

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 879**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2013 PCT/EP2013/078062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102333**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2013 E 13818754 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2939028**

54 Título: **Uso de sCD14, sus fragmentos o sus derivados para la estratificación, diagnóstico y pronóstico del riesgo**

30 Prioridad:

**28.12.2012 EP 12199701**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.07.2017**

73 Titular/es:

**LSI MEDIENCE CORPORATION (100.0%)  
13-4, Uchikanda 1-chome Chiyoda-ku  
Tokyo 101-8517, JP**

72 Inventor/es:

**SPANUTH, EBERHARD**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 623 879 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 sCD14, sus fragmentos o sus derivados para la estratificación, diagnóstico y pronóstico del riesgo

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de los medios para evaluar un diagnóstico o un pronóstico con respecto a enfermedades o afecciones cardiovasculares o aterosclerosis y a procedimientos para evaluar el riesgo cardiovascular o aterosclerótico de un sujeto.

10 Más específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos novedosos para diagnosticar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis. Se proporciona sCD14-ST como un marcador novedoso para el diagnóstico de enfermedades o afecciones cardiovasculares o aterosclerosis. La presente invención comprende además un procedimiento para la evaluación del riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular futura o una aterosclerosis. Además, se proporcionan procedimientos para el diagnóstico de un episodio cardíaco agudo en sujetos que muestran signos de una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis. Preferentemente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención permite identificar si un sujeto debe ser ingresado en el hospital o en una unidad de cuidados intensivos o si el sujeto puede ser dado de alta. Los procedimientos de la presente invención pueden emplearse adicionalmente para discriminar entre diversas enfermedades o afecciones cardiovasculares. También se abarcan en la presente invención kits para llevar a cabo los procedimientos mencionados anteriormente.

**Antecedentes de la invención**

20 Cuando un sujeto se presenta ante un servicio de urgencias con algún tipo de molestia, es obligatorio un diagnóstico rápido del estado patológico del sujeto para identificar la causa subyacente a su malestar y evitar consecuencias en la salud del sujeto. Un tema muy relevante es la decisión de si el paciente será ingresado en el hospital - para un análisis adicional y prolongado y/o un tratamiento de cuidados intensivos - o si el paciente puede recibir el alta y regresar a su domicilio.

25 Por ejemplo, en el caso de episodios cardiovasculares agudos, debe tomarse una decisión para un determinado régimen de tratamiento, generalmente, en un corto periodo de tiempo. Las enfermedades cardiovasculares, en particular las enfermedades cardíacas, son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el hemisferio occidental. Las enfermedades cardiovasculares pueden permanecer asintomáticas durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, pueden tener consecuencias graves cuando aparece un episodio cardiovascular agudo, como infarto de miocardio (IM) o insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA). Por lo tanto, existen directrices para el diagnóstico rápido de pacientes que se presentan ante un médico, generalmente en una sala de emergencias, y que se sospecha que padecen un síndrome coronario agudo (SCA) (es decir, angina de pecho inestable (API) o infarto de miocardio (IM) o insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA), véase J.Am.Coll.Cardiol. 2000; 36, páginas 959-969). En un sujeto con sospecha de tener IM, se registra un electrocardiograma y se determina el nivel de troponina T o troponina I (cTnI). Además, se analiza si el sujeto sospechoso muestra síndromes evidentes como dolor torácico, disnea, palpitaciones, náuseas, vómitos y otros síndromes conocidos por el experto en la técnica. Si el sujeto es positivo en 2 de los 3 criterios, entonces es ingresado en el hospital para un examen adicional. En un sujeto con sospecha de tener ICDA, se recomienda la determinación de la concentración plasmática de BNP o NT-proBNP en pacientes que están siendo evaluados por disnea que tienen signos o síntomas compatibles con insuficiencia cardíaca, véase J Card Fail 2010; 16 (6): páginas e134-155.

40 Sin embargo, la composición de los sujetos que se presentan en una sala de emergencias es heterogénea, comprendiendo aproximadamente un 50 % de sujetos que sufren de enfermedades o afecciones cardiovasculares (incluyendo afecciones tató agudas, es decir, isquémicas como no isquémicas), un 10 % de sujetos que padecen de complicaciones pulmonares y un 40 % de sujetos que padecen otras complicaciones, por ejemplo, tumores y que pueden padecer adicionalmente enfermedades o afecciones cardiovasculares. Las técnicas de diagnóstico convencionales, específicamente para situaciones de emergencia, por lo general no permiten un diagnóstico fiable y/o una evaluación del riesgo que incluya estos diversos estados patológicos. Otros inconvenientes son la falta de personal suficiente para llevar a cabo sofisticadas técnicas y ensayos de diagnóstico y la ocupación variable en salas de emergencia.

50 Actualmente, no existe un procedimiento de diagnóstico estandarizado que incluya las diversas enfermedades y afecciones cardiovasculares que un médico puede encontrar en un servicio de urgencias. Por lo tanto, no puede realizarse un diagnóstico rápido y preciso de las enfermedades y afecciones cardiovasculares en el servicio de urgencias con suficiente precisión, que permitan tomar una decisión de si el sujeto puede ser dado de alta (descartado) o tiene que ser ingresado en el hospital (aceptado) para un examen adicional o un tratamiento de cuidados intensivos (que pueda salvarle la vida). Como consecuencia de ello, muchos pacientes serán erróneamente ingresados o erróneamente dados de alta.

55 En algunos casos, los denominados marcadores moleculares permiten establecer un diagnóstico rápido y suficientemente preciso del estado patológico de un sujeto. Un ejemplo destacado es cTn para el diagnóstico de IM agudo, como se ha mencionado anteriormente, o péptidos natriuréticos, en particular BNP y NT-proBNP para diversas

enfermedades cardíacas no isquémicas, por ejemplo, insuficiencia cardíaca. Los niveles sanguíneos de cTn son marcadores sensibles y específicos de necrosis miocárdica que se usan rutinariamente para el diagnóstico de IM agudo. Con respecto a la determinación de cTn, como ejemplo de un marcador isquémico, se hace referencia a Katus y col. (Mol Cell Cardiol 1989; 21:1349-53), Hamm y col. (NEJM 1992; 327: 146-50), Ohmann y col. (NEJM 1996; 335: 1333-34), Christenson y col. (ClinChem 1998; 44: 494-501), y al documento EP-A-0 394 819. Aunque se han introducido nuevas generaciones de ensayos de cTn de alta sensibilidad, existe todavía una falta de sensibilidad diagnóstica y de especificidad en el diagnóstico de infarto de miocardio, especialmente en pacientes sintomáticos que se presentan en la sala de emergencias, véase Apple y Christenson (Clin Chem 2012; 58: 54-61); y Thygesen y col. (JACC 2012, 60(16): 1581-98).

Un estudio afirmó que existe una correlación entre los niveles de sCD14 y el riesgo cardiovascular en adultos mayores (Reiner AP y col.: Soluble CD14: Genomewide Association Analysis and Relationship to Cardiovascular Risk and Mortality in Older Adults. Arterioscler Thromb Vasc Biol; publicado en línea el 15 de noviembre de 2012). Sin embargo, otro estudio realizado en hombres de mediana edad, indica que no existe correlación entre sCD14 y sujetos con enfermedad cardíaca coronaria (Morange PE y col.: TLR4/Asp299Gly, CD14/C-260T, plasma levels of the soluble receptor CD14 and the risk of coronary heart disease: The PRIME Study. Eur J Hum Genet. 2004; 12:1041-1049).

Por lo tanto, existe una necesidad de medidas de diagnóstico o pronóstico, que permitan una evaluación y/o estratificación del riesgo individual especialmente para un sujeto que se presenta poco después del inicio de los síntomas, en el servicio de urgencias. Las medidas deben permitir esta estratificación de la evaluación/riesgo también en sujetos que no han sido previamente diagnosticados con enfermedades o afecciones cardiovasculares, en particular sin enfermedades cardiovasculares agudas.

El problema técnico subyacente a la presente invención puede ser visto como la provisión de medios y procedimientos para cumplir con las necesidades mencionadas anteriormente.

El problema técnico se resuelve por las realizaciones descritas en las reivindicaciones y más adelante en el presente documento.

## 25 **Sumario de la invención**

La presente invención se desvela en las reivindicaciones.

### **Breve descripción de los dibujos**

- Fig. 1: concentración plasmática de sCD14-ST en el grupo de control sano y en diferentes grupos de sujetos;
- Fig. 2: Análisis de ROC para la discriminación entre el grupo de control sano y el sujeto con ICC;
- 30 Fig. 3: concentraciones plasmáticas de sCD14-ST del grupo de control sano y sujetos con angina de pecho inestable (API) al ingreso en la sala de urgencias en comparación con las concentraciones de troponina cardíaca I (cTnl);
- Fig. 4: comparación de las curvas de ROC de sCD14-ST (panel superior) y troponina cardíaca I (Tnlc; panel inferior) para la discriminación de sujetos con angina de pecho inestable (API) y el grupo control sano;
- 35 Fig. 5: valores de sCD14-ST y troponina cardíaca I (Tnlc) del grupo de control sano y sujetos con infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (IMSEST) al ingreso en la sala de emergencias;
- Fig. 6: análisis de ROC para la validez de diagnóstico de sCD14-ST para detectar infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (IMSEST) al ingreso en la sala de emergencias: comparación de las curvas de ABC entre el grupo de control sano y los pacientes que se presentan en la sala de emergencias con
- 40 IMSEST; umbral: sCD14-ST = 276 pg/ml; Tnlc = 0,012 ng/ml;
- Fig. 7: comparación de diagramas de puntos interactivos de sCD14-ST (panel inferior) y PATHFAST Tnlc (panel superior) para el diagnóstico de infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (IMSEST);
- Fig. 8: análisis de ROC para la validez del diagnóstico de sCD14-ST para la detección de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD) en sujetos que se presentan en la sala de urgencias con disnea aguda; ABC = 1,000 (IC del 95 %: 0,976-1,000); SENS = 100 %, ESPEC = 100 %; umbral = 311 pg/ml;
- 45 Fig. 9: curva de ROC de sCD14-ST para la discriminación entre insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD) e insuficiencia cardíaca crónica (ICC); ABC = 0,993 (IC del 95 %: 0,951-1,000); SENS = 98,3 %, ESPEC = 95 %; umbral = 354 pg/ml;
- Fig. 10: comparación de sCD14-ST para la discriminación entre el grupo control sano en comparación con insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD; umbral 311 pg/ml) e insuficiencia cardíaca crónica (ICC) en comparación con ICAD (umbral 354 pg/ml);
- 50 Fig. 11: valores de sCD14-ST en supervivientes y no supervivientes en comparación con NT-proBNP;
- Fig. 12: curva de ROC de sCD14-ST para la predicción del riesgo de mortalidad;
- Fig. 13: comparación de las curvas de ROC para la predicción del riesgo de mortalidad.
- 55 Fig. 14: valores de sCD14-ST en supervivientes y no supervivientes en comparación con NT-proBNP.
- Fig. 15: curva de ROC de sCD14-ST para la predicción del riesgo de mortalidad después de cirugía cardíaca electiva
- Fig. 16: comparación de las curvas de ROC para la predicción del riesgo de mortalidad después de cirugía cardíaca electiva.

- Fig.17: sCD14-ST en angina de pecho inestable (API) y pacientes con dolor torácico no cardíaco.  
 Fig.18: curva de ROC de sCD14-ST para la discriminación entre dolor torácico cardíaco y no cardíaco.  
 Fig.19: comparación de las curvas ROC para la predicción de la mortalidad por niveles de sCD14-ST y sCD14 en el grupo de estudio total (A) y (B) con insuficiencia cardíaca aguda (ICA).  
 5 Fig. 20: comparación de procedimientos de sCD14-ST y sCD14 en la enfermedad cardíaca: un análisis de regresión de Bablok-Passing, muestra la correlación suficiente para sCD14 y sCD14-ST (predicción de mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda, ICA).  
 Fig. 21: Combinación de sCD14-ST con marcadores adicionales: curvas de ROC para la discriminación entre supervivientes y no supervivientes

10 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se describe ahora con más detalle mediante realizaciones y ejemplos preferentes, que sin embargo se presentan solamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse de modo alguno como limitantes del ámbito de la presente invención.

15 La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que sCD14-ST se eleva en sujetos que tienen una enfermedad o afección cardiovascular o una aterosclerosis, así como en sujetos que están libres de cualquier signo clínico de enfermedad cardiovascular o aterosclerosis pero que tienen un riesgo elevado de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis.

20 sCD14-ST se ha usado previamente como marcador para aplicaciones totalmente inconexas con el campo de las enfermedades o afecciones cardiovasculares o la aterosclerosis. Para la septicemia, se han puesto a disposición técnicas diagnósticas, aplicables tanto a un laboratorio estándar, como a una situación denominada de punto de asistencia, que se pueden evaluar fácilmente, empleando sistemas basados en la medición de sCD14-ST (documento EP 1 746 104 A1). Se ha propuesto sCD14-ST para evaluar la función fagocitaria (documento EP 2 280 279 A1).

25 Recientemente, se ha descubierto de manera sorprendente que la determinación de sCD14-ST y su comparación con una cantidad de referencia respectiva de dicho compuesto, tiene una capacidad de diagnóstico excelente con respecto a enfermedades o afecciones cardiovasculares o aterosclerosis. Además, se ha descubierto que dicho compuesto se puede usar para predecir enfermedades o afecciones cardiovasculares o aterosclerosis en un sujeto, en el que el sujeto puede ser un sujeto previamente diagnosticado con una enfermedad o afección cardiovascular o un sujeto libre de signos clínicos de enfermedad cardiovascular o aterosclerosis. Además, la determinación de los niveles de dicho compuesto en un sujeto permite discriminar entre enfermedades o afecciones cardiovasculares específicas o aterosclerosis.  
 30

En particular, el procedimiento de acuerdo con la invención proporciona un medio para el diagnóstico de una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis basado en la determinación de la cantidad de sCD14-ST en un sujeto. Además, el procedimiento de acuerdo con la invención permite evaluar el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis, así como evaluar el riesgo global de mortalidad de un sujeto.  
 35 En una realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la invención proporciona también un medio para discriminar entre enfermedades o afecciones cardiovasculares específicas o aterosclerosis en un sujeto. Como alternativa, el procedimiento permite evaluar si un sujeto con una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis se beneficiará del tratamiento con una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en antibióticos, probióticos y lactulosa. El procedimiento también se puede emplear para determinar si un sujeto necesita ser hospitalizado basándose en la cantidad de sCD14-ST presente en una muestra de dicho sujeto.  
 40

En una realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende las etapas de

- a) determinar la cantidad de sCD14-ST en una muestra de un sujeto,
- b) comparar la cantidad de dicho compuesto determinado en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia y
- c) elaborar el diagnóstico o la evaluación de riesgo/beneficio basándose en el resultado obtenido en la etapa b).

45 Específicamente, el diagnóstico o la evaluación como se ha descrito anteriormente es independiente de cualquier otro signo o síntoma clínico.

Se ha encontrado ventajosamente que la determinación de la cantidad de sCD14-ST en un sujeto es suficiente y proporciona beneficios significativos para diagnosticar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis y/o para evaluar el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis. Con respecto a los procedimientos de la técnica anterior (en particular la medición de troponina cardíaca, cTn), el procedimiento de acuerdo con la invención tiene la ventaja de que no es necesaria una segunda medición o más (por ejemplo, para determinar la elevación y la caída o cualquier otra cinética de un marcador), permitiendo de este modo diagnósticos y/o evaluaciones más eficaces.  
 50

Además, la capacidad de diagnóstico y pronóstico del procedimiento de acuerdo con la invención es superior en comparación con el estado de la técnica. Se ha encontrado sorprendentemente que el procedimiento de acuerdo con la invención proporciona resultados que se caracterizan por una sensibilidad y/o especificidad excelentes.  
 55

En una realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende la determinación simultánea de un marcador adicional, seleccionado de un marcador neurohormonal, un marcador, que es un regulador del equilibrio hídrico, un marcador cardíaco isquémico, un marcador de la superfamilia de citocinas del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , y/o un marcador inflamatorio en combinación con sCD14-ST, tras lo cual se comparan las cantidades determinadas con cantidades de referencia de los marcadores determinados, respectivamente. De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado además sorprendentemente que, cuando un marcador adicional, seleccionado de un marcador neurohormonal, un marcador, que es un regulador del equilibrio hídrico, un marcador cardíaco isquémico, un marcador de la superfamilia de citocinas del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , la familia de receptores de la interleucina, por ejemplo, el receptor 1 similar a la interleucina 1, también conocida como IL1RL1 y ST2, o la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y/o un marcador inflamatorio, se determina en combinación con sCD14-ST en la misma muestra o una diferente del sujeto, y se logra una precisión aún mayor para diagnosticar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis en un sujeto, para identificar si un sujeto está en riesgo elevado de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis o para identificar si un sujeto debe ser ingresado en el hospital o para predecir el riesgo de mortalidad de un sujeto. Nuevamente, dicho valor predictivo notablemente alto se alcanza independientemente de y sin importar otros diagnósticos o patologías conocidas del sujeto, incluso con sujetos que no tienen ningún signo clínico o síntoma aparente de una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis.

En determinadas realizaciones, dicho al menos un marcador adicional puede seleccionarse preferiblemente entre un marcador neurohormonal (por ejemplo pro PCB-NT), un marcador cardíaco isquémico (por ejemplo, hsTnT), un marcador inflamatorio (por ejemplo, proteína C-reactiva, CRP) y un marcador de la familia de receptores de la interleucina-1 (por ejemplo IL1RL1/ST2). En dichas realizaciones, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección en el sentido de la presente invención, es decir, una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis. Puede ser o incluir, por ejemplo, insuficiencia cardíaca aguda. Por ejemplo, la enfermedad o afección también puede seleccionarse del grupo que consiste en síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica, cardiopatía isquémica, angina de pecho, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico, y/o accidentes isquémicos transitorios.

La expresión "regulador del equilibrio hídrico" tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia, que actúa sobre mecanismos de control homeostáticos en un sujeto con el fin de regular y mantener un equilibrio entre la captación y salida de fluidos.

El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y, más preferentemente, seres humanos.

En una realización preferente de la presente invención, un sujeto puede no manifestar síntoma alguno de una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis. En particular, el sujeto puede no padecer un episodio cardiovascular agudo tal como lo define la American College of Cardiology, por ejemplo, malestar torácico, disnea, cambios en el ECG y otros, tal como se describió anteriormente. Más preferentemente, el sujeto puede no manifestar uno o más episodios de angina que duren al menos 5 min. dentro de las 24 h anteriores y no tener un valor positivo de cTn cuando se usen ensayos convencionales o una depresión del segmento ST transitoria o permanente de al menos 0-5 mm que no se conozca como preexistente y que no sea atribuible a trastornos coexistentes. Como alternativa, el sujeto puede no manifestar síntomas de isquemia fuesen en aumento o se produjeran en reposo, o que justificasen la sospecha de infarto agudo de miocardio, produciéndose el último episodio dentro de las 48 horas anteriores. La isquemia miocárdica tiene que ser verificada por electrocardiografía (depresión de ST = 0-1 mV o inversión de la onda T= 0-1 mV) o por marcadores bioquímicos elevados (creatinina cinasa [CK] -MB > 6 ug/l, troponina T de alta sensibilidad > 13 pg/ml, positivo en el ensayo cualitativo de cTn, o actividad catalítica de CK, CK-B o CK MB superior al límite diagnóstico local para el infarto de miocardio).

