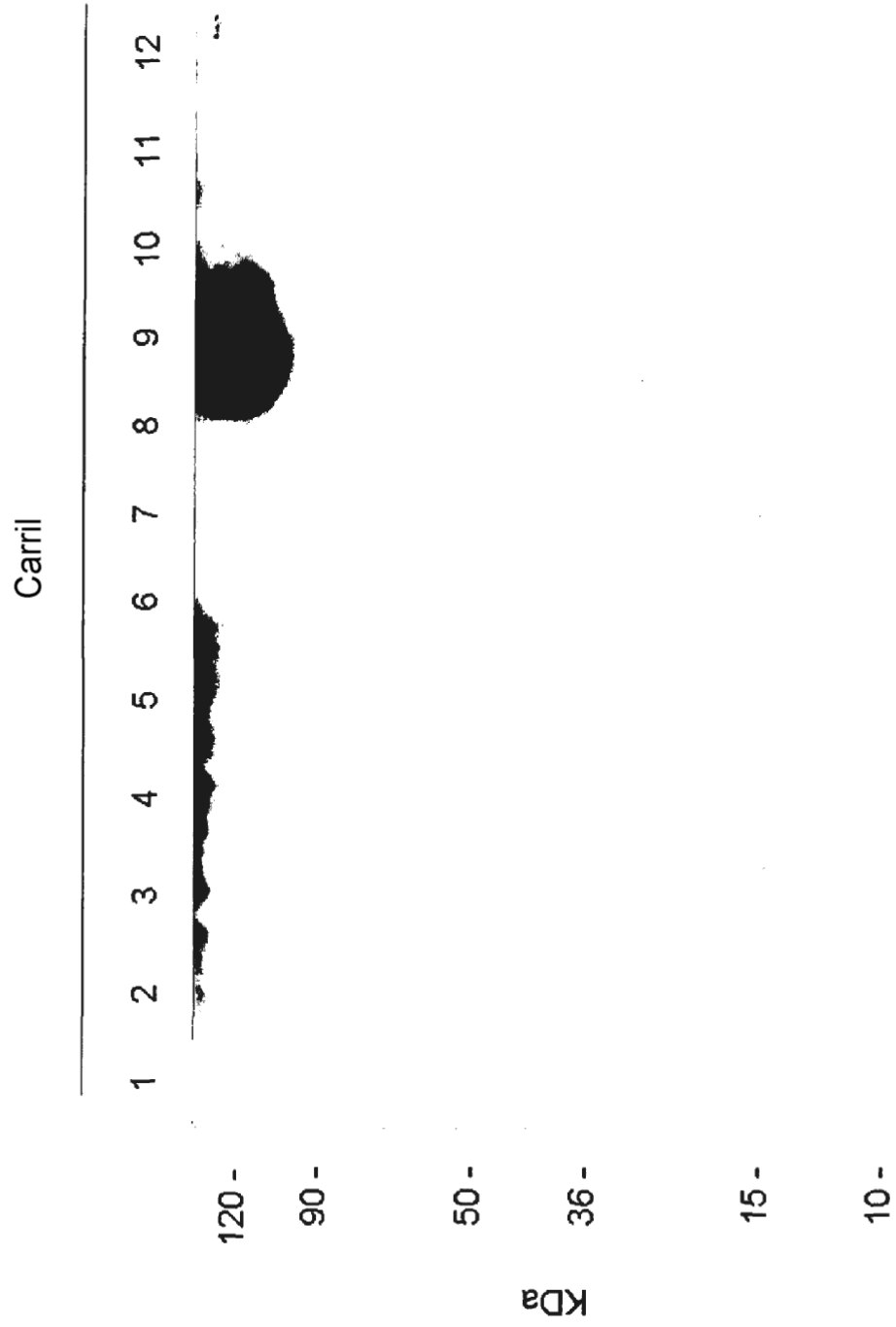


Figura 2

