

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 654**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2010 PCT/AT2010/000408**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11050379**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2010 E 10775689 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2493496**

54 Título: **Uso de GSTP1**

30 Prioridad:

30.10.2009 EP 09174692

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

22.08.2017

73 Titular/es:

**MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN (100.0%)
Spitalgasse 23
1090 Wien, AT**

72 Inventor/es:

AHARINEJAD, SEYEDHOSSEIN

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 630 654 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 GSTP1.

5 La presente invención se refiere al uso de Glutación-S-transferasa P1.

Las glutación S-transferasas (GST) son una familia multigénica de isozimas que catalizan el ataque nucleófilo del átomo de azufre del glutati6n (GSH) en los grupos electrófilos de moléculas de sustrato. Las GST se conocen como enzimas desintoxicantes que conjugan sustancias tóxicas con GSH para ser más productos solubles en agua que
 10 puedan metabolizarse en el hígado y excretarse fuera del cuerpo. En base a la secuencia aminoacídica, Las GST de mamífero se dividen en seis clases: alfa, mu, omega, pi, theta y zeta. Entre estas isozimas, la glutati6n S-transferasa P1 (GSTP1; GST-pi, GSTP1-1) es la más frecuente en las células mamíferas. La GSTP1 también ha generado interés como un marcador neoplásico, ya que se sobreexpresa en una diversidad de neoplasias humanas diferentes, incluyendo cáncer de pulmón, de colon, de estómago, de esófago, de boca, de riñón, de ovario y
 15 testicular. La mayoría de los tipos de cáncer de próstata contienen niveles reducidos de polipéptido GSTP1 con respecto al tejido de próstata normal debido a la hipermetilación del promotor GSTP1 que da como resultado la transcripción disminuida de GSTP1 (documento US 2009/0186360 A1). GSTP1 es determinante en la respuesta celular al estrés oxidativo y protege a las células tumorales de la apoptosis provocada por una diversidad de agentes citotóxicos, tales como H₂O₂, UV, cisplatino, adriamicina, etopósido, tiotepa, clorambucilo, ácido etacrínico y trióxido
 20 arsénico. Por lo tanto, la GSTP1 es considerada como una diana prometedoras en la medicina tumor, tanto como una diana para la acción del fármaco y como un marcador tumoral.

La GSTP1 también participa en la regulación de la señalización de estrés y protege las células contra la apoptosis mediante los mecanismos relacionados con sus actividades no catalíticas y de unión a ligando. Por ejemplo, la
 25 GSTP1 impide la producción excesiva inducida por LPS de factores pro-inflamatorios tiene una función antiinflamatoria en respuesta a LPS. La expresión de GSTP1, tanto a nivel de transcripción como traduccional, se aumenta por la estimulación de LPS. La GSTP1 también funciona como un inhibidor endógeno de JNK (c-Jun NH₂-terminal cinasa), a través de la interacción con el C-terminal. También se pudo demostrar que la proteína GSTP1 exógena (recombinante) puede administrarse en macrófagos y suprime la expresión de iNOS y COX-2 en las
 30 células. Además, la proteína GSTP1 administrada por vía intraperitoneal a los ratones redujo la mortalidad del choque anafiláctico significativamente e inhibió la lesión pulmonar aguda y la peritonitis (Luo y col., Mol. Immunol. 46 (2009), 848-857).

El documento EP 1 500 709 A1 sugiere GSTP1 como uno de los 22 marcadores de la inflamación.

35 También se han encontrado relevantes diversas isoformas de GSTP1 para el asma y enfermedades alérgicas de la niñez debido a la interacción de GSTP1 con la contaminación del aire del tráfico (y humo de tabaco) en el sistema respiratorio, así como la asociación con la hipertensión en el embarazo (Ohta y col., Sem. Thr. Hem. 29 (2003), 653-659).