Una "enfermedad o afección cardiovascular" en el sentido de la presente invención puede ser cualquier situación fisiológica en un sujeto, que sea reconocida por el experto como un estado anormal del sujeto, que se caracteriza por o esta ligada a fenómenos que implican alteraciones del sistema cardiovascular. Las enfermedades o afecciones cardiovasculares son, por ejemplo, síndrome coronario agudo (SCA), insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica, cardiopatía isquémica, angina de pecho, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico y accidentes isquémicos transitorios. Los pacientes con SCA pueden mostrar angina de pecho inestable (API) o infarto de miocardio (IM). El IM puede ser un IM con elevación del segmento ST (IMEST) o un IM sin elevación del segmento ST (IMSEST). La aparición de una SCA puede estar seguida por una disfunción ventricular izquierda (DVI) o el desarrollo de insuficiencia cardíaca. Otras enfermedades o afecciones cardiovasculares preferentes abarcan bradi- o taquiarritmias cardíacas, incluyendo muerte cardíaca súbita y accidente cerebrovascular (episodios o accidentes cerebrovasculares). Más preferentemente, dicha complicación cardiovascular es SCA e ICAD.

En una realización preferente, el procedimiento se utiliza para proporcionar un diagnóstico de "admisión" o de "descarte", respectivamente. En el sentido de la invención, "admisión" se refiere a un diagnóstico, que permite determinar positivamente la presencia de una determinada enfermedad o afección en un sujeto. El término "descarte", por su parte, se refiere a un diagnóstico, que es capaz de excluir una determinada enfermedad o afección. Tal como se usa en el presente documento, el término "admisión" también puede referirse a una situación que requiere el ingreso

en un hospital, mientras que "descate" puede referirse a una situación, que permite el alta del sujeto.

La invención también proporciona el uso de un sCD14-ST como marcador para diferenciar entre dolor torácico cardíaco y no cardíaco. En algunas realizaciones, la invención, por tanto, también proporciona procedimientos para diferenciar entre dolor torácico cardíaco y no cardíaco en un sujeto que presenta dolor torácico.

5 El dolor torácico puede, por ejemplo, ser identificado como dolor torácico cardíaco cuando la cantidad de sCD14-ST es de, por ejemplo, 200 pg/ml o mayor, 210 pg/ml o mayor, 220 pg/ml o mayor, 230 pg/ml o mayor, 240 pg/ml o mayor, 250 pg/ml o mayor, 255 pg/ml o mayor, 300 pg/ml o mayor, o 380 pg/ml o mayor. Preferentemente, la cantidad de sCD14-ST es de 220 pg/ml o mayor o 255 pg/ml o mayor.

10 El dolor torácico puede, por ejemplo, ser identificado como dolor torácico no cardíaco cuando la cantidad de sCD14-ST no excede de, por ejemplo, 200 pg/ml, 210 pg/ml, 220 pg/ml, 230 pg/ml, 240 pg/ml, 250 pg/ml, 255 pg/ml, 300 pg/ml, o 380 pg/ml. Preferentemente, la cantidad de sCD14-ST no excede de 220 pg/ml o 255 pg/ml.

Ventajosamente, la diferenciación entre dolor torácico cardíaco y no cardíaco se realiza cuando el sujeto presenta por primera vez dolor torácico, por ejemplo en la etapa de ingreso (por ejemplo, en una sala de emergencias). Preferentemente, la troponina es inicialmente negativa.

15 En algunas realizaciones, un sujeto se somete a cirugía cardíaca, por ejemplo, cirugía cardíaca electiva o cirugía cardíaca de emergencia. La invención proporciona, por ejemplo, procedimientos para evaluar o predecir el riesgo de mortalidad en un sujeto después de someterse a cirugía cardíaca (por ejemplo, cirugía cardíaca electiva o cirugía cardíaca de emergencia). La invención proporciona, por ejemplo, procedimientos para identificar un sujeto que tiene un riesgo elevado de mortalidad después de una cirugía cardíaca (por ejemplo, cirugía cardíaca electiva o cirugía cardíaca de emergencia). La invención proporciona así el uso sCD14-ST como marcador para evaluar o predecir el riesgo de mortalidad en un sujeto después de una cirugía cardíaca (por ejemplo, cirugía cardíaca electiva o cirugía cardíaca de emergencia).

20

25 Cuando un sujeto se somete a cirugía cardíaca, el procedimiento puede llevarse a cabo, por ejemplo, en el pre-, peri- o pos-operatorio. El procedimiento se puede realizar dentro a los 1, 2, 3, 4 o 5 días de la cirugía, por ejemplo, en el primer día del pos operatorio.

30 Cuando un sujeto se somete a cirugía cardíaca, se puede determinar que existe un riesgo elevado de mortalidad, por ejemplo, cuando la cantidad de un compuesto seleccionado de sCD14-ST es, por ejemplo, 300 pg/ml o mayor, por ejemplo, 325 pg/ml o mayor, por ejemplo, 350 pg/ml o mayor, 371 pg/ml o mayor, 375 pg/ml o mayor, 400 pg/ml o mayor, 500 pg/ml o mayor, 600 pg/ml o mayor, 800 pg/ml o mayor, 1000 pg/ml o mayor, 1300 pg/ml o mayor, 1600 pg/ml o mayor, o 1900 pg/ml o mayor.

35 El término "muestra" se refiere a una muestra de un fluido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o un órgano. Pueden obtenerse muestras de fluidos corporales mediante técnicas bien conocidas e incluyen, preferentemente, muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferentemente, muestras de sangre, plasma o suero. Pueden obtenerse muestras de tejidos u órganos a partir de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. Pueden obtenerse células separadas a partir de fluidos corporales o de tejidos u órganos mediante técnicas de separación, tales como centrifugación o clasificación de células. Preferentemente, se obtienen muestras de células, tejidos u órganos a partir de aquellas células, tejidos u órganos, que expresan o producen los péptidos denominados marcadores en el presente documento.

40 La secuencia de 356 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 corresponde a las posiciones 20-375 de la secuencia conocida de la molécula humana CD14 de acuerdo con, por ejemplo, el n.º de referencia de GenBank AAH 10507.1.

SEQ ID NO: 1:

Thr	Thr	Pro	Glu	Pro	Cys	Glu	Leu	Asp	Asp	Glu	Asp	Phe	Arg	Cys	Val
1				5					10					15	
Cys	Asn	Phe	Ser	Glu	Pro	Gln	Pro	Asp	Trp	Ser	Glu	Ala	Phe	Gln	Cys
			20					25					30		
Val	Ser	Ala	Val	Glu	Val	Glu	Ile	His	Ala	Gly	Gly	Leu	Asn	Leu	Glu
		35					40					45			
Pro	Phe	Leu	Lys	Arg	Val	Asp	Ala	Asp	Ala	Asp	Pro	Arg	Gln	Tyr	Ala

ES 2 623 879 T3

50						55						60			
Asp	Thr	Val	Lys	Ala	Leu	Arg	Val	Arg	Arg	Leu	Thr	Val	Gly	Ala	Ala
65						70						75			80
Gln	Val	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	Tyr
						85						90			95
Ser	Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Ile	Thr	Gly	Thr
						100						105			110
Met	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Glu	Ala	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Ser	Ser	Leu
						115						120			125
Arg	Leu	Arg	Asn	Val	Ser	Trp	Ala	Thr	Gly	Arg	Ser	Trp	Leu	Ala	Glu
						130						135			140
Leu	Gln	Gln	Trp	Leu	Lys	Pro	Gly	Leu	Lys	Val	Leu	Ser	Ile	Ala	Gln
145						150						155			160
Ala	His	Ser	Pro	Ala	Phe	Ser	Cys	Glu	Gln	Val	Arg	Ala	Phe	Pro	Ala
						165						170			175
Leu	Thr	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Asp	Asn	Pro	Gly	Leu	Gly	Glu	Arg	Gly
						180						185			190
Leu	Met	Ala	Ala	Leu	Cys	Pro	His	Lys	Phe	Pro	Ala	Ile	Gln	Asn	Leu
						195						200			205
Ala	Leu	Arg	Asn	Thr	Gly	Met	Glu	Thr	Pro	Thr	Gly	Val	Cys	Ala	Ala
						210						215			220
Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Gln	Pro	His	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	His	Asn
225						230						235			240
Ser	Leu	Arg	Ala	Thr	Val	Asn	Pro	Ser	Ala	Pro	Arg	Cys	Met	Trp	Ser
						245						250			255
Ser	Ala	Leu	Asn	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Phe	Ala	Gly	Leu	Glu	Gln	Val
						260						265			270
Pro	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Lys	Leu	Arg	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Cys	Asn
						275						280			285

Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn  
 290 295 300  
 Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro  
 305 310 315 320  
 His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser  
 325 330 335  
 Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Gly Ala  
 340 345 350  
 Arg Gly Phe Ala  
 355 -

5 El término "sCD14-ST" tal como se utiliza en el presente documento se refiere al péptido, que también se conoce como "subtipo CD14 soluble" o "presepsina". sCD14-ST se deriva de sCD14 (CD14 soluble), del cual existen al menos dos formas de mayor peso molecular (49 kDa y 55 kDa) y de las cuales sCD14-ST es un fragmento. La proteólisis de sCD14 conduce a la generación de sCD14-ST. sCD14-ST, cuando se somete a electroforesis en condiciones no reductoras, tiene un peso molecular aparente de  $13 \pm 2$  kDa. Existen anticuerpos que se unen específicamente a sCD14-ST sin unión a sCD14, permitiendo de este modo la discriminación entre sCD14-ST y sCD14. Por otra parte, puede excluirse beneficiosamente un anticuerpo que pueda unirse a sCD14, pero que no reconoce a sCD14-ST.

10 El término "péptido o polipéptido" o "marcador" tal como se usa en el presente documento significa sCD14-ST, en el que se determinan, de acuerdo con una realización particular, una combinación de marcadores, incluyendo pero no limitado a un marcador neurohormonal, un marcador cardíaco isquémico, un marcador de la superfamilia de citocinas del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , la familia de receptores de interleucina, por ejemplo, similar 1 al receptor de interleucina 1, también conocida como IL1RL1 y ST2, o la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y/o un marcador inflamatorio tal como se explicó anteriormente. Se ha descubierto que los marcadores neurohormonales, marcadores, que son reguladores del equilibrio hídrico, marcadores cardíacos isquémicos, marcadores de la superfamilia de citocinas del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , la familia de receptores de interleucina, por ejemplo, similar 1 al receptor de interleucina 1, también conocida como IL1RL1 y ST2, o la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y marcadores inflamatorios representan grupos de indicadores de riesgo independientes. Por lo tanto, La combinación de sCD14-ST como un marcador cardiovascular novedoso con marcadores de dichos grupos de marcadores tal como se proporcionan por la invención, da lugar a un mayor aumento de sensibilidad y especificidad y, por lo tanto, a una mayor precisión en el diagnóstico de enfermedades o afecciones cardiovasculares o aterosclerosis o en la evaluación del riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis o en la evaluación del riesgo de mortalidad de un sujeto. Es además posible identificar con una precisión mayor un sujeto que se beneficiará de un determinado tratamiento. La precisión aumentada también permite la discriminación entre diversas enfermedades o afecciones cardiovasculares, tal como la discriminación entre insuficiencia cardíaca crónica e insuficiencia cardíaca aguda. Además, la precisión del procedimiento de acuerdo con la invención proporciona un medio para distinguir los sujetos que necesitan hospitalización de los sujetos que pueden ser dados de alta. En una realización preferente de la invención, la precisión aumentada permite identificar sujetos que tienen infarto de miocardio (admisión) y sujetos que no padecen infarto de miocardio (descarte).

30 El procedimiento de acuerdo con la invención de acuerdo con esta realización preferente comprende la determinación de sCD14-ST, en el que se determina la cantidad de dicho compuesto, así como la cantidad de un marcador neurohormonal, un regulador del equilibrio hídrico, un marcador cardíaco isquémico, un marcador de la superfamilia de citocinas del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , la familia de receptores de interleucina, por ejemplo, similar 1 al receptor de interleucina 1, también conocida como IL1RL1 y ST2, o la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y/o un marcador inflamatorio en la misma muestra o en una muestra diferente del mismo sujeto.

35 El marcador neurohormonal se puede seleccionar, por ejemplo, entre péptido natriurético auricular (ANP), péptido natriurético cerebral (BNP) (tipo B), o fragmentos N-terminales de los respectivos propéptidos NT-proANP, proANP y NT-proBNP, Es preferente NT-proBNP como marcador neurohormonal. El marcador de equilibrio hídrico se puede seleccionar, por ejemplo, de péptidos derivados de pre-provasopresina, preferentemente copeptina. La copeptina es la porción C-terminal de la pre-provasopresina.

40 Se puede determinar, por ejemplo, cTn como un marcador cardíaco isquémico, preferentemente como un marcador de infarto de miocardio. En el enfoque multi-marcador, el marcador cardíaco isquémico es preferentemente cTnT o cTnI y más preferentemente cTnT (hsTnT) de alta sensibilidad o cTnI de alta sensibilidad, y la cantidad de referencia del marcador cardíaco isquémico es preferentemente de aproximadamente 8 pg/ml.

45

El marcador inflamatorio se puede seleccionar, por ejemplo, entre la proteína C-reactiva (CRP), interleucinas, en particular IL-6, y moléculas de adhesión tales como VCAM e ICAM. La CRP o la IL-6 se determinan preferentemente como el marcador inflamatorio.

5 En cuanto a un uso de un marcador inflamatorio de acuerdo con una realización particular, se determina una cantidad de proteína C-reactiva (CRP), en particular, proteína C-reactiva de alta sensibilidad (CRP-hs) en la misma o diferente muestra del sujeto, además de determinar la cantidad de sCD14-ST, cuya realización preferente proporciona un mayor aumento de la sensibilidad de los resultados de la determinación y la especificidad de la discriminación entre sujetos que son ingresados en el hospital y que finalmente serán sometidos a una intervención o entre sujetos con riesgo de mortalidad y sujetos que no son considerados adicionalmente para tratamientos clínicos o médicos. La proteína C-reactiva se puede ensayar por procedimientos conocidos (Roberts y col, Clin Chem 2001, 47: 418-425 [Erratum, Clin Chem 2001:47:980.]), por ejemplo, mediante nefelometría cinética o mediante inmunoensayo enzimático de tipo sándwich en fase sólida con anticuerpo monoclonal (por ejemplo, IMx, Abbott Laboratories, North Chicago), calibrado con la norma de referencia internacional de la Organización Mundial de la Salud para el inmuno ensayo CRP (85/506) (Comité de expertos de la OMS para patrones biológicos. Trigésimo séptimo Informe. Servicio de Representación técnica del Organismo Mundial de la Salud 1987; 760:21-22.). El intervalo de valores detectado por el ensayo es típicamente de 0,05 a 30 µg/ml. La mediana del valor normal para la proteína C-reactiva es típicamente de 0,8 µg/ml, con un 90 por ciento de los valores normales <3 µg/ml y 99 por ciento <10,0 µg/ml. Una cantidad de referencia, es decir, un nivel para la proteína C-reactiva ≥ 4 µg/ml, y especialmente un nivel de proteína C-reactiva >10 µg/ml, debe ser preferentemente el umbral para ser ingresado en el hospital.

20 En el enfoque multi-marcador, el marcador inflamatorio es preferentemente procalcitonina (PCT) y la cantidad de referencia de PCT es preferentemente de aproximadamente 0,5 ng/ml, 2,0 ng/ml y 10 ng/ml.

25 El marcador de la superfamilia de citocinas del factor de crecimiento transformante β puede seleccionarse, por ejemplo de las isoformas de TGF-β, preferentemente, se pueden determinar MIC-1 o GDF-15; la cantidad de referencia del marcador de la superfamilia de citocinas del factor de crecimiento transformante β es preferentemente de aproximadamente 1,0 ng/ml.

Como marcador de la familia de receptores de interleucinas, se pueden seleccionar preferentemente IL1RL1/ST2.

El marcador de equilibrio hídrico se puede seleccionar, por ejemplo, de péptidos derivados de pre-provasopresina, preferentemente coceptina. La cantidad de referencia de coceptina es preferentemente de 11,25 pmol/l.

30 Como marcador de lesión renal, se puede seleccionar preferentemente lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL).

35 En determinadas realizaciones, se determina la cantidad de sCD14-ST, además de la de un marcador adicional seleccionado de un marcador neurohormonal (por ejemplo, NT-proBNP), un marcador cardíaco isquémico (por ejemplo, hsTnT), un marcador inflamatorio (por ejemplo, proteína C-reactiva, CRP) y un marcador de la familia de receptores de la interleucina-1 (por ejemplo IL1RL1/ST2). En dichas realizaciones, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección en el sentido de la presente invención, es decir, una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis. Puede ser o incluir, por ejemplo, insuficiencia cardíaca aguda. Por ejemplo, la enfermedad o afección también puede seleccionarse del grupo que consiste en síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica, cardiopatía isquémica, angina de pecho, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico, y/o accidentes isquémicos transitorios.

40 Preferentemente, el sujeto de acuerdo con la invención se presenta en el servicio de urgencias, preferentemente en un hospital, aún más preferentemente en el departamento médico de urgencias.

45 En el contexto de la presente invención, la expresión "servicio de urgencias" se refiere a cualquier localización en la que los sujetos se presentan con sensación de malestar o sujetos que buscan una evaluación de su riesgo individual de desarrollar determinadas enfermedades, con el fin de consultar a una persona que tenga formación médica, preferentemente un médico, para obtener un análisis de su estado fisiológico y/o la causa subyacente de su malestar. Los ejemplos típicos son servicios de urgencias o salas de emergencia de hospitales, ambulancias, consultorios médicos privados o consultorios médicos y otras instituciones adecuadas para el diagnóstico y/o tratamiento de los sujetos.

50 El procedimiento de la presente invención es, preferentemente, un procedimiento *in vitro*. Además, puede comprender etapas adicionales a aquellas mencionadas anteriormente de forma explícita. Por ejemplo, las etapas adicionales pueden referirse a pre-tratamientos de muestras o a la evaluación de los resultados obtenidos mediante el procedimiento. El procedimiento puede llevarse a cabo manualmente o asistido por automatización. Preferentemente, la etapa (a) y/o (b) puede estar total o parcialmente asistida por automatización, por ejemplo, mediante un equipo robótico y sensorial adecuado para la determinación en la etapa (a) o una comparación implementada por ordenador en la etapa (b).

55 El término "evaluación" tal como se usa en el presente documento significa evaluar si un sujeto está en riesgo elevado de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular, si un sujeto necesita hospitalización o si un sujeto se

beneficiará de un tratamiento específico. Como se entenderá por los expertos en la técnica, dicha evaluación no pretende normalmente ser correcta para todos (es decir, para el 100 %) de los sujetos a identificar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos puedan identificarse (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). Si una parte es estadísticamente significativa o no se puede determinar sin más dilación por el experto en la técnica, usando diversas herramientas de evaluación estadísticas conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba de la t de student, prueba de Mann-Whitney etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Weardon, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son al menos un 90 %, al menos un 95%, al menos un 97%, al menos un 98 % o al menos un 99 %, Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, o 0,0001. Más preferentemente, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80 % o al menos un 90 % de los sujetos de una población, pueden identificarse adecuadamente por el procedimiento de la presente invención.