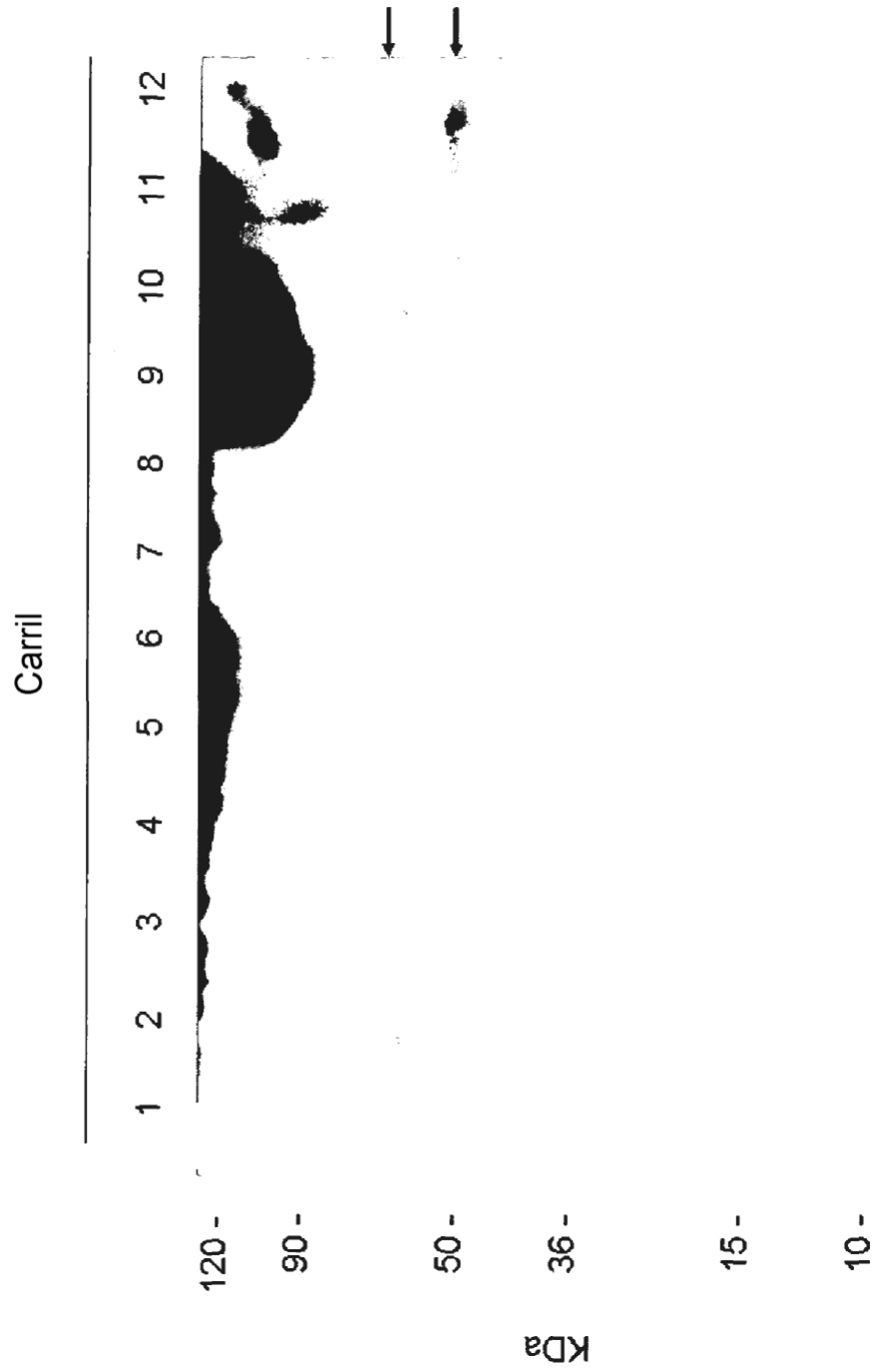


Figura 3

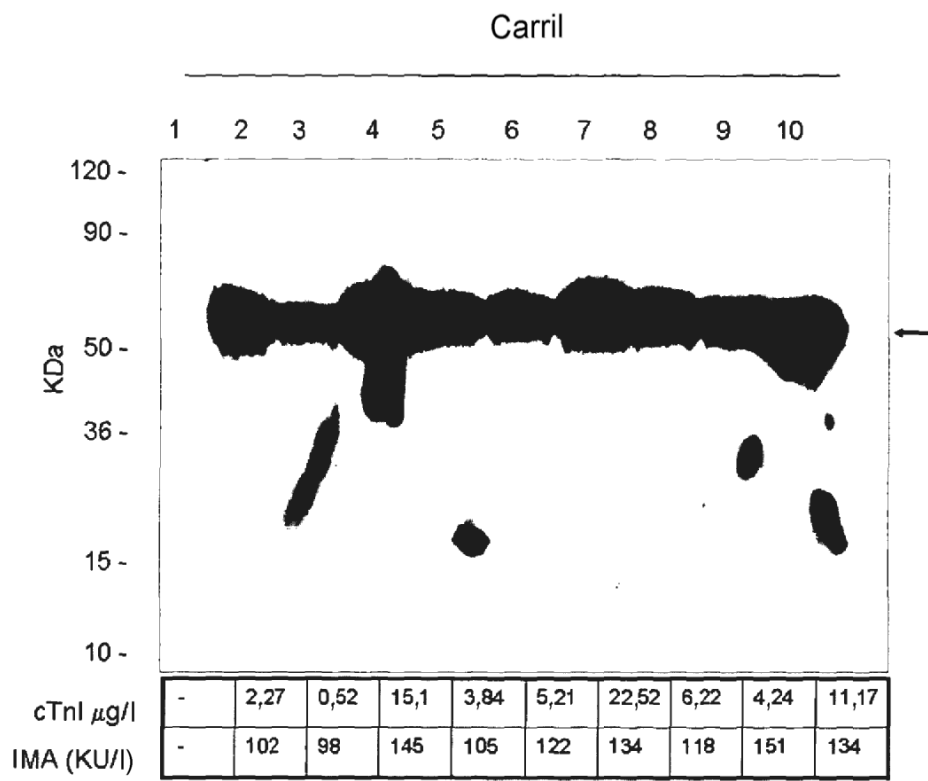