40 Las miocardiopatías (CMP) son un grupo heterogéneo de enfermedades, incluyendo las formas dilatada (DCM), la entidad más frecuente entre las miocardiopatías, y e isquémica (ICM). Aunque la farmacoterapia y las intervenciones quirúrgicas se han mejorado con beneficios de supervivencia en las CMP, el tratamiento causal sigue siendo un objetivo vago. Por lo tanto, la identificación de mecanismos desconocidos que medien la CMP podría ser
 45 beneficiosa. Los resultados del trabajo de la última década claramente proporcionan evidencia de que la inflamación y la mejor liberación de citocinas proinflamatorias, especialmente el factor de necrosis tumoral (TNF)- α podrían desempeñar un papel en la patogénesis de la CMP. Sin embargo, los ensayos clínicos han indicado paradójicamente un papel más complicado para el TNF- α en CMP que ha puesto en duda que TNF- α sea una diana terapéutica viable para CMP. La patología de la IHD está inmediatamente relacionada con el desarrollo de CMP, los
 50 pacientes reciben actualmente medicamentos, tales como los betabloqueantes o bloqueadores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) con el objetivo de mejorar los síntomas del paciente y para prevenir o retrasar el desarrollo de CMP (isquémica) debida a IHD. Por lo tanto, es común el uso de terapias para CMP también para IHD. Es importante destacar que los pacientes que desarrollan CMP en base a IHD, en particular, CMP en fase terminal, actualmente han limitado únicamente las opciones terapéuticas (por ejemplo, el trasplante cardíaco o el uso de
 55 dispositivos de asistencia ventricular, que puede a su vez ofrecerse únicamente a un número limitado de pacientes).

Todavía existe la necesidad insatisfecha de nuevas dianas farmacéuticas y un régimen de tratamiento para la prevención y el tratamiento de manera eficiente de CMP e IHD y una de sus principales causas, es decir, las enfermedades cardíacas isquémicas (también conocidas como cardiopatías coronarias, que pueden dar lugar a un

infarto de miocardio), especialmente en CMP inducida por presión sanguínea elevada y CMP inducida por volumen.

Las miocardiopatías dan lugar a la exacerbación recurrente que conduce a la hospitalización o la muerte. Por lo tanto, también se requieren una estrecha vigilancia y pruebas clínicas exhaustivas para lograr el óptimo tratamiento de la cardiomiopatía adaptado en estos pacientes, asociado a enormes costes del cuidado de la salud. Por lo tanto, es muy deseable un biomarcador que podría identificar la evolución de la miocardiopatía y ayudar a optimizar la monitorización del tratamiento y el resultado. Idealmente, tal prueba debería ser sensible, específica, no invasiva, rápida y económica. Aunque se han indicado varios factores neurohumorales y citocinas inflamatorias como biomarcadores de diagnóstico en cardiomiopatía, el péptido natriurético de tipo cerebral (BNP) y su fragmento N-terminal inactivo (proBNP) han ganado la aceptación más amplia en el diagnóstico clínico y el seguimiento de los pacientes con CMP crónica establecida o sospechada. Sin embargo, los niveles circulantes de BNP y proBNP se ven afectados drásticamente por la función renal y son dependientes de la edad y el género. Además, aún se desconoce si proBNP podría ser beneficioso en el diagnóstico de CMP de la fracción de eyección (FE) conservada en oposición a reducida.

Por lo tanto, es también un objeto de la presente invención proporcionar medios de diagnósticos para las miocardiopatías.