El término "predicción" usado en el presente documento se refiere a evaluar la probabilidad según la cual un sujeto va a morir dentro de un período de tiempo definido (período predictivo) en el futuro. El período predictivo es un intervalo en el que el sujeto va a morir de acuerdo con la probabilidad prevista. El período predictivo puede ser la vida útil restante total del sujeto después del análisis mediante el procedimiento de la presente invención. Preferentemente, sin embargo, el período predictivo es un intervalo de un mes, seis meses o uno, dos, tres, cuatro, cinco o diez años después de la aparición de la complicación cardiovascular (de manera más preferente y precisa, después de que la muestra que es analizada mediante el procedimiento de la presente invención, haya sido obtenida). Como se entenderá por los expertos en la técnica, dicha evaluación no pretende por lo general ser correcta para el 100 % de los sujetos a analizar. El término, sin embargo, requiere que la evaluación sea validada por una parte estadísticamente significativa de los sujetos a analizar. Si una parte es estadísticamente significativa o no se puede determinar sin más dilación por el experto en la técnica, usando diversas herramientas de evaluación estadísticas conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba de la t de student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Weardon, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son al menos un 90 %, al menos un 95%, al menos un 97%, al menos un 98 % o al menos un 99 %, Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, o 0,0001. Preferentemente, la probabilidad prevista por la presente invención permite que la predicción será correcta para al menos un 60 %, al menos un 70%, al menos un 80%, o al menos un 90 % de los sujetos de una cohorte dada.

El término "mortalidad", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la mortalidad que está causada por complicaciones cardiovasculares, enfermedades pulmonares, embolismo pulmonar, trombosis, complicaciones tromboembólicas, accidente cerebrovascular, tumores y enfermedades malignas, septicemia, choque séptico, trastornos hemorrágicos, insuficiencia orgánica, enfermedad renal aguda, enfermedades infecciosas, complicaciones gastrointestinales, pancreatitis, trastornos reumáticos y otros.

La expresión "evaluación del riesgo de mortalidad", tal como se usa en el presente documento, significa que el sujeto a analizar por el procedimiento de la presente invención se asigna al grupo de sujetos de una población que tiene un riesgo de mortalidad normal, es decir, no elevado, o a un grupo de sujetos que tienen un riesgo significativamente elevado. Un riesgo elevado tal como se cita de acuerdo con la presente invención, significa que el riesgo de mortalidad dentro de un período de predicción predeterminado es significativamente elevado para un sujeto, con respecto al riesgo medio de mortalidad en una población de sujetos. Preferentemente, para un período de predicción de un año, el riesgo medio está dentro del intervalo de 0,5 y 3,0 %, preferentemente, 1,5 %. Un riesgo elevado tal como se usa en el presente documento, preferentemente, se refiere a un riesgo de más del 3,0 %, preferentemente, más del 5,0 %, y, lo más preferentemente dentro de un 3,0 % a un 8,0 % con respecto a un período de predicción de un año. La perspectiva de tiempo en la que se puede aplicar dicha estratificación del riesgo (es decir, el período para el que el riesgo de pronóstico se puede predecir), puede ser de 1 día a 5 años, más preferentemente de 1 semana a 2 años. y de 1 mes a 1 año.

En general, la cantidad de sCD14-ST o el al menos un marcador adicional se determina en una población de referencia sana y en sujetos que padecen una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis con el fin de determinar un valor de referencia para los marcadores respectivos y valores umbral, respectivamente, que están asociados con un determinado estado fisiológico. Los resultados de las mediciones se analizan mediante procedimientos estadísticos conocidos por el experto, como el análisis de ROC (característica operativa del receptor). Se determina un valor umbral para una enfermedad o afección cardiovascular específica o aterosclerosis o para un determinado estado de riesgo del sujeto, en el que el umbral se selecciona de tal manera que se obtenga una especificidad y/o sensibilidad del ensayo, que es adecuada para el uso específico. En una realización preferente, los valores umbral se eligen teniendo en cuenta la distribución de los valores en una población. Puede ser útil, por ejemplo, elegir el valor de la mediana, el 60°, el 70°, el 80°, el 90°, el 95°, el 98° o el 99° percentil del grupo sano y/o del grupo no sano con el fin de establecer el valor de referencia y el valor umbral, respectivamente.

La cantidad de un compuesto seleccionado de sCD14-ST determinado en una muestra de un sujeto se compara entonces con la cantidad de dicho compuesto en una población de referencia sana. Se hace un diagnóstico/una evaluación basándose en umbrales que se han definido para un estado fisiológico dado.

La determinación combinada de acuerdo con la invención se realiza preferentemente de modo que las determinaciones paralelas de los marcadores se realicen en una o más muestras de un paciente a investigar.

Preferentemente, se investigan una o más muestras recogidas del paciente, por ejemplo, muestras de sangre completa o muestras de plasma o muestras de suero en uno o más ensayos de forma simultánea o inmediatamente secuencial. Las determinaciones se llevan un cabo de forma especialmente preferente en una sola muestra del paciente.

5 La determinación combinada de marcadores se puede realizar, en principio, basándose en cualquier procedimiento conocido usando ensayos comunes comerciales. Para la determinación, pueden usarse, por ejemplo, analizadores automatizados. Como alternativa, también se pueden usar ensayos rápidos, o ensayos de sistemas de análisis de puntos de asistencia (PDA) para su uso en la sala de emergencias, en la sala del hospital o unidad de cuidados intensivos, en la ambulancia o en el consultorio médico o también como una auto-prueba del paciente.

10 La determinación de la cantidad de un compuesto seleccionado de sCD14-ST o de cualquier otro péptido o polipéptido (marcador, tal como se usa en el presente documento) referido a esta memoria descriptiva se refiere a medir la cantidad o concentración, preferentemente semicuantitativa o cuantitativamente. La medición puede realizarse directa o indirectamente. La medición directa se refiere a medir la cantidad o concentración del péptido o polipéptido basándose en una señal que se obtiene a partir del péptido o del propio polipéptido y cuya intensidad se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presente en la muestra. Dicha señal - a veces citada en el presente documento como señal de intensidad - se puede obtener, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta incluye la medición de una señal obtenida a partir de un componente secundario (es decir, un componente que no es el péptido o el propio polipéptido) o un sistema de lectura biológica, por ejemplo, respuestas celulares cuantificables, ligandos, marcadores o productos de reacción enzimáticos.

Preferentemente, la medición de la cantidad de sCD14-ST se realiza usando un anticuerpo tal como un anticuerpo policlonal y preferentemente un anticuerpo monoclonal, que es específico para dicho compuesto. En una realización preferente, el anticuerpo se une específicamente a sCD14-ST sin unión a sCD14 o CD14. Dicha especificidad se obtiene, por ejemplo, si se genera un anticuerpo contra la región entre b3 y b4 en la estructura secundaria de CD14 (es decir, los aminoácidos 36 a 79 en CD14 humano).

De acuerdo con la presente invención, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido (marcador, tal como se usa en el presente documento) se puede lograr por todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos de inmunoensayo y procedimientos que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo en sándwich, competición u otros. Dichos ensayos desarrollarán una señal que es indicativa de la presencia o ausencia de péptido o polipéptido. Además, la intensidad de la señal puede, preferentemente, estar correlacionada directa o indirectamente (por ejemplo, inversamente proporcional) con la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Otros procedimientos adecuados comprenden medir una propiedad física o química específica para el péptido o polipéptido, tal como su masa molecular precisa o su espectro de RMN. Dichos procedimientos comprenden, preferentemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos de cromatografía. Además, los procedimientos incluyen procedimientos basados en microplacas ELISA, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (AccuTnl, Beckmann-Coulter Diagnostics; Architect cTnl y AxSYM cTnl, Abbott Diagnostics; ADVIA Centaur XP cTNI, Bayer Healthcare; Immulite 2500 cTnl, Diagnostics Product Corporation; Elecsys cTnT, Roche Diagnostics), EUC (ensayo enzimático de unión del cobalto, disponible por ejemplo en analizadores Roche-Hitachi), LIAISON®, BRAHMS PCT®, Analizador de acceso aleatorio KRYPTOR, BRAHMS PCT LIA, BRAHMS PCT-Q y pruebas de aglutinación en látex (disponibles por ejemplo en los analizadores Roche-Hitachi™, sistema PATHFAST de inmunoensayo enzimático quimioluminiscente (IEEQL), Mitsubishi Chemical Medience Corporation, Tokio, Japón).

Preferentemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido (marcador, tal como se usa en el presente documento) comprende las etapas de (a) poner en contacto una célula capaz de provocar una respuesta celular cuya intensidad es indicativa de la cantidad del péptido o polipéptido con dicho péptido o polipéptido durante un período de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular. Para medir las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade, preferentemente, a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión mensurable de un gen indicador o la secreción de una sustancia, por ejemplo, un péptido, polipéptido, o una molécula pequeña. La expresión o sustancia generará una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad del péptido o polipéptido.

También preferentemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido (marcador, tal como se usa en el presente documento) comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica obtenible a partir del péptido o polipéptido en la muestra. Tal como se ha descrito anteriormente, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada en una variable m/z específica para el péptido o polipéptido observado en espectros de masas o un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido (marcador, tal como se usa en el presente documento) puede comprender, preferentemente, las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) eliminar (opcionalmente) el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una señal de intensidad. La unión, de acuerdo con la presente invención, incluye tanto la unión covalente como la no

covalente. Un ligando de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier compuesto, por ejemplo, un péptido, polipéptido, ácido nucleico, o molécula pequeña, que se une al péptido o polipéptido descrito en el presente documento. Los ligandos preferentes incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos tales como receptores o compañeros de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos que comprenden los dominios de unión para los péptidos y aptámeros, por ejemplo, aptámeros de ácidos nucleicos o de péptidos. Los procedimientos para preparar dichos ligandos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, también se ofrece la identificación y producción de anticuerpos adecuados o aptámeros por proveedores comerciales. El experto en la técnica está familiarizado con procedimientos para desarrollar derivados de dichos ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Estos derivados pueden entonces ensayarse respecto de su unión de acuerdo con procedimientos de detección conocidos en la técnica, por ejemplo, presentación en fagos. Los anticuerpos tal como se citan en el presente documento incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub> que son capaces de unirse al antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos híbridos humanizados en los que se combinan las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que exhiben una especificidad de antígeno deseada con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donantes incluirán por lo general al menos los restos de aminoácido de unión al antígeno del donante, pero también pueden comprender otros restos de aminoácido estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos se pueden preparar mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido. La unión específica de acuerdo con la presente invención significa que el ligando o agente no debe unirse sustancialmente a ("reaccionar de forma cruzada" con) otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra a analizar. Preferentemente, el péptido o polipéptido unido específicamente debe unirse con al menos una afinidad 3 veces mayor, más preferentemente al menos 10 veces mayor e incluso más preferentemente al menos 50 veces mayor que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si todavía puede distinguirse y medirse inequívocamente, por ejemplo, de acuerdo con su tamaño en una transferencia Western, o por su abundancia relativamente mayor en la muestra. La unión del ligando se puede medir por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Preferentemente, dicho procedimiento es semicuantitativo o cuantitativo. Se describen procedimientos adecuados a continuación.

En primer lugar, la unión de un ligando se puede medir directamente, por ejemplo, por RMN o resonancia de plasmón superficial.

En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, se puede medir un producto de reacción enzimático (por ejemplo, la cantidad de una proteasa se puede medir midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo, en una transferencia de Western). Como alternativa, el ligando puede presentar propiedades enzimáticas por sí mismo y el complejo "ligando/péptido o polipéptido" o el ligando que estaba unido por el péptido o polipéptido, respectivamente, puede ponerse en contacto con un sustrato adecuado que permita la detección mediante la generación de una señal de intensidad. Para la medición de productos de reacción enzimáticos, preferentemente la cantidad de sustrato es saturante. El sustrato también se puede marcar con un marcador detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un período de tiempo adecuado. Un período de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca una cantidad detectable, preferentemente medible, de producto. En vez de medir la cantidad de producto, se puede medir el tiempo necesario para la aparición de una cantidad dada (por ejemplo, detectable) de producto.

En tercer lugar, el ligando puede acoplarse de forma covalente o no covalente a un marcador que permita la detección y medición del ligando. El marcaje puede realizarse por métodos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcador directamente (de forma covalente o no covalente) al ligando. El marcaje indirecto implica la unión (de forma covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con un marcador adecuado y/o ser la diana (receptor) del ligando terciario que se une al ligando secundario. El uso de ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior se usa a menudo para aumentar la señal. Los ligandos secundarios y de orden superior adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios y el sistema bien conocido de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también pueden "marcarse" con uno o más marcadores conocidos en la técnica. Dichos marcadores pueden entonces ser dianas para ligandos de orden superior. Los marcadores adecuados incluyen biotina, digoxigenina, etiqueta His, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, etiqueta Myc, hemaglutinina del virus de la gripe A (HA), proteína de unión a la maltosa, y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, el marcador está preferentemente en el extremo N-terminal y/o en el extremo C-terminal. Los marcadores adecuados son cualquier marcador detectable por un procedimiento de detección adecuado. Los marcadores típicos incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridano, luminol, rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radiactivos, marcadores magnéticos (por ejemplo, "perlas magnéticas", incluyendo marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de los mismos. Los sustratos adecuados para la detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de tetrazolio 4 nitro azul y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, disponible como solución madre preparada de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación de enzima-sustrato adecuada puede dar como resultado un producto de

reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que puede medirse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). En cuanto a la medición de la reacción enzimática, los criterios dados anteriormente se aplican de manera análoga. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo Texas, fluoresceína y los tintes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Otros marcadores fluorescentes están disponibles, por ejemplo, en Molecular Probes (Oregón). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Los marcadores radiactivos típicos incluyen <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y similares. Un marcador radiactivo puede detectarse por cualquier procedimiento conocido y adecuado, por ejemplo, una película sensible a la luz o un generador de imágenes de fósforo. Los procedimientos de medición adecuados de acuerdo con la presente invención incluyen también precipitación (particularmente inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), RIA (radioinmuno ensayo), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos tipo sándwich de enzimas, inmunoensayos sándwich de electroquimioluminiscencia (IEEQL), fluoro inmunoensayos de lantánido mejorado de disociación (DELFA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría reforzada con látex o ensayos inmunes en fase sólida. Pueden usarse procedimientos adicionales conocidos en la técnica (tales como electroforesis en gel, electroforesis en gel en 2D, electroforesis en gel de poli(acrilamida) SDS (SDS-PAGE), transferencia de Western y espectrometría de masas) solos o en combinación con marcaje u otros procedimientos de detección descritos anteriormente.

También preferentemente, la cantidad de un péptido o polipéptido (marcador, tal como se usa en el presente documento) puede determinarse del modo siguiente: (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el péptido o polipéptido como se especificó anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) medir la cantidad de péptido o polipéptido que está unido al soporte. El ligando, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está preferentemente presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para la fabricación de soportes sólidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, materiales de columna disponibles en el mercado, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, placas y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, hojas, duracitas, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede estar unido a muchos portadores diferentes. Los ejemplos de portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas), agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los procedimientos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, pero sin limitación, interacciones iónicas, hidrófobas y similares. También se contempla el uso de "matrices de suspensiones" como matrices de acuerdo con la presente invención (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1): 9-12). En dichos conjuntos de suspensión, el portador, por ejemplo, una microperla o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consiste en diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que portan diferentes ligandos. Los procedimientos para producir dichas matrices, por ejemplo, basados en química de fase sólida y en grupos protectores fotolábiles, se conocen de manera general (documento US 5.744.305).

El término "cantidad" tal como se usa en el presente documento comprende la cantidad absoluta de un polipéptido o péptido (marcador, tal como se usa en el presente documento), la cantidad o la concentración relativa del mencionado polipéptido o péptido, así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona con el mismo o pueda derivarse del mismo. Dichos valores o parámetros comprenden valores de señal de intensidad de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas de dichos péptidos mediante mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en espectros de masas o espectros de RMN. Además, se incluyen todos los valores o parámetros que se obtienen mediante mediciones indirectas especificadas en otra parte de esta descripción, por ejemplo, niveles de respuesta determinados a partir de sistemas de lectura biológica en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidas a partir de ligandos unidos específicamente. Debe entenderse que los valores que se correlacionan con las cantidades o parámetros anteriormente mencionados también pueden obtenerse mediante todas las operaciones matemáticas estándar.

El término "comparar", tal como se usa en el presente documento, comprende la comparación de la cantidad del péptido o polipéptido (marcador, tal como se utiliza en el presente documento) comprendida por la muestra a analizar con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada en otra parte de esta descripción. Debe entenderse que comparar, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una comparación de parámetros o valores correspondientes, por ejemplo, una cantidad absoluta se compara con una cantidad de referencia absoluta mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia o una señal de intensidad obtenida de una muestra de ensayo se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación mencionada en la etapa (b) del procedimiento de la presente invención puede llevarse a cabo manualmente o asistida por ordenador. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos por un programa informático. El programa informático puede evaluar además el resultado de la comparación, es decir, proporcionar automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Basándose en la comparación de la cantidad determinada en la etapa a) y la cantidad de referencia, es posible evaluar si un sujeto es susceptible a una intervención cardíaca, es decir, si perteneciente al grupo de sujetos que pueden ser tratados con éxito en la intervención cardíaca. Por lo tanto, la cantidad de referencia debe elegirse de modo que una

diferencia o una similitud en las cantidades comparadas, permita identificar aquellas del sujeto de ensayo que pertenecen al grupo de sujetos susceptibles de intervención cardíaca o identificar aquellos sujetos de ensayo que no son susceptibles de una intervención cardíaca.

5 Por consiguiente, la expresión "cantidad de referencia", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad del marcador respectivo tal como se usa en el presente documento, que permite evaluar si un sujeto debe ser ingresado en el hospital o en una unidad de cuidados intensivos o puede recibir el alta y regresar a su domicilio. Por consiguiente, la referencia puede derivarse, por ejemplo, de (i) un sujeto que se sabe que ha sido ingresado de forma exitosa en el hospital, es decir, que ha sido sometido a un examen adicional y posterior tratamiento o tratamiento de cuidados intensivos basándose en los resultados de la investigación posterior sin que se produzcan efectos adversos, tales como mortalidad o efectos secundarios causados por un régimen de tratamiento no adaptado, o (ii) un sujeto que se sabe que no ha sido ingresado en el hospital y que murió o desarrolló efectos secundarios causados por un régimen de tratamiento no adaptado. Además, la cantidad de referencia puede definir una cantidad umbral, por la que una cantidad superior al umbral será indicativa de un sujeto que debe ser ingresado en el hospital para un examen posterior y/o un tratamiento intensivo, mientras que una cantidad inferior a la cantidad umbral será un indicador de que un sujeto no puede recibir el alta y regresar a su domicilio. La cantidad de referencia aplicable a un sujeto individual puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos tales como edad, género, o subpoblación, así como de los medios usados para la determinación del polipéptido o péptido al que se hace referencia en el presente documento (marcador, tal como se usa en el presente documento). Puede determinarse una cantidad de referencia adecuada mediante el procedimiento de la presente invención a partir de una muestra de referencia que se va a analizar conjuntamente, es decir simultáneamente o posteriormente, con la muestra de ensayo. Una cantidad de referencia preferente que sirve como umbral puede derivarse del límite superior de referencia (LSR) de lo normal, es decir, el límite superior de la cantidad fisiológica que se encuentra en una población de sujetos aparentemente sanos. El LSR para una población dada de sujetos puede determinarse mediante diversas técnicas bien conocidas. Una técnica adecuada puede ser determinar la mediana de la población para las cantidades de péptido o polipéptido que se han de determinar en el procedimiento de la presente invención. Un umbral preferente (es decir, la cantidad de referencia) sCD14-ST es al menos una o dos veces el límite de detección inferior. Por ejemplo, el límite de detección inferior del ensayo PATHFAST sCD14-ST citado en este contexto es, preferentemente, 20 pg/ml.