Figura 4

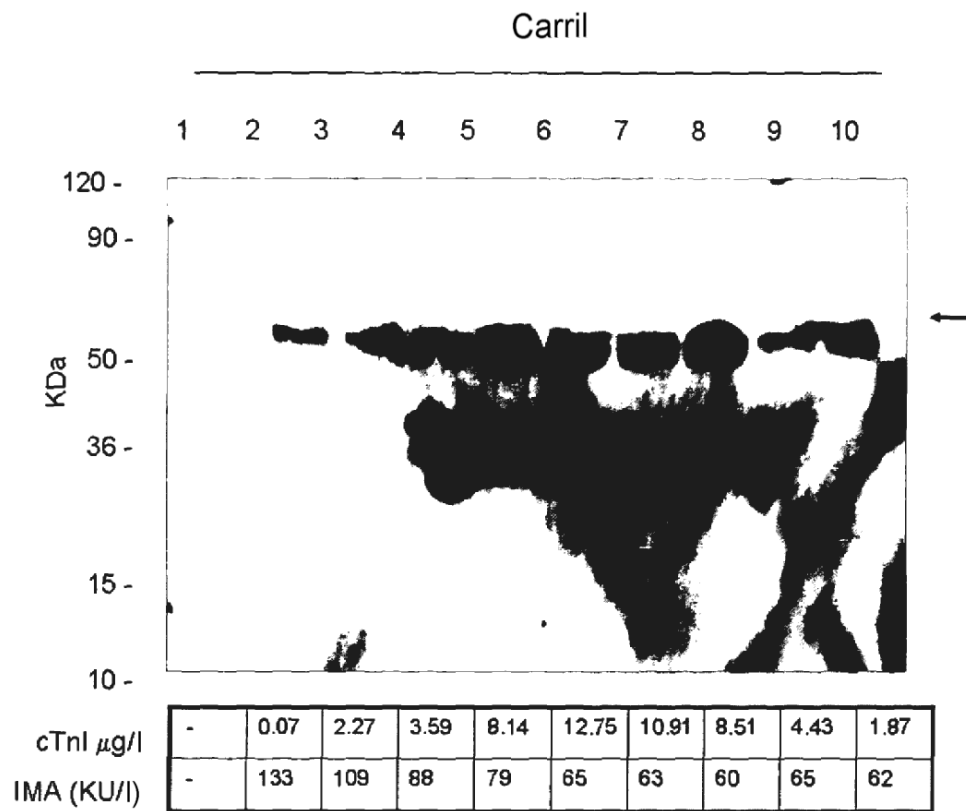


Figura 5