Por lo tanto, en una realización preferente de la invención, la cantidad de referencia que define una cantidad para sCD14-ST es de 20 pg/ml y por debajo del percentil 99<sup>o</sup>, por debajo del percentil 97,5<sup>o</sup> o por debajo del percentil 95<sup>o</sup> o por debajo del percentil 90<sup>o</sup> de una población aparentemente sana.

Una cantidad de un compuesto seleccionado de sCD14-ST mayor que la cantidad de referencia es, más preferentemente, indicativa de un sujeto que tiene una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis o de un sujeto con un riesgo elevado de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis. En una realización preferente adicional, una cantidad del compuesto mayor que la cantidad de referencia es característica de un sujeto, cuyo estado fisiológico requiere el inicio de medidas terapéuticas adecuadas y/o ingreso en un hospital. Una cantidad del compuesto mayor que la cantidad de referencia indica preferentemente un sujeto, que se beneficiará de un tratamiento con una sustancia seleccionada del grupo que consiste en antibióticos, probióticos y lactulosa. En otra realización preferente, una cantidad del compuesto mayor que la cantidad de referencia es indicativa de sujetos con un riesgo aumentado de mortalidad.

40 Ventajosamente, se ha encontrado en el estudio subyacente a la presente invención que sCD14-ST es un biomarcador de pronóstico fiable para evaluar el éxito de intervenciones cardíacas para sujetos que necesitan las mismas, es decir, sujetos que padecen enfermedades o afecciones cardiovasculares o aterosclerosis y, en particular, aquellos que están afectados por episodios cardiovasculares agudos o insuficiencia cardíaca, por ejemplo, insuficiencia cardíaca aguda. Gracias a la presente invención, puede realizarse fácilmente una estratificación de riesgo/éxito antes de someter a un paciente a una intervención cardíaca. En caso de que el paciente resulte no ser susceptible a una intervención cardíaca, puede evitarse dicha terapia peligrosa, laboriosa y/o costosa. Por lo tanto, además de evitar en un sujeto los efectos secundarios adversos y graves ligados a una intervención cardíaca, el procedimiento de la presente invención será beneficioso para el sistema de salud en tanto que se ahorrarán recursos. Debe entenderse que de acuerdo con el procedimiento de la presente invención que se describe en el presente documento anteriormente y más adelante, la cantidad de sCD14-ST o los medios para la determinación de la misma pueden usarse para la fabricación de una composición de diagnóstico para identificar un sujeto susceptible de una intervención cardíaca.

En una realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la invención se usa para la evaluación del riesgo en un sujeto que tiene síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO).

55 Además o como alternativa, el procedimiento anterior de la presente invención puede usarse para identificar un sujeto susceptible al tratamiento de cuidados intensivos en una unidad de cuidados intensivos. El tratamiento de cuidados intensivos puede incluir procedimientos diagnósticos adicionales, por ejemplo ecocardiografía transtorácica (ETT), ecocardiografía transesofágica (ETE), ecografía abdominal, escáner TC del tórax, radiografía del tórax, escáner TC de alta resolución, cateterismo cardíaco (parte izquierda y derecha del corazón), gammagrafía por perfusión/inhalación, ecografía de compresión, ECG de ejercicio en cinta ergométrica, broncoscopia, flebografía, angiografía y arteriografía por TC (ATC) o arteriograma de resonancia magnética (ARM) del cerebro. En caso de enfermedades cardíacas, complicaciones tromboembólicas, accidente cerebrovascular o embolia pulmonar, cáncer y otras enfermedades extra

cardíacas, una terapia comprende ICP, diferentes procedimientos quirúrgicos, por ejemplo, embolectomía y medicación específica, por ejemplo oxígeno, anticoagulación oral con antagonistas de la vitamina K, anticoagulación con heparinas no fraccionadas, heparinas BPM, otros antitrombóticos, fármacos trombolíticos, ácido acetilsalicílico, clopidogrel, diuréticos del asa y otros diuréticos, betabloqueantes, inhibidores de ACE, digitálicos, antagonistas de calcio, nitratos, esteroides, teofilina, beta-2 miméticos, otros broncodilatadores, AINE, opiáceos, antibióticos etc. La intervención terapéutica comprende toda clase de cirugía y medicamentos.

Preferentemente, la terapia mencionada se selecciona para un sujeto mediante el procedimiento de la presente invención, siendo dicha terapia una terapia farmacológica. Más preferentemente, el medicamento mencionado es un inhibidor de ACE, preferentemente captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, perindopril, quinapril, ramipril, o trandolapril, un agente bloqueante del receptor AT-1, preferentemente, candesartán, losartán o valsartán, un agente bloqueante del receptor  $\beta$ , preferentemente, bisoprolol, carvedilol, metoprolol o succinato o un antagonista de la aldosterona, preferentemente, espirolactona o eplerenona, preferentemente, tratamiento con lactulosa, probióticos y antibióticos.

En una realización preferente de la invención, se usan antibióticos para el tratamiento, que no son reabsorbidos por el intestino. En una realización preferente adicional, se emplean antibióticos aminoglicósidos. Preferentemente, se utiliza neomicina y paromicina.

Otra terapia preferente a seleccionar para un sujeto de acuerdo con la presente invención es una terapia de intervención. Una terapia de intervención a la que se hace referencia en el presente documento es una terapia que se basa en intervenciones físicas con el sujeto, por ejemplo, mediante ICP, cirugía, y/o intervenciones electrofisiológicas. Más preferentemente, dicha terapia de intervención es terapia de resincronización cardíaca (TRC) o basada en el implante de un desfibrilador cardioversor (IDC).

Además, la presente invención prevé un kit para llevar a cabo los procedimientos de la presente invención, para identificar un sujeto con riesgo elevado de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis o que vaya a ser ingresado en un hospital, decidir acerca del ingreso del sujeto en el hospital o predecir el riesgo de mortalidad en un sujeto. Dicho kit comprende medios para determinar la cantidad de sCD14-ST o una variante del mismo en una muestra de un sujeto y medios para comparar dichas cantidades con las cantidades de referencia, en el que se identifica a un sujeto con riesgo elevado de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis o de ser ingresado en el hospital, se toma una decisión acerca del comienzo de medidas terapéuticas adecuadas o acerca del ingreso del sujeto en el hospital o en una unidad de cuidados intensivos, o se predice el riesgo de mortalidad del sujeto.

El término "kit", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de los medios anteriormente mencionados, preferentemente, proporcionados por separado o en un único recipiente. El recipiente, también preferentemente, comprende instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención.

Se ha de entender que las definiciones y explicaciones de los términos realizadas anteriormente y a continuación se aplican de acuerdo con todas las realizaciones descritas en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas.

### 1. Evaluación del riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad cardiovascular

La determinación de sCD14-ST y su comparación con una cantidad de referencia respectiva, proporciona un alto valor predictivo para identificar si un sujeto está en riesgo elevado de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis que requiera medidas terapéuticas adecuadas. En particular, el procedimiento permite determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis también en un sujeto, que está libre de signos o síntomas clínicos indicativos de dicha enfermedad o afección o aterosclerosis.

Preferentemente, el sujeto que tiene un riesgo elevado de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis se caracteriza por una cantidad de sCD14-ST determinada en una muestra de dicho sujeto, que es preferentemente de 225 pg/ml o mayor, preferentemente de 240 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 260 pg/ml o mayor,

Típicamente, se aplica una comparación con una población de referencia sana con el fin de identificar los umbrales con respecto a niveles elevados de sCD14-ST. La cantidad de referencia de sCD14-ST en sujetos sanos es preferentemente de entre 223 pg/ml y 262 pg/ml.

### 2. Diagnóstico de una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis en un sujeto

De acuerdo con una realización preferente de la invención, se proporciona un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis en un sujeto. Preferentemente, se proporciona un diagnóstico para una o más enfermedades o afecciones cardiovasculares seleccionadas del grupo que consiste en síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica, cardiopatía isquémica, angina de pecho, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico y accidentes isquémicos transitorios.

El procedimiento es más útil para evaluar un pronóstico de un sujeto con una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis.

En una realización preferente, el procedimiento se usa para discriminar entre diversas enfermedades o afecciones cardiovasculares o aterosclerosis.

5 a) Diagnóstico de insuficiencia cardíaca crónica

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca crónica, preferentemente en el que la cantidad de un compuesto seleccionado de sCD14-ST es 115 pg/ml o mayor, preferentemente de 150 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 260 pg/ml o mayor, En una realización alternativa, la cantidad de sCD14-ST es de entre 115 pg/ml y 4000 pg/ml, más preferentemente entre 150 pg/ml y 3000 pg/ml, aún más preferentemente entre 260 pg/ml y 2000 pg/ml.

10 b) Diagnóstico de angina de pecho

Como una realización adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para el diagnóstico de angina de pecho, preferentemente en el que la cantidad de sCD14-ST es de 214 pg/ml o mayor, preferentemente de 216 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 222 pg/ml o mayor, Como alternativa, la cantidad de sCD14-ST en un sujeto que tiene angina de pecho es de entre 214 pg/ml y 4000 pg/ml, más preferentemente entre 216 pg/ml y 3000 pg/ml, aún más preferentemente entre 222 pg/ml y 2000 pg/ml.

15 c) Diagnóstico de insuficiencia cardíaca aguda

La insuficiencia cardíaca aguda puede diagnosticarse mediante el procedimiento de acuerdo con la invención. En este, la cantidad de sCD14-ST en un sujeto que tiene insuficiencia cardíaca aguda es de 295 pg/ml o mayor, preferentemente de 354 pg/ml o mayor, en un sujeto que tiene insuficiencia cardíaca aguda es de 295 pg/ml o mayor, preferentemente de 354 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 455 pg/ml o mayor, Como alternativa, la cantidad de sCD14-ST es de entre 295 pg/ml y 4000 pg/ml, más preferentemente entre 354 pg/ml y 3000 pg/ml, aún más preferentemente entre 455 pg/ml y 2000 pg/ml.

En una realización preferente adicional, se aplica el procedimiento para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD) en un sujeto.

Además, el procedimiento de acuerdo con la invención permite discriminar entre insuficiencia cardíaca crónica e insuficiencia cardíaca aguda. En este, la cantidad de sCD14-ST en una muestra de un sujeto que tiene insuficiencia cardíaca aguda es preferentemente de 340 pg/ml o mayor, preferentemente de 354 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 455 pg/ml o mayor,

20 d) Diagnóstico de infarto de miocardio

En una realización preferente de la invención, el procedimiento es para diagnosticar infarto de miocardio. Se ha descubierto que el infarto de miocardio se caracteriza por la presencia de una cantidad de sCD14-ST en una muestra de un sujeto, que es preferentemente de 260 pg/ml o mayor, preferentemente de 276 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 295 pg/ml o mayor,

30 Como alternativa, la cantidad de sCD14-ST indicativa de infarto de miocardio es de entre 260 pg/ml y 4000 pg/ml, más preferentemente entre 276 pg/ml y 3000 pg/ml, aún más preferentemente entre 295 pg/ml y 2000 pg/ml.

Usando el procedimiento de acuerdo con la invención, el descarte de infarto de miocardio usando sCD14-ST podría ser ya posible en el momento del ingreso al servicio de urgencias. Ventajosamente, puede proporcionarse inmediatamente de acuerdo con la invención un diagnóstico basado en dicho compuesto y es suficiente una sola muestra. Esta es una ventaja particular con respecto a las mediciones convencionales de cTn, que dependen de la detección de un aumento o una reducción de cTn, por lo que se requieren al menos dos mediciones de cTn. Además, la potencia diagnóstica y pronóstica de sCD14-ST es superior en comparación con marcadores de la técnica anterior, tales como cTn.

40 Como alternativa, pueden determinarse los niveles de cTn en combinación con la cantidad de sCD14-ST con el fin de aumentar aún más la precisión.

45 3. Evaluación del riesgo de mortalidad de un sujeto

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para identificar un sujeto que tiene una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis que tiene un riesgo elevado de mortalidad. En este, la cantidad de sCD14-ST es preferentemente de 500 pg/ml o mayor, preferentemente de 800 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 1300 pg/ml. Como alternativa, la cantidad de sCD14-ST en un sujeto que tiene un riesgo de mortalidad elevado es de entre 500 pg/ml y 4000 pg/ml, más preferentemente entre 800 pg/ml y 3000 pg/ml, aún más preferentemente entre 1300 pg/ml y 2000 pg/ml.

5 En particular, el riesgo de mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda se puede evaluar usando la determinación de sCD14-ST. Los pacientes con insuficiencia cardíaca, especialmente con insuficiencia cardíaca aguda, muestran generalmente una alta mortalidad. La concentración de sCD14-ST puede identificar a pacientes con insuficiencia cardíaca con un elevado riesgo de mortalidad. Los pacientes con riesgo elevado de mortalidad según se evalúa por la concentración de sCD14-ST tenían en general insuficiencia cardíaca más avanzada que aquellos que sobrevivieron.

4. Evaluación de si un sujeto con una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis se beneficiará de un tratamiento específico

10 El transporte intestinal activo mediado por un portador se reduce en la insuficiencia cardíaca crónica o aguda, lo que indica disfunción epitelial como consecuencia de la isquemia intestinal y las altas concentraciones de lipopolisacárido (LPS) en la insuficiencia cardíaca edematosa que se relaciona con la Inflamación. Este hallazgo es consistente con la observación de intestino hipóxico y/o edematoso, lo que da como resultado una alteración de la función de barrera epitelial y la penetración de bacterias, como también se ha encontrado en la peritonitis bacteriana espontánea en pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal.

15 Se ha encontrado que los niveles elevados de sCD14-ST son indicativos de sujetos, en particular sujetos con insuficiencia cardíaca, que se beneficiarán del uso de antibióticos. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la invención es para evaluar si un sujeto se beneficiará del tratamiento con la sustancia seleccionada del grupo que consiste en antibióticos, probióticos y lactulosa.

20 Preferentemente, se emplean antibióticos que no son absorbidos por el intestino, tales como neomicina o paromicina. En general, se prefieren antibióticos aminoglucósidos. También son particularmente beneficiosos, los tratamientos adicionales con lactulosa y probióticos, que pueden cambiar la flora del intestino, cuando se aplican a aquellos sujetos.

25 Basándose en este hallazgo, la invención proporciona nuevos conceptos terapéuticos, en los que se proporciona una sustancia seleccionada del grupo que consiste en antibióticos, probióticos y lactulosa para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un aumento del nivel en plasma de sCD14-ST. Preferentemente, el nivel en plasma de sCD14-ST en la misma es de 345 pg/ml o mayor, preferentemente de 800 pg/ml o mayor, más preferentemente de 1300 pg/ml o mayor.

30 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una sustancia para su uso en un tratamiento, que no es un tratamiento para la septicemia o una enfermedad asociada con la disfunción de los fagocitos, tal como uremia, disminución de la actividad de las opsoninas del suero, deficiencia del complemento, disfunción fagocítica congénita, enfermedad granulomatosa crónica, deficiencia de mieloperoxidasa, leucemia, linfoma maligno, endocarditis bacteriana, diabetes y cirrosis hepática.

5. Determinación de si un sujeto necesita ser hospitalizado

35 Preferentemente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención permite identificar si un sujeto debe ser ingresado en el hospital o en una unidad de cuidados intensivos ("admisión") o puede ser dado de alta ("descarte"). En la mayoría de los casos, el sujeto se presenta en el servicio de urgencias. El procedimiento se basa en la determinación de sCD14-ST en una muestra de dicho sujeto. Por lo tanto se proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto necesita ser hospitalizado debido a una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis.

40 Se requiere generalmente la hospitalización de un sujeto si la cantidad de sCD14-ST es de entre 260 pg/ml y 4000 pg/ml, más preferentemente entre 276 pg/ml y 3000 pg/ml, más preferentemente entre 295 pg/ml y 2000 pg/ml, más preferentemente entre 340 pg/ml y 4000 pg/ml, más preferentemente entre 354 pg/ml y 3000 pg/ml, aún más preferentemente entre 455 pg/ml y 2000 pg/ml.

**Ejemplo 1**

45 Los presentes inventores demuestran que el uso de sCD14-ST mejora la detección de sujetos con riesgo elevado de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular, el diagnóstico del síndrome coronario agudo (SCA), el infarto agudo de miocardio (IM) y la insuficiencia cardíaca aguda (ICA), así como la toma de decisiones en la sala de urgencias y la gestión global de los pacientes que acuden a los servicios de urgencias, mediante la evaluación de la potencia diagnóstica y pronóstica de sCD14-ST y el examen prospectivo del impacto clínico de la decisión que se tome, guiada por la concentración de sCD14-ST con respecto al alta, ingreso en el hospital, tratamiento de cuidados intensivos, prevención, y medidas terapéuticas en enfermedades o afecciones cardiovasculares.

50 Se midió sCD14-ST en muestras obtenidas de un grupo de control de individuos sanos y de pacientes con diferentes enfermedades cardíacas:

- Insuficiencia cardíaca crónica (IC), n = 40
- Angina de pecho (AP) y angina de pecho inestable (API), n = 17
- Infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (IMSEST), n = 29

- Insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD), n = 60
- Grupo de control, n = 119

Los niveles medidos de sCD14-ST difieren de una manera muy significativa entre los controles sanos y los pacientes con enfermedades cardiovasculares, así como entre los diferentes grupos de pacientes (Fig. 1)

5 Se determinó sCD14-ST usando el ensayo para presepsina PATHFAST (Mitsubishi Chemical Medience)

### Ejemplo 2

#### Intervalo de referencia

10 Se usó un grupo de control sano (población de referencia) que incluía 60 hombres y 59 mujeres (con edades entre 21 y 69 años, media de edad de 42 años) que cumplían los siguientes criterios: se excluyeron enfermedades crónicas e ingesta de medicamentos mediante un cuestionario; el examen físico, la evaluación de la presión arterial, los registros de ECG y las pruebas de tolerancia a la glucosa por vía oral no proporcionaron hallazgos patológicos; Las concentraciones plasmáticas de péptido natriurético de tipo pro-B N-terminal fueron  $\leq 125$  pg/ml; las concentraciones de HET, creatinina y HbA1c fueron normales; se excluyeron enfermedades cardiovasculares mediante obtención de imágenes por resonancia magnética cardíaca, incluyendo una prueba de esfuerzo con dobutamina.

15 Las concentraciones de sCD14-ST se determinaron en muestras de plasma con EDTA del grupo de control usando el ensayo PATHFAST. El límite superior de referencia del percentil 99° (LSR) de acuerdo con la directriz C28-A3 del instituto de normas clínicas y de laboratorio (INCL) fue 258 (IC al 90 %: 237 - 276) pg/ml. Los resultados se muestran en la tabla 1.

20 Tabla 1: concentración de sCD14-ST de la población de referencia sana (N=119):

Media	151 (IC al 95 %: 141 - 159) pg/ml
Mediana	143 (IC al 95 %: (133 - 50)
Min	60 pg/ml
Máx	311 pg/ml
IQR	115-174 pg/ml
Límite de referencia superior del 99 % (LRS)*	258 (IC al 90%: 237 - 276) pg/ml
*) Procedimiento robusto C28-A3 de INLC	

### Ejemplo 3

#### Niveles de sCD14-ST en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (ICC)

25 Se midieron las concentraciones de sCD14-ST en muestras de plasma EDTA obtenidas de 40 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (Clasificación I - III de la New York Health Association (NYHA)).

Tabla 2: concentraciones de sCD14-ST (pg/ml) en pacientes con ICC en comparación con el grupo de control

	Grupo de control	ICC, NYHY I-III
<b>Tamaño de la muestra</b>	119	40
<b>Valor mínimo</b>	60	83
<b>Valor máximo</b>	311	533
	Grupo de control	ICC, NYHY I-III
<b>Mediana</b>	143	168
<b>IC al 95 % para la mediana</b>	133 a 150	156 a 191
<b>Rango intercuartil</b>	115 a 174	144 a 259

**Prueba de Mann-Whitney (muestras independientes)**

<b>Clasificación media del primer grupo</b>	68,9554
<b>Clasificación media del segundo grupo</b>	97,625
<b>U Mann-Whitney</b>	1395
<b>Estadística prueba Z (corregida para restricciones)</b>	3,536
<b>Probabilidad bilateral</b>	<b>P = 0,0004</b>

5 Los valores de sCD14-ST fueron significativamente elevados ( $p=0,0004$ ) en pacientes con ICC en comparación con el grupo de control (Tabla 2). El análisis de ROC (véase la tabla 3) reveló una ABC de 0,689 (Sensibilidad = 70 %, VAN = 86 %; Especificidad = 64 %, VPP = 41,2 %) que muestra la capacidad discriminadora de sCD14-ST entre los controles sanos y pacientes con ICC (véase la fig. 2). Este efecto puede deberse al proceso inflamatorio subyacente implicado en la patogénesis de las enfermedades cardíacas.

Tabla 3: Resultados del análisis de ROC para la discriminación entre controles y pacientes con ICC

	sCD14-ST variable	
Variable de clasificación	ICC	
Tamaño de la muestra		152
Grupo positivo	ICC=1	40
Grupo negativo:	ICC=0	119
Prevalencia de la enfermedad (%)	26,3	
Área bajo la curva (ABC) de ROC	0,689	
Error estándar <sup>a</sup>	0,0484	
Intervalo de confianza al 95 % <sup>b</sup>	0,609 a 0,761	
Estadístico Z	3,894	
Nivel de significación P (área= 0,5)	0,0001	
Índice J de Youden	0,3429	
Criterio asociado	>154	

**Ejemplo 4****Niveles de sCD14-ST en pacientes con angina de pecho inestable (API)**

10 Los valores sCD14-ST se midieron en pacientes que presentan angina de pecho inestable en la sala de emergencias (Tabla 4). La diferencia de los valores correspondientes del grupo de control sano reveló una alta significación ( $p < 0,0001$ ), que fue superior a la de troponina I cardíaca (cTnl; (véase la Fig.3).

Tabla 4: sCD14-ST en pacientes con angina de pecho inestable (API, n=17):

Media	475 (IC al 95 %: 380 - 570) pg/ml
Mediana	452 (IC al 95 %: 333 - 602)
Min	223 pg/ml
Máx	928 pg/ml
Percentil 25°	324 (IC al 95 %: 250 - 447) pg/ml
Percentil 75°	604 (IC al 95 %: 460 - 780) pg/ml

En paralelo, se midieron las concentraciones de cTnI usando el ensayo PATHFAST cTnI. Sorprendentemente, sCD14-ST mostró una mayor capacidad discriminadora entre el grupo de control sano y los pacientes con API en comparación con cTnI. Este hallazgo podría confirmarse mediante el análisis de ROC (Fig. 4) que revela una ABC significativamente mayor para sCD14-ST (0,996 en comparación con 0,681,  $p=0,0001$ ).

5 Los resultados explican el hallazgo de que elevadas concentraciones de sCD14-ST reflejan el proceso inflamatorio en la patogénesis de enfermedades ateroscleróticas y cardiovasculares, que podrían demostrarse por aumento de sCD14-ST en pacientes sin enfermedad cardiovascular aguda. Este hallazgo se podría evidenciar por la observación de que los valores de cTnI diferían menos significativamente entre los controles y los pacientes con API en comparación con sCD14-ST. En resumen, el aumento de concentración de sCD14-ST en pacientes sin enfermedades o afecciones agudas cardiovasculares tales como, por ejemplo, ICC o angina de pecho, refleja el efecto inflamatorio en la patogénesis de la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares.

**Ejemplo 5**

**Valores de sCD14-ST en pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST**

15 Se midieron concentraciones de sCD14-ST usando el ensayo PATHFAST en muestras de plasma de pacientes consecutivos ingresados en la sala de emergencias. La extracción de sangre se realizó inmediatamente después del ingreso. Se incluyeron 28 pacientes con infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (IMSEST).

Los resultados de las mediciones de sCD14-ST se interpretaron con respecto a los diagnósticos de alta en el alta del sujeto, que se establecieron de forma independiente durante la evolución clínica de los pacientes.

Tabla 5: sCD14-ST en pacientes con IMSEST (N=28):

Media	1001 (IC al 95 %: 640 - 1361) pg/ml
Mediana	721 (IC al 95 %: 600 - 904)
Min	295 pg/ml
Máx	4070 pg/ml
Percentil 25 °	495 (IC al 95 %: 377 - 656) pg/ml
Percentil 75 °	984 (IC al 95 %: 841 - 2434) pg/ml

20 Los valores medidos de sCD14-ST en muestras de plasma obtenidas al ingreso de pacientes con IMSEST en la sala de emergencias se muestran en la tabla 5.

La diferencia entre los controles sanos y pacientes con IMSEST fue altamente significativa ( $p < 0,0001$ ) (tabla 6). cTnI se determinó en paralelo. Aunque ambos marcadores diferían de forma muy significativa entre el grupo de control sano y los pacientes con IMSEST como se muestra en la fig. 5, la comparación de las curvas ABC obtenidas del análisis de ROC demostraron, que sCD14-ST reveló una mayor capacidad de discriminación (fig. 6).

La precisión de diagnóstico superior para el diagnóstico de IMSEST en pacientes con dolor torácico en la sala de emergencias se pudo confirmar mediante la inclusión del umbral derivado de ROC de sCD14-ST y el corte en el percentil 99° de PATHFAST cTnI (0,02 ng/m). Los resultados se muestran en la fig. 7, que demuestra una sensibilidad del 100 % de STsCD14 en el punto de corte de 290 pg/ml mientras que PATHFAST cTnI reveló una sensibilidad del 74,1 % usando el corte de la concentración en el percentil 99° recomendado por el fabricante, de una población de referencia sana de acuerdo con directrices internacionales. Las directrices recomiendan la determinación cTn de 3 a 6 horas después del ingreso si el valor medido de cTn inicial está por debajo del punto de corte y la detección de un aumento y/o una reducción con al menos 1 valor por encima del corte en el percentil 99°.

Tabla 6: Valores de sCD14-ST del grupo de control sano y pacientes con IMSEST

	<b>Grupo de control</b>	<b>IMSEST</b>
Tamaño de la muestra	112	28
Valor mínimo	60,1	295
Valor máximo	311	4070
Mediana	142,5	720,5
IC al 95 % para la mediana	133 a 150	600 a 904
Rango intercuartil	115 a 174	495 a 985

**Prueba de Mann-Whitney (muestras independientes)**

<b>Clasificación media del primer grupo</b>	56,5134
<b>Clasificación media del segundo grupo</b>	126,4464
<b>U Mann-Whitney</b>	1,5
Estadístico de prueba Z	8,161
<b>Probabilidad bilateral</b>	<b>P &lt; 0,0001</b>

**Ejemplo 6**

**Diagnóstico de insuficiencia cardíaca aguda**

5 Se determinaron concentraciones de sCD14-ST usando el ensayo PATHFAST en muestras de plasma, obtenidas de 60 pacientes ingresados en la sala de urgencias con disnea aguda en los que se evaluó la insuficiencia cardíaca aguda por valores de NT-proBNP elevados que excedían a la concentración umbral de 300 pg/ml. Todos los pacientes revelaron niveles plasmáticos de NT-proBNP  $\geq$  361 pg/ml que confirmaron el diagnóstico de insuficiencia cardíaca aguda (Tabla 7).

Tabla 7: valores de sCD14-ST y NT-proBNP (pg/ml) en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda (n=60)

	<b>NT-proBNP</b>	<b>sCD14-ST</b>
<b>Valor mínimo</b>	<b>361</b>	<b>345</b>
<b>Valor máximo</b>	<b>27287</b>	<b>2633</b>
<b>Mediana</b>	<b>57746</b>	<b>1004</b>
<b>IC al 95 % para la mediana</b>	<b>3821 a 6389</b>	<b>789 a 1221</b>
<b>Rango intercuartil</b>	<b>2207 a 8488</b>	<b>704 a 1498</b>

10 Los resultados del análisis de ROC mostraron que la "admisión" y el "descarte" de la insuficiencia cardíaca aguda fue posible con una sensibilidad y una especificidad de 100 %, respectivamente, en un umbral de sCD14-ST de 311 pg/ml para la discriminación entre el grupo de control sano y los pacientes con ICAD (fig. 8). Para la discriminación entre pacientes con ICC y pacientes con insuficiencia cardíaca aguda, el análisis de ROC reveló una sensibilidad del 98,3 % y una especificidad del 95,0 % en un umbral para sCD14-ST de 354 pg/ml y una ABC de 0,993 (fig. 9)

15 Estos resultados demuestran que la "admisión" y "descarte" de la insuficiencia cardíaca aguda en pacientes que presentan disnea aguda en la sala de emergencias es claramente posible usando la concentración plasmática de sCD14-ST (fig.10).

**Ejemplo 7**

**Predicción de riesgo de mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda**

20 Se incluyeron en el estudio a 60 pacientes ingresados en la sala de emergencias con disnea aguda, en los que la insuficiencia cardíaca aguda se evaluó por valores de NT-proBNP que excedían la concentración umbral de 300 pg/ml (Chen AA, y col., NT-proBNP levels, echocardiographic findings, and outcomes in breathless were patients: results from the ProBNP Investigating of Dyspnea in the Emergency Room (PRIDE) echocardiographic substudy. Euer Heart J 2006;27:839-845). 25 pacientes murieron durante el seguimiento de 2 años.

25 Tabla 8: valores de sCD14-ST en supervivientes y no supervivientes

	<b>Supervivientes</b>	<b>No supervivientes</b>
<b>Tamaño de la muestra</b>	35	25
<b>Valor mínimo</b>	345	414
<b>Valor máximo</b>	2284	2633
<b>Mediana</b>	763	1379
<b>IC al 95 % para la mediana</b>	679 a 954	1105 a 1671
<b>Rango intercuartil</b>	601 a 1144	1048 a 1725

**Prueba de Mann-Whitney (muestras independientes)**

<b>Clasificación media del primer grupo</b>	23,0286
<b>Clasificación media del segundo grupo</b>	40,1667
<b>U Mann-Whitney</b>	176
<b>Estadística prueba Z (corregida para restricciones)</b>	3,765
<b>Probabilidad bilateral</b>	<b>P = 0,0002</b>

Mientras que sCD14-ST difirió de manera altamente significativa entre supervivientes y no supervivientes, los valores de NT-proBNP no mostraron diferencias significativas entre los grupos.

- 5 Los resultados de los análisis de ROC para la comparación de la predicción de resultados de sCD14-ST con 9 biomarcadores inflamatorios y cardiovasculares, que están ya establecidos en el diagnóstico de rutina o la investigación clínica, revelaron una validez de pronóstico superior del sCD14-ST en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda (fig.13).

**Ejemplo 8**

10 **Predicción de riesgo de mortalidad en pacientes después de cirugía cardíaca electiva**

La concentración de sCD14-ST y NT-proBNP se midió en muestras de plasma EDTA obtenidas en el primer día pos operatorio de 49 pacientes sometidos a cirugía cardíaca electiva. 24 pacientes murieron durante el seguimiento de 2 años.

Tabla 9: valores de sCD14-ST en supervivientes y no supervivientes

	Supervivientes	No supervivientes
Tamaño de la muestra	25	24
Valor mínimo	103	401
Valor máximo	1926	7438
Mediana	248	1230
IC al 95 % para la mediana	190 a 305	936 a 1879
Rango intercuartil	180 a 308	832 a 2024

15

**Prueba de Mann-Whitney (muestras independientes)**

<b>Clasificación media del primer grupo</b>	14,0
<b>Clasificación media del segundo grupo</b>	36,4
<b>U Mann-Whitney</b>	26,0
<b>Estadística prueba Z (corregida para restricciones)</b>	5,5
<b>Probabilidad bilateral</b>	<b>P&lt;0,0001</b>

**NT-proBNP:**

<b>Clasificación media del primer grupo</b>	15,5
<b>Clasificación media del segundo grupo</b>	34,9
<b>U Mann-Whitney</b>	63,0
<b>Estadístico de prueba Z para una muestra grande</b>	4,7
<b>Probabilidad bilateral</b>	<b>P &lt; 0,0001</b>

20

sCD14-ST y NT-proBNP difirieron muy significativamente entre supervivientes y no supervivientes, pero NT-proBNP sólo mostró una diferencia menor entre los grupos (fig.14).

5 Los resultados de los análisis de ROC para la comparación de sCD14-ST (ABC=0,957, corte en 371 pg/ml, sensibilidad del 100 %, especificidad = 92,0 %) con NT-proBNP (ABC = 0,895, corte = 4249 pg/ml, sensibilidad del 87,5%, especificidad de 84,0 %) para la predicción de resultados, reveló una validez de pronóstico superior de sCD14-ST en pacientes sometidos a cirugía cardíaca electiva (fig. 15 y 16).

**Ejemplo 9**

**Diferenciación entre dolor torácico cardíaco y no cardíaco en el ingreso**

**Objetivos y procedimientos**

10 Se incluyeron en el estudio 30 pacientes con dolor torácico sospechoso de infarto agudo de miocardio (IAM) ingresados en la sala de urgencias. La troponina fue inicialmente negativa. se excluyeron el IAM, el síndrome coronario agudo (SCA) o la angina de pecho inestable (API) mediante procedimientos de diagnóstico estándar de acuerdo con las directrices actuales, incluyendo la medición de troponina en serie, electrocardiograma (ECG) y asistencia adicional para confirmar el origen no cardíaco de los síntomas iniciales del dolor torácico. Se determinó sCD14-ST en el momento del ingreso y se comparó con los valores de sCD14-ST medidos en el momento del ingreso en un grupo de 15 17 pacientes con dolor torácico cardíaco pero sin IAM en los que se estableció el diagnóstico API definitiva.

**Resultados**

20 El grupo de pacientes con API e inicialmente con dolor torácico cardíaco, mostró valores de sCD14-ST significativamente superiores en comparación con el grupo de pacientes con dolor torácico no cardíaco (p<0,0001; tabla 9, fig.17).

Tabla 9: concentración de sCD14-ST en pacientes con dolor torácico cardíaco y no cardíaco en el ingreso a la sala de emergencias

Muestra 1		
Variable	sCD14-ST	
Seleccionar	API	
Muestra 2		
Variable	sCD14-ST	
Seleccionar	Dolor torácico no cardíaco	
	<b>API</b>	<b>Dolor torácico no cardíaco</b>
Tamaño de la muestra	<b>17</b>	<b>30</b>
Valor mínimo	<b>223</b>	<b>69</b>
	<b>API</b>	<b>Dolor torácico no cardíaco</b>
Valor máximo	<b>928</b>	<b>381</b>
Mediana	<b>452</b>	<b>125</b>
IC al 95 % para la mediana	<b>333 a 602</b>	<b>110 a 142</b>
Rango intercuartil	<b>324 a 604</b>	<b>105 a 144</b>
<b>Prueba de Mann-Whitney (muestras independientes)</b>		
Clasificación media del primer grupo	33,5294	
Clasificación media del segundo grupo	13,3200	
U Mann-Whitney	8,00	
Estadística prueba Z (corregida para restricciones)	5,240	
Probabilidad bilateral	<b>P &lt; 0,0001</b>	

El análisis de característica operativa del receptor (ROC) para la discriminación entre dolor cardíaco y no cardíaco reveló un valor de ABC de 0,981 con una sensibilidad correspondiente del 94,1 % y una especificidad del 96,0 % (véase la fig.18).

**Conclusión**

5 Los resultados del análisis de ROC demostraron una alta capacidad discriminatoria de sCD14-ST para la discriminación entre dolor torácico cardíaco y no cardíaco. El valor de corte derivado de ROC fue de 255 pg/ml y acordes a los otros umbrales de sCD14-ST, establecidos en el diagnóstico de enfermedades cardíacas.

10 Los resultados muestran que los pacientes con dolor torácico con valores de sCD14-ST por debajo del valor de corte de 255 pg/ml, podrían asignarse a pacientes con dolor torácico no cardíaco y ser dados de alta de la sala de emergencias sin otro procedimiento de diagnóstico, por ejemplo, medición seriada de la troponina, ECG u otros cuidados.

**Ejemplo 10**

**CD40s y sCD14-ST como marcadores cardíacos para la predicción del riesgo de mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda (ICA)**

15 **Procedimientos**

Se midieron las concentraciones basales de sCD14 y sCD14-ST en muestras de plasma obtenidas de 35 pacientes (de 32 a 89 años, mediana de 67 años; 13 mujeres, 22 hombres) que se presentaron en el servicio de urgencias. El diagnóstico de insuficiencia cardíaca aguda (ICA) se confirmó mediante la determinación de NT-proBNP usando un valor de corte NT-proBNP de 300 ng/l de acuerdo con el estudio PRIDE (Januzzi J y col.: The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. Am J Cardiol 2005; 95: 948-54). La medida resultante fue la mortalidad dentro de 28 días. Se midió sCD14 usando el inmuno ensayo Quantikine Human sCD14 (R&D Systems Inc. Minneápolis, MN, EE.UU.). Se determinó sCD14-ST usando el ensayo para presepsina PATHFAST (Mitsubishi Chemical Medience). El NT-proBNP se midió usando el ensayo ELECSYS pro BNP (Roche Diagnostics).

25 **Resultados**

Las concentraciones basales del grupo de estudio oscilaron entre 17-2264 ng/l, mediana = 208 ng/l, 6677-26000 ng/l, mediana = 12800 ng/l, y 300-8893 ng/l, mediana de 952 ng/l para NT-proBNP, sCD14 y sCD14-ST, respectivamente. 5 pacientes revelaron valores de NT-proBNP por encima del nivel de corte de 300 ng/l confirmando el diagnóstico de ICA. Durante el seguimiento de 28 días, 5 pacientes del grupo de estudio total (14,3 %) y 3 pacientes del grupo de ICA (20,0 %) murieron. El área bajo las curvas (ABC) obtenidas del análisis de ROC para la discriminación entre supervivientes y no supervivientes del grupo de estudio total y del grupo de ICA se muestran en la tabla 10, y las curvas de ROC se muestran en la fig.19 (panel (A): grupo total de estudio; panel (B): grupo de ICA). Aunque se encontró que la concentración de sCD14 era aproximadamente 10 veces mayor en comparación con sCD14-ST, ambos marcadores mostraron suficiente correlación como lo demuestra la regresión de Bablok-Passing (fig. 20). Las ABC de ROC para sCD14, sCD14-ST y NT-proBNP mostraron una capacidad discriminatoria significativamente mayor entre supervivientes y no supervivientes del grupo de ICA que del grupo total de estudio (tabla 10, fig.19).

Tabla 10: Resultados del análisis de ROC

	Grupo total de estudio		Pacientes con ICA	
	ABC	IC al 95 %	ABC	IC al 95 %
BNP	0,6	0,44 - 0,78	0,8	0,53 - 0,96
sCD14	0,7	0,53 - 0,86	0,9	0,64 - 0,99
sCD14-ST	0,8	0,60 - 0,90	0,9	0,62 - 0,99

**Conclusión**

40 sCD14 y sCD14-ST revelaron resultados superiores del análisis de ROC para el riesgo de predicción de la mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda, en comparación con el ya establecido marcador cardíaco NT-proBNP, demostrando que sCD14 y sCD14-ST podrían usarse como marcadores cardíacos.

**Ejemplo 11**

**Enfoque multi-marcador para la estratificación de riesgo de pacientes con insuficiencia cardíaca aguda (ICA)**

Este estudio demuestra el valor de diagnóstico y pronóstico adicional de la evaluación simultánea de sCD14-ST en combinación con marcadores adicionales. En pacientes con insuficiencia cardíaca aguda, sCD14-ST se evaluó en combinación por pares con: -

- un marcador de la familia de receptores de interleucina-1 (ST2 - Las concentraciones plasmáticas de ST2 están aumentadas en enfermedades inflamatorias y en enfermedades cardíacas, especialmente en la insuficiencia cardíaca aguda),
- un marcador neurohormonal (NT-proBNP),
- un marcador cardíaco isquémico (cTnT de alta sensibilidad, es decir, hsTnT) o
- un marcador inflamatorio (CRP).

**Procedimientos:** Se midieron las concentraciones basales de marcadores en muestras de plasma obtenidas de 60 pacientes (de 50 a 90 años, mediana de 77 años; 26 mujeres, 34 hombres) con insuficiencia cardíaca aguda que se presentaron en el servicio de urgencias. Se excluyeron los pacientes con infarto de miocardio o septicemia. La medida de resultado fue la mortalidad a los 2 años. Se midió ST2 usando el ensayo Presage ST2 (Critical Diagnostics, San Diego, CA, EE.UU.). Se determinó sCD14-ST usando el ensayo para presepsina PATHFAST (Mitsubishi Chemical Medience). Se midieron el péptido natriurético pro B amino-terminal (NT-proBNP), la troponina T cardíaca de alta sensibilidad (TnThsc) y la proteína C-reactiva (CRP) mediante las pruebas ELECSYS (Roche Diagnostics).

**Resultados:** Las concentraciones basales de NT-proBNP del grupo de estudio oscilaron entre 361-27287 ng/l, mediana (IQR) = 5773 (2207-8488) ng/l confirmando el diagnóstico de insuficiencia cardíaca aguda. Durante el período de seguimiento de 2 años, murieron 25 pacientes (41,7 %). Los resultados de la prueba de muestra independiente de Mann-Whitney y el análisis de ROC para la discriminación entre supervivientes y no supervivientes se resumen en la tabla 11.

La tabla 12 contiene los resultados del análisis de ROC y la reclasificación neta para la combinación de los marcadores ST2, CRP, hsTnT y NT-proBNP con sCD14-ST. La evaluación simultánea de las combinaciones de marcadores aumentó la validez de pronóstico como se muestra por el aumento de los valores de ABC y el índice de reclasificación neta.

Tabla 11: criterios de validez de pronóstico para la predicción de la mortalidad en ICA

	Supervivientes, n=35 Mediana (IQR)	No supervivientes, n=25 Mediana (IQR)	Valor p	ABC (análisis de ROC)
sCD14-ST, ng/l	763(601-1144)	1414(1069-1712)	0,0001	0,794
ST2, µg/l	57(34-83)	79(56-99)	0,0351	0,661
CRP, g/l	13(3,8-25,3)	25,6(8,2-62,5)	0,0704	0,640
TnThsc, µg/l	21(12-33)	31(20-47)	0,0280	0,646
NT-proBNP, ng/l	5453(1901-6919)	6161(3518-9664)	0,1609	0,607

Tabla 12: predicción del riesgo de mortalidad usando la combinación de marcadores con sCD14-ST

Marcador	ABC solo	Combinación de ABC	Diferencia de ABC	Reclasificación neta de % clasificado correcto
ST2	0,661	0,806	0,145	73,33
CRP	0,640	0,808	0,168	68,97
hscTnT	0,646	0,808	0,162	71,67
NT-proBNP	0,607	0,803	0,196	73,33

**Conclusión:** La evaluación simultánea de sCD14-ST y ST2, sCD14-ST y NT-proBNP, sCD14-ST y hsTnT o sCD14-ST y CRP en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda mejora el riesgo de predicción de mortalidad en comparación con la determinación de los marcadores solos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MITSUBISHI CHEMICAL MEDIENCE CORPORATION Spanuth, Eberhardt

5 <120> Uso de sCD14 o sus fragmentos o sus derivados para la estratificación, diagnóstico y pronóstico del riesgo

<130> 168857 m10

<150> EP 12199701.9

10 <151> 28-12-2012

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 356

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 1

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val  
1 5 10 15

Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys  
20 25 30

Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu  
35 40 45

Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala  
50 55 60

Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly Ala Ala  
65 70 75 80

Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala Leu Arg Val Leu Ala Tyr  
85 90 95

Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys Ile Thr Gly Thr  
100 105 110

Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser Ser Leu  
115 120 125

Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu Ala Glu  
130 135 140

Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln  
145 150 155 160

ES 2 623 879 T3

Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala  
 165 170 175

Leu Thr Ser Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu Arg Gly  
 180 185 190

Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu  
 195 200 205

Ala Leu Arg Asn Thr Gly Met Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala  
 210 215 220

Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser His Asn  
 225 230 235 240

Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met Trp Ser  
 245 250 255

Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val  
 260 265 270

Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn  
 275 280 285

Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn  
 290 295 300

Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro  
 305 310 315 320

His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser  
 325 330 335

Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Gly Ala  
 340 345 350

Arg Gly Phe Ala  
 355

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para evaluar el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis, que comprende las etapas de
  - 5 a) determinar la cantidad de sCD14-ST en una muestra de dicho sujeto,
  - b) comparar la cantidad determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
  - c) evaluar el riesgo individual del sujeto de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis basándose en el resultado obtenido en la etapa b).
2. Un procedimiento para diagnosticar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis en un sujeto, que comprende
  - 10 a) determinar la cantidad de sCD14-ST en una muestra de dicho sujeto,
  - b) comparar la cantidad determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
  - c) determinar la presencia o ausencia de la enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis basándose en el resultado obtenido en la etapa b).
3. Un procedimiento para evaluar el riesgo de mortalidad en un sujeto con una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis, que comprende
  - 15 a) determinar la cantidad de sCD14-ST en una muestra de dicho sujeto,
  - b) comparar la cantidad determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
  - c) determinar el riesgo de mortalidad del sujeto basándose en el resultado obtenido en la etapa b).
4. Un procedimiento para evaluar si un sujeto con una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis se beneficiará del tratamiento con una sustancia seleccionada del grupo que consiste en antibióticos, probióticos y lactulosa, que comprende las etapas de
  - 20 a) determinar la cantidad de sCD14-ST en una muestra de dicho sujeto,
  - b) comparar la cantidad determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
  - c) evaluar dicha probabilidad basándose en el resultado obtenido en la etapa b).
5. Un procedimiento para determinar si un sujeto necesita ser hospitalizado debido a una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis, comprendiendo el procedimiento
  - 25 a) determinar la cantidad de sCD14-ST en una muestra de dicho sujeto,
  - b) comparar la cantidad determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
  - c) determinar si el sujeto necesita ser hospitalizado por el resultado obtenido en la etapa b).
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de
  - 30 a') determinar en la misma muestra o una muestra diferente del mismo individuo al menos un marcador adicional,
  - b') comparar la cantidad de al menos un marcador adicional determinado en la etapa a') con al menos una cantidad de referencia de dicho marcador adicional, y
  - 35 c') llevar a cabo la etapa respectiva c) combinando el resultado obtenido para dicho sCD14-ST en la etapa b) y el resultado obtenido en la etapa b') para el al menos un marcador adicional.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos un marcador adicional se selecciona del grupo que consiste en marcadores neurohormonales, reguladores del equilibrio hídrico, marcadores cardíacos isquémicos, citocinas, marcadores inflamatorios y moléculas de adhesión celular, preferentemente en el que al menos un marcador adicional se selecciona del grupo que consiste en procalcitonina, proteína C-reactiva y marcadores de la superfamilia de citocinas del factor de crecimiento transformante  $\beta$  y/o el grupo que consiste en un marcador neurohormonal, un marcador cardíaco isquémico; un marcador inflamatorio y opcionalmente un marcador de la familia de receptores de la interleucina-1.
  - 40
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sujeto muestra síntomas de una o más enfermedades o afecciones cardiovasculares seleccionadas del grupo que consiste en síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica, cardiopatía isquémica, angina de pecho, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico, ataques isquémicos transitorios.
  - 45
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la enfermedad o afección cardiovascular es una cualquiera de:
  - 50 (i) insuficiencia cardíaca crónica, preferentemente en la que la cantidad de sCD14-ST es de 115 pg/ml o mayor, preferentemente de 150 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 260 pg/ml o mayor;
  - (ii) angina de pecho, preferentemente en la que la cantidad de sCD14-ST es de 214 pg/ml o mayor, preferentemente de 216 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 222 pg/ml o mayor;

(iii) insuficiencia cardíaca aguda, preferentemente en la que la cantidad de sCD14-ST es de 295 pg/ml o mayor, preferentemente de 354 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 455 pg/ml o mayor;

(iv) infarto de miocardio, preferentemente en la que la cantidad de sCD14-ST es de 260 pg/ml o mayor, más preferentemente 276 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 295 pg/ml o mayor,

5 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el procedimiento es para identificar un sujeto que tiene una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis que tiene un elevado riesgo de mortalidad, en el que la cantidad de sCD14-ST es preferentemente 500 pg / ml o mayor, preferentemente de 800 pg/ml o mayor, aún más preferentemente de 1300 pg/ml.

10 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el procedimiento es para evaluar el riesgo de un sujeto libre de signos clínicos de enfermedades o afecciones cardiovasculares o aterosclerosis de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis.

12. Uso de sCD14-ST *in vitro*, como marcador de enfermedades o afecciones cardiovasculares o aterosclerosis.

15 13. Una sustancia seleccionada del grupo que consiste en antibióticos, probióticos y lactulosa para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene (i) una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis y (ii) un aumento del nivel plasmático de sCD14-ST.

14. Una sustancia para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el aumento del nivel de plasma es de 345 pg/ml o mayor, preferentemente de 800 pg/ml o mayor, más preferentemente de 1300 pg/ml o mayor.

15. Uso de un kit en un procedimiento *in vitro* de

- 20 - diagnóstico de una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis en un sujeto,
- evaluación del riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis,
- evaluación de un riesgo de mortalidad en un sujeto con una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis,
- 25 - evaluación de la probabilidad de que un sujeto con una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis se beneficie del tratamiento con una sustancia seleccionada del grupo que consiste en antibióticos, probióticos y lactulosa y/o
- evaluación de si un sujeto necesita ser hospitalizado debido a una enfermedad o afección cardiovascular o aterosclerosis,

comprendiendo dicho kit

- 30 a) medios para determinar la cantidad de sCD14-ST, en una muestra de un sujeto;
- b) instrucciones para el diagnóstico y/o evaluación del riesgo basándose en la cantidad determinada por a); y opcionalmente,
- c) medios para determinar la cantidad de al menos un marcador adicional e instrucciones para el diagnóstico y/o la evaluación del riesgo basándose en la cantidad determinada de dicho al menos un marcador adicional.

35 16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho riesgo de mortalidad es el riesgo de mortalidad después de la cirugía cardíaca o después de que el sujeto haya sido sometido a cirugía cardíaca.

17. Uso de sCD14-ST *in vitro*, como marcador para evaluar el riesgo de mortalidad en un sujeto después de la cirugía cardíaca.

18. Un procedimiento para diferenciar entre dolor torácico cardíaco y no cardíaco en un sujeto que presenta dolor torácico, que comprende las etapas de

- 40 a) determinar la cantidad de sCD14-ST en una muestra de dicho sujeto,
- b) comparar la cantidad determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia y
- c) determinar la presencia o ausencia de dolor torácico cardíaco basándose en el resultado obtenido en la etapa (b).

19. Uso de sCD14-ST *in vitro*, como marcador para diferenciar entre dolor torácico cardíaco y no cardíaco.

45

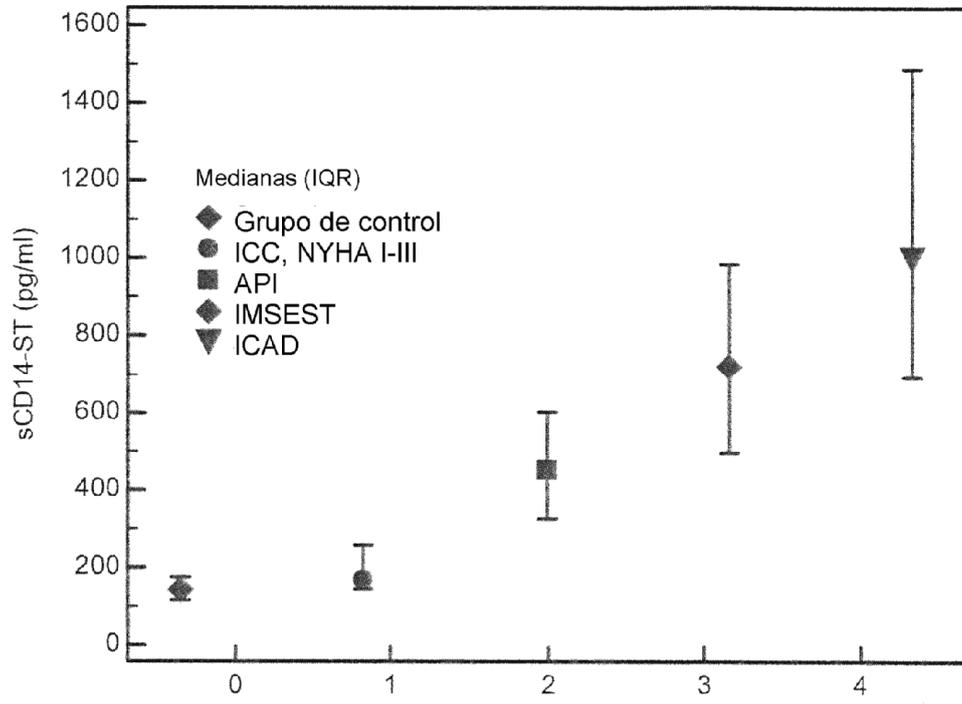


Fig. 1

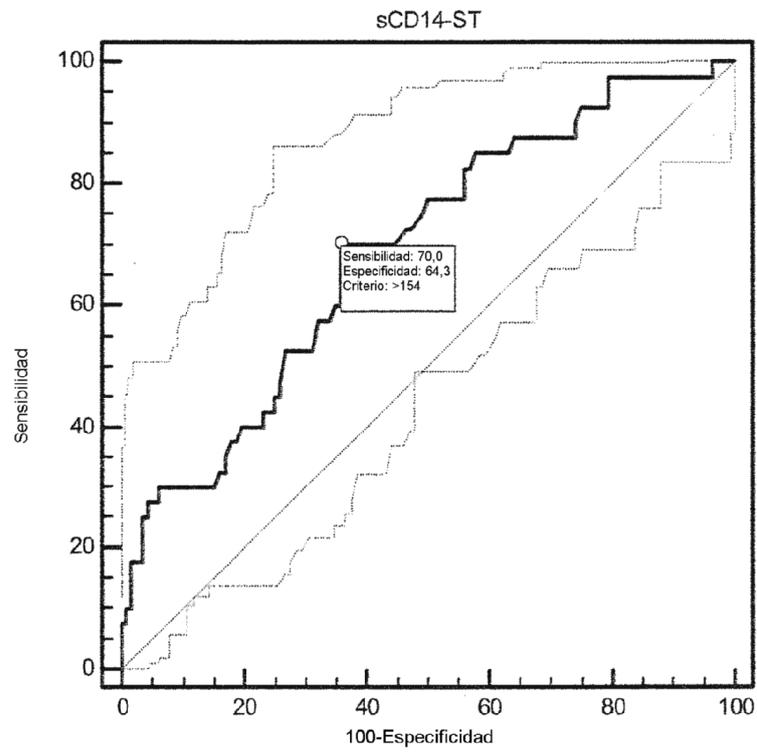


Fig. 2

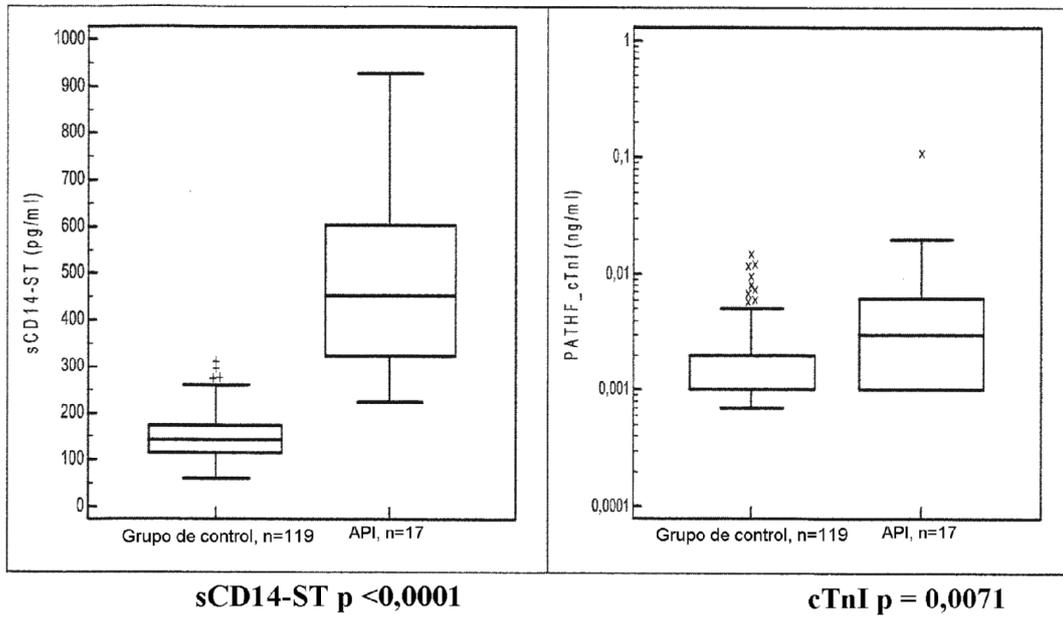


Fig. 3

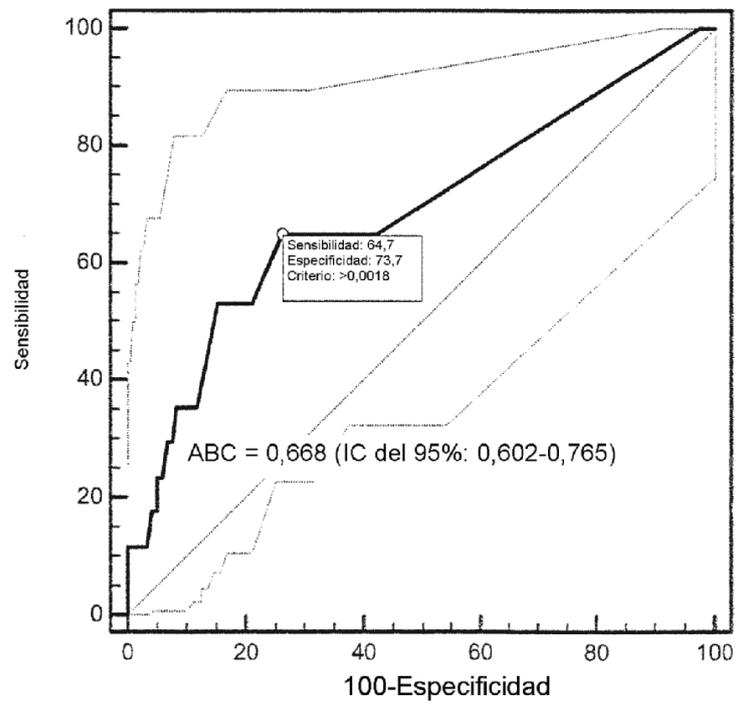
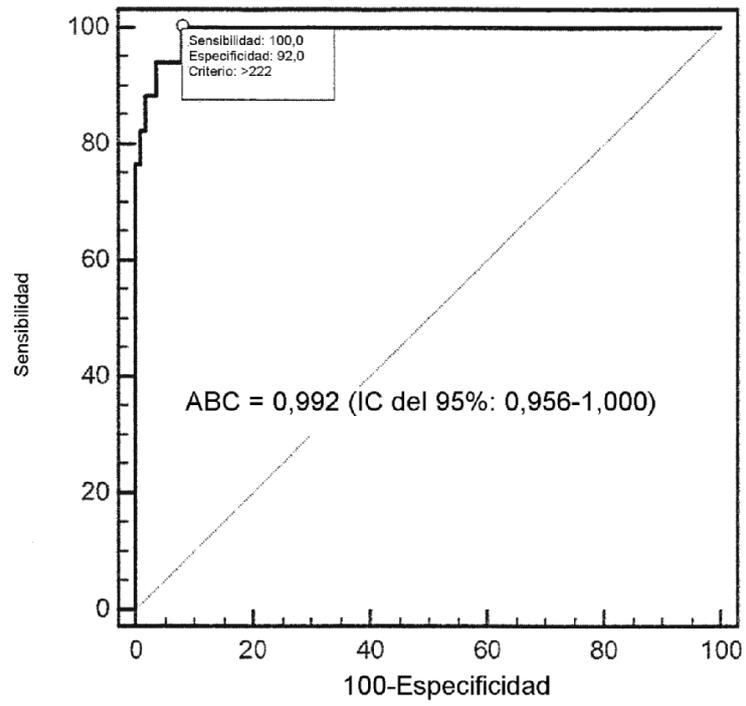


Fig .4

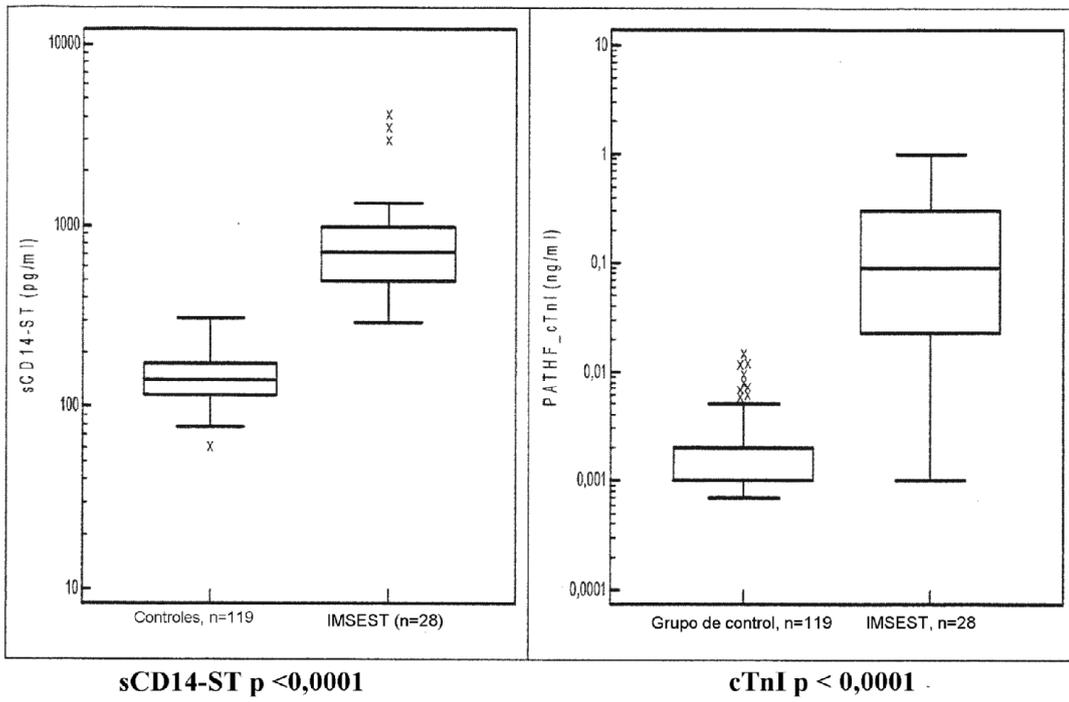


Fig. 5

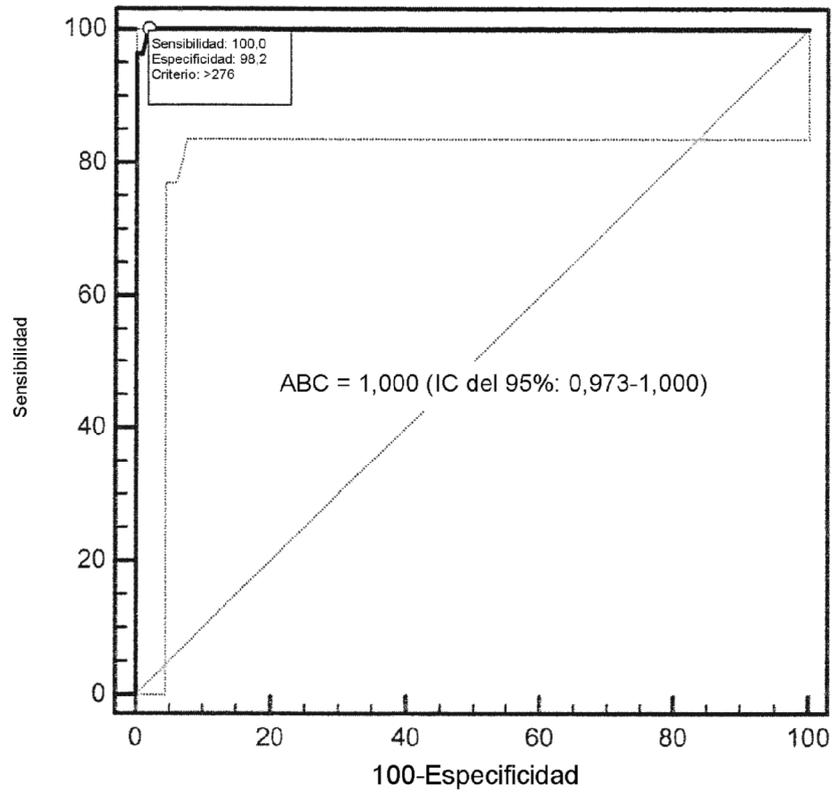


Fig. 6

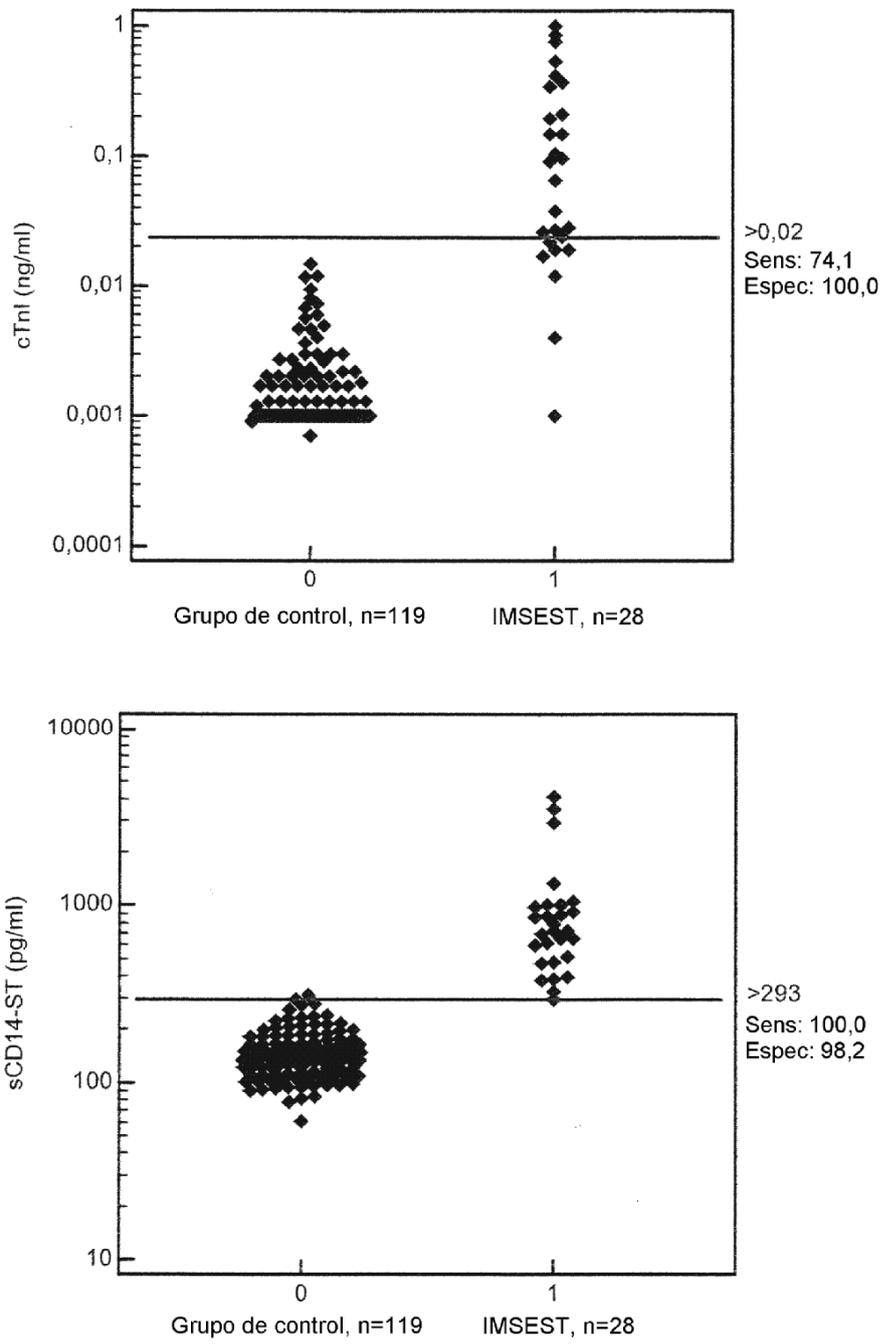


Fig. 7

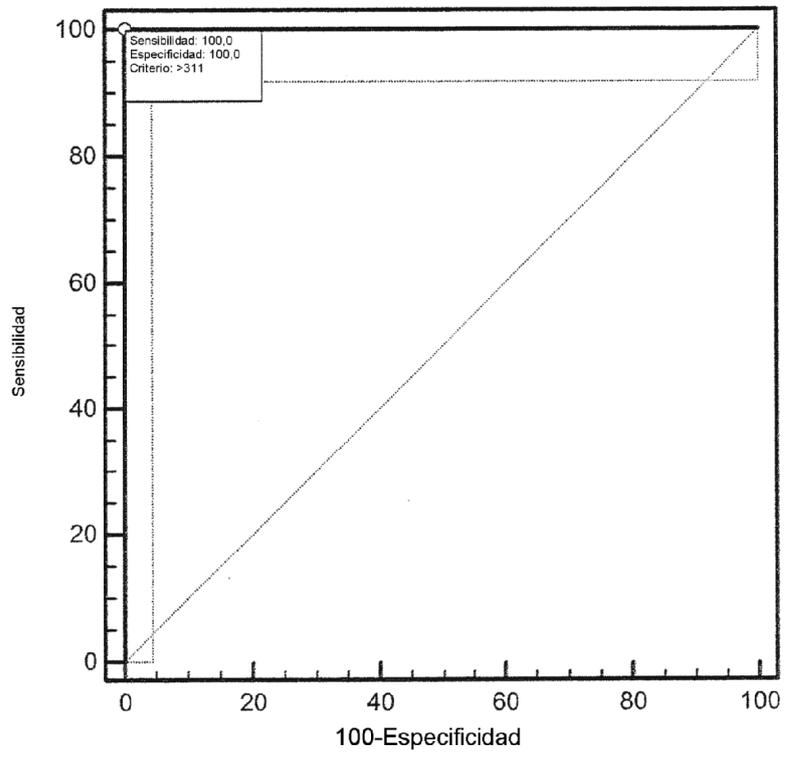


Fig. 8

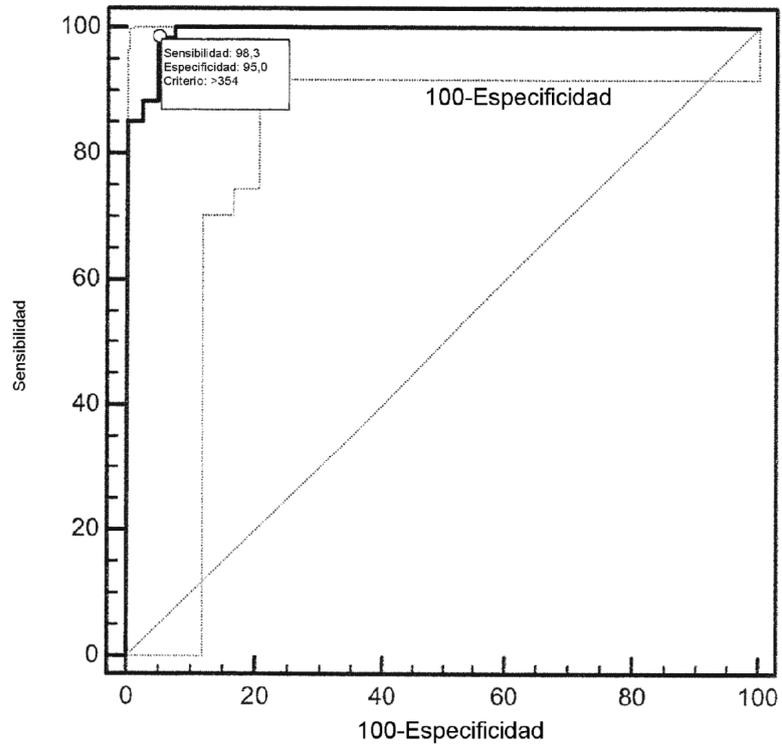


Fig. 9

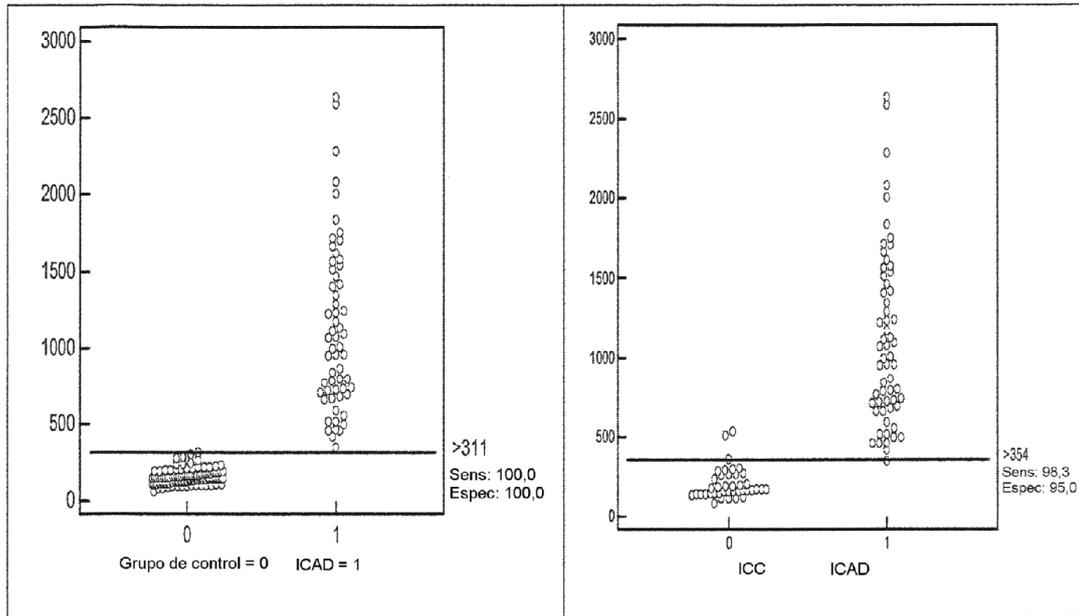


Fig. 10

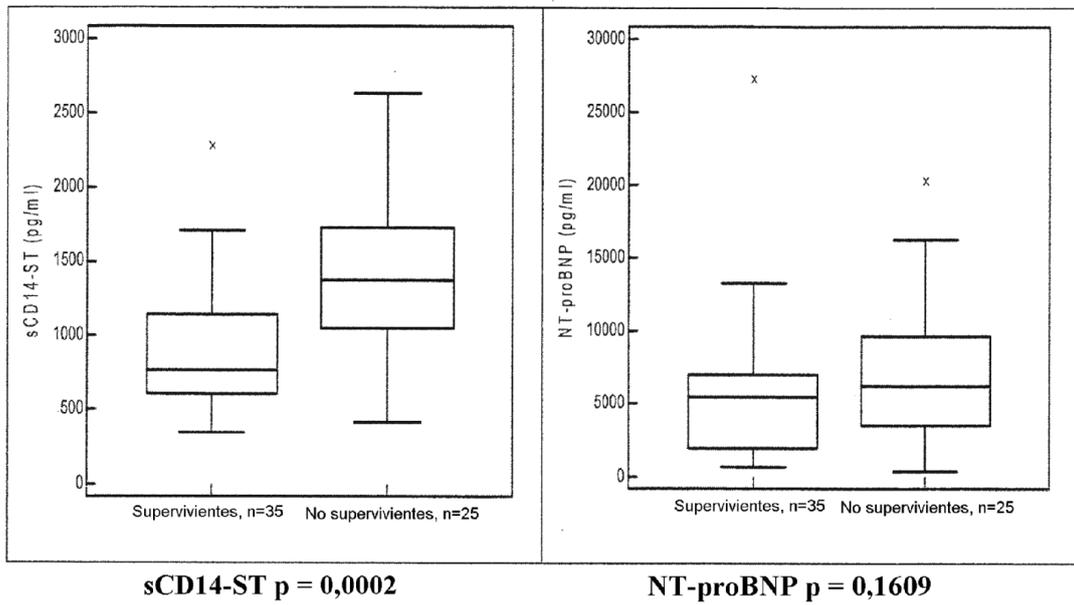


Fig. 11

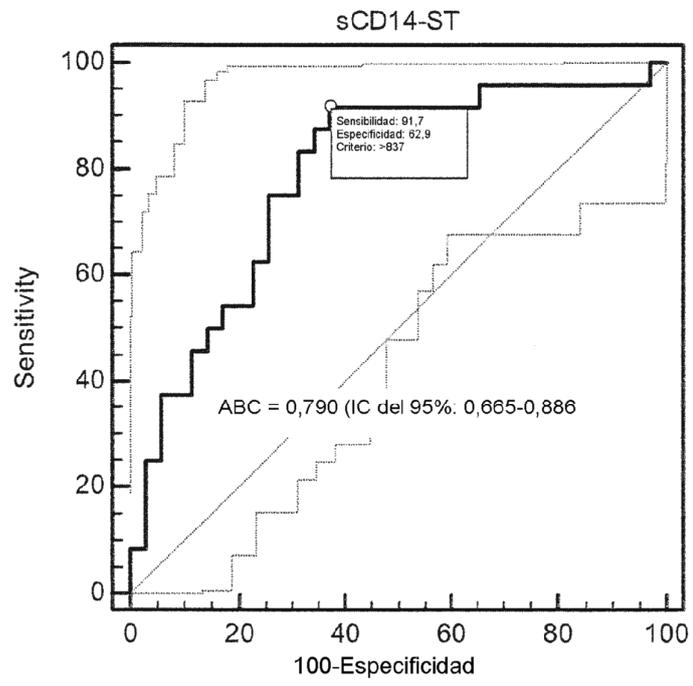


Fig. 12

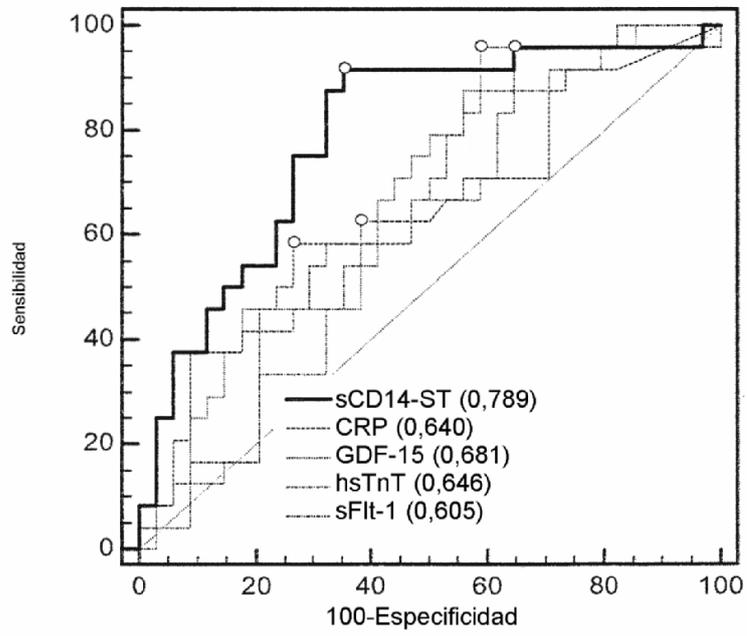
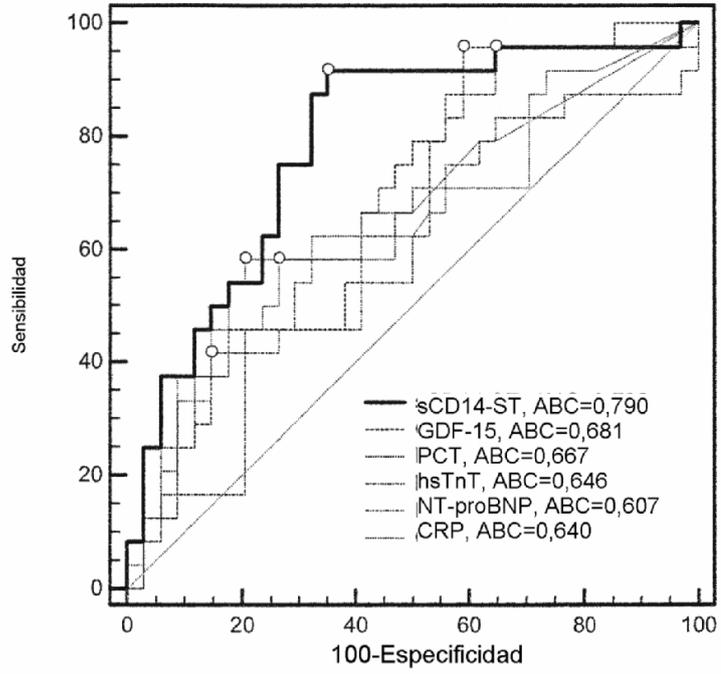


Fig. 13

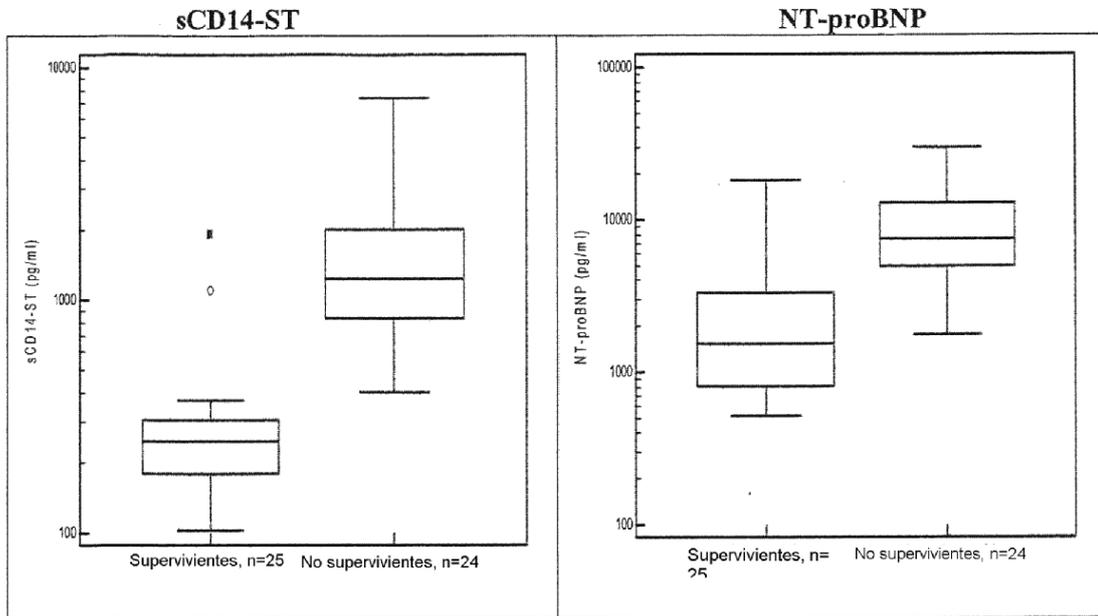


Fig. 14

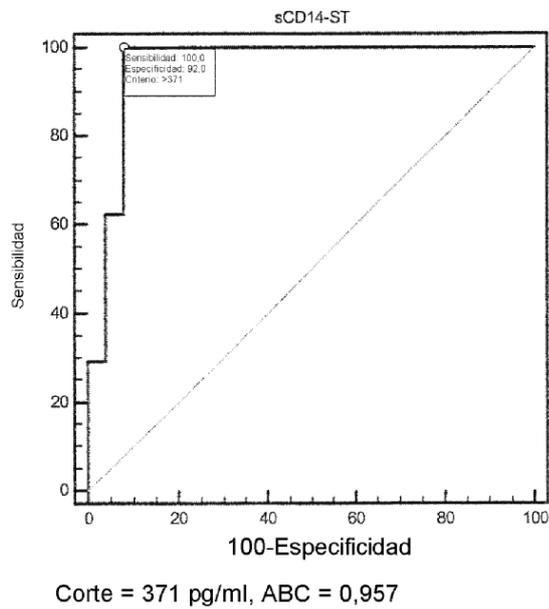


Fig. 15

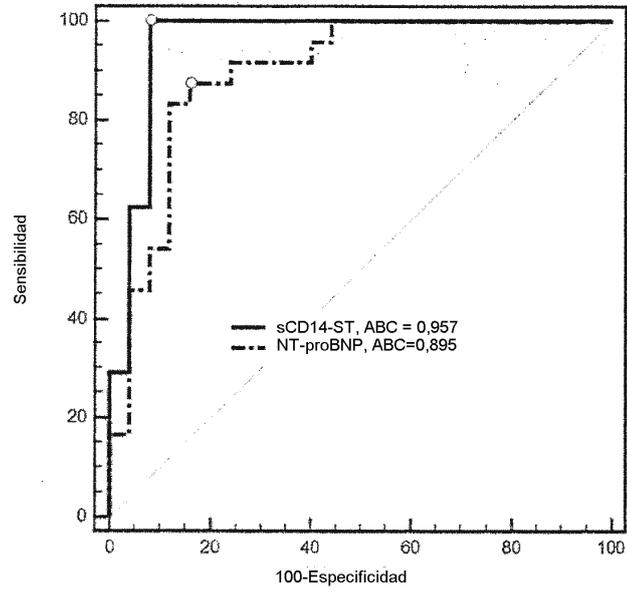


Fig. 16

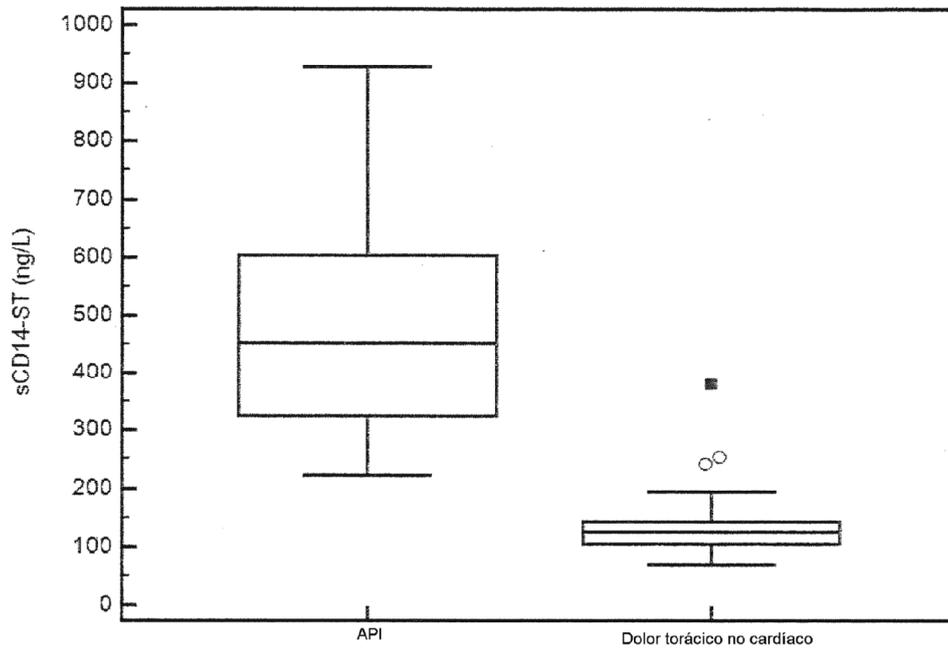


Fig. 17

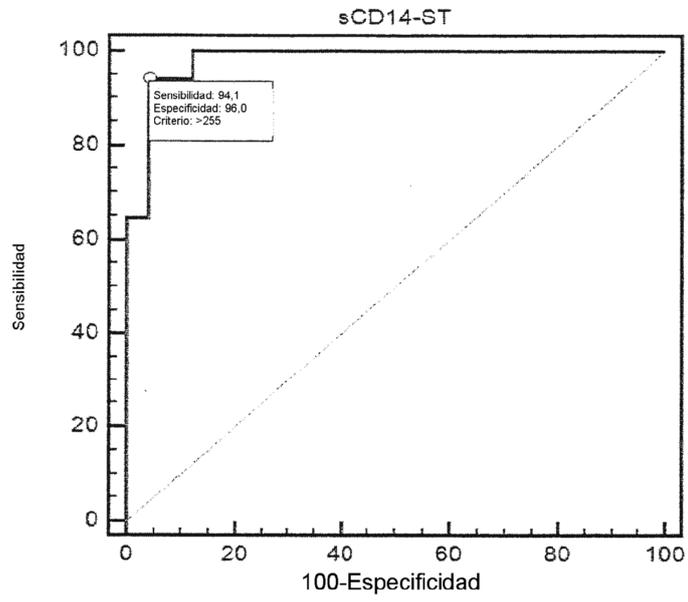
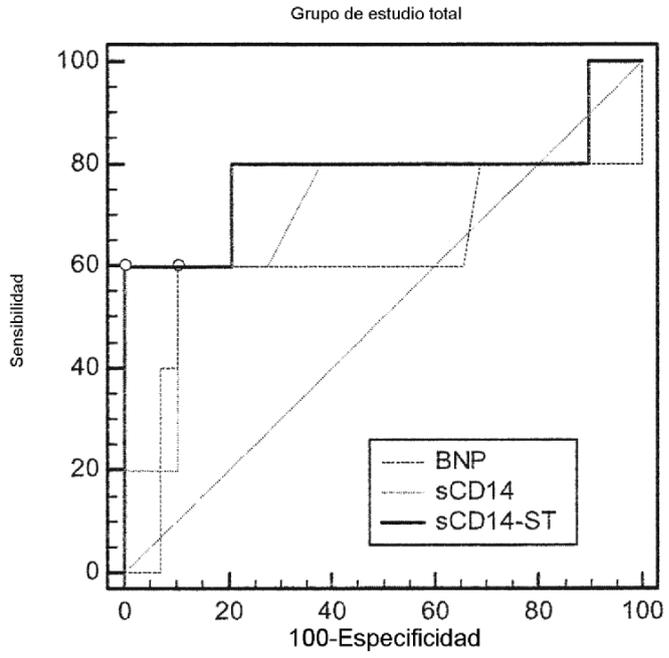


Fig. 18

A



B

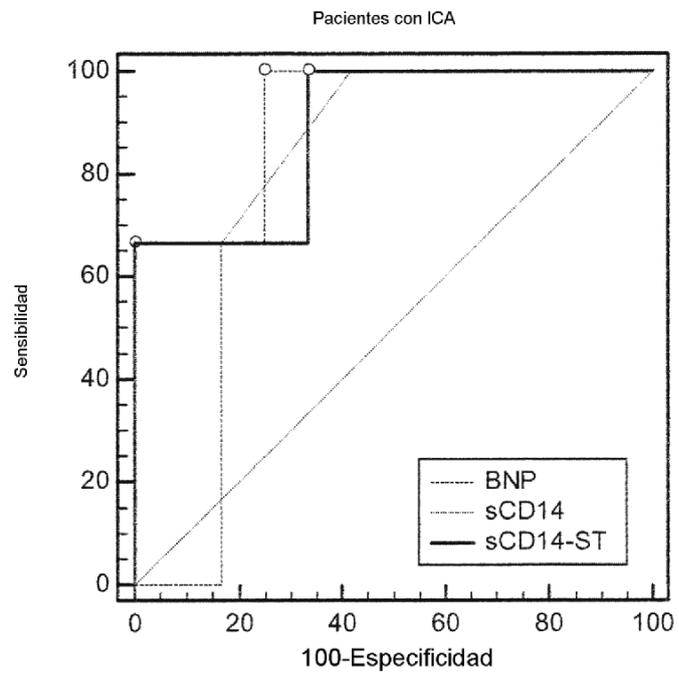


Fig. 19

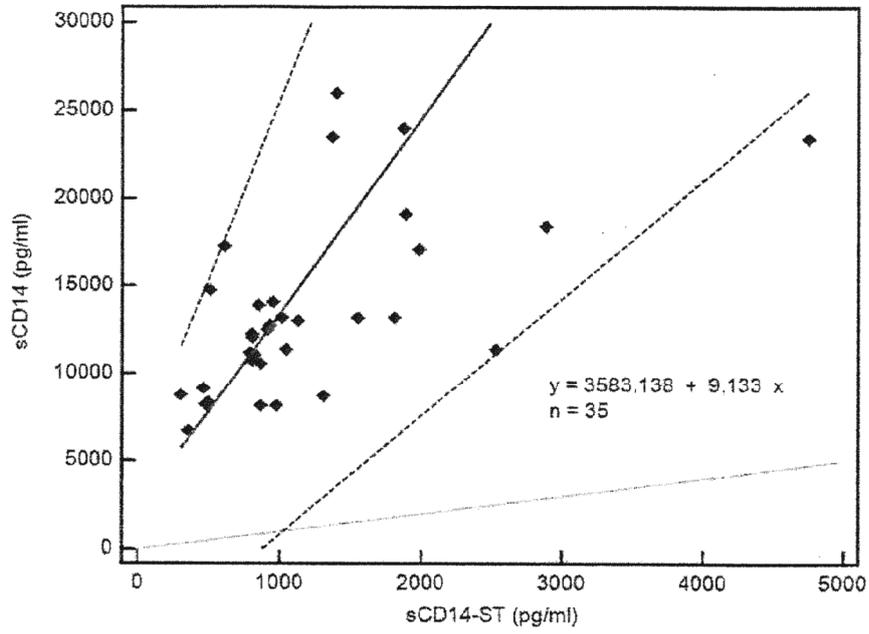


Fig. 20

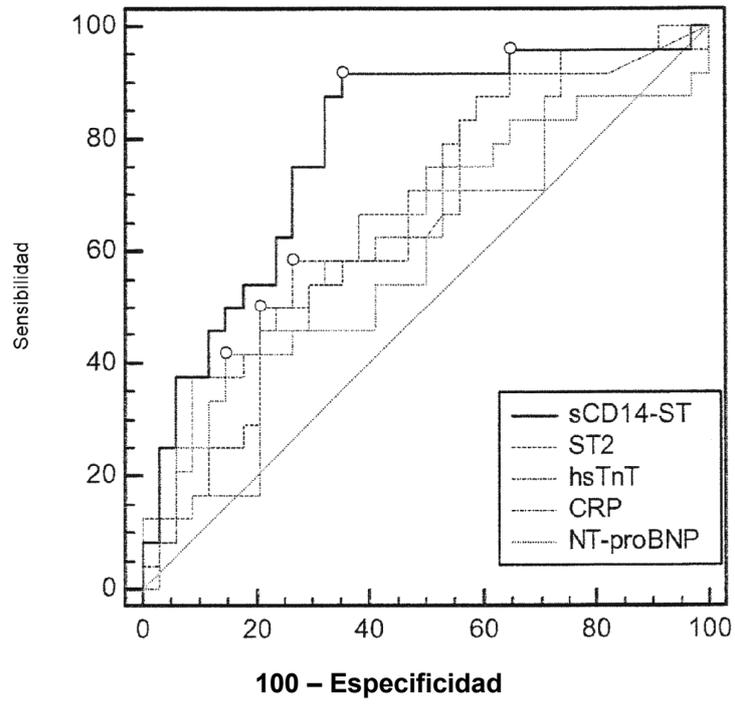


Fig. 21