Por lo tanto, la invención proporciona Glutación S-transferasa P1 (GSTP1) para su uso en la prevención o tratamiento de miocardiopatías (CMP). Con la presente invención se pudo demostrar sorprendentemente que la GSTP1 es beneficiosa en el tratamiento de CMP. La GSTP1 se ha descrito como una proteína relevante en medicina contra el cáncer (por ejemplo, los documentos US 5.427.917 A, US 5.552.277 A y WO 98/21359 A1) y en enfermedades alérgicas, tales como asma, especialmente en relación con la contaminación del aire relacionada con el tráfico (por ejemplo, Melen y col., *Env. Health Persp.* 116 (2008), 1077-1084). La GSTP1 también se ha sugerido para disminuir la mortalidad de choque anafiláctico y la inhibición de la lesión pulmonar aguda y la peritonitis (Luo y col., *Mol. Immunol.* 46 (2009), 848-875). Se indicó que GSTP1 interactúa con TRAF2 (factor asociado al receptor de necrosis tumoral 2) como una función de unión a ligando novedosa de GSTP1 en la regulación de la señalización de cinasa (Wu y col., *Oncogene* 25 (2006), 5787-5800). Aunque esto proporcionó una nueva perspectiva para analizar el mecanismo utilizado por GSTP1 para proteger las células contra diferentes estímulos de lesión, tales como citocinas, UV o H₂O₂, y esta enseñanza se consideró como concebible de que GSTP1 funciona como un factor general de supervivencia mediante la formación del complejo GSTP1-TRAF2 en las células tumorales, la inhibición de este complejo fue considerada como limitada con respecto a la terapia antitumoral.

De acuerdo con la presente invención, se descubrió sorprendentemente que GSTP1 aumenta específicamente en pacientes de CMP en comparación con los controles. Se descubrió adicionalmente que la GSTP1 recombinante medió la asociación de GSTP1-TRAF2, disminuyó la activación proinflamatoria de JNK1 y p38 y la expresión de TRAF2 dependiente de su dosis y la forma subyacente de CMP. Esto permitió la creación de una nueva estrategia de terapia para CMP mediante la administración de GSTP1. Dado que GSTP1 mejora la activación mediada por TNF- α de JNK1/p38 proinflamatorio por asociación a TRAF2, GSTP1 no es únicamente beneficios en el tratamiento de CMP, sino también para la prevención de CMP, especialmente en pacientes de riesgo, tales como pacientes hipertensos.

La presente invención proporciona el uso de GSTP1 para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de CMP. El tratamiento de CMP de acuerdo con la presente invención implica la administración de una cantidad eficaz de GSTP1 a un individuo en necesidad de tal tratamiento, por ejemplo, pacientes de CMP humanos. Por estas razones y en base al hecho de que la patología de IHD está inmediatamente relacionada con el desarrollo de CMP, los pacientes reciben actualmente medicamentos tales como betabloqueantes o bloqueantes de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) con el objetivo de mejorar los síntomas del paciente y prevenir o retrasar el desarrollo de CMP (isquémica) debido a IHD. La estrecha relación de la patología de IHD con CMP que se basa en la remodelación miocárdica en pacientes con IHD, especialmente en pacientes que desarrollan infarto de miocardio debido a IHD, que a su vez conduce a la remodelación de las cámaras cardíacas y, posteriormente, a la alteración de la función de bombeo del corazón, una afección patológica que es común a CMP e IHD, especialmente en pacientes con infarto de miocardio, muestra la eficacia de la presente invención para la prevención o el tratamiento de CMP.

Con la presente invención, pueden tratarse todas las formas y fases de CMP, formas agudas y crónicas de la misma, independientemente de la génesis de la CMP. Por supuesto, el término "tratamiento" incluye preferiblemente la mejora de la enfermedad y la prevención o ralentización del avance de la enfermedad. Por ejemplo, las CMP pueden estar causadas por infarto de miocardio, pueden dilatadas idiopáticas o estar causadas por hipertensión. Todas

estas formas pueden tratarse con GSTP1 de acuerdo con la presente invención. Las CMP isquémicas específicamente, por ejemplo, causadas por infarto de miocardio, pueden tratarse con GSTP1, sin embargo, pueden tratarse también las formas no isquémicas (por ejemplo, CMP dilatadas idiopáticas o CMP inducidas por hipertensión o volumen). Dado que en todas estas CMP están implicados procesos inflamatorios, esto las hace aptas para el
5 tratamiento con GSTP1 de acuerdo con la presente invención (incluyendo formas raras de CMP, si están implicados dichos procesos inflamatorios).

Por lo tanto, las CMP preferidas de acuerdo con la presente invención son miocardiopatía dilatada, especialmente miocardiopatía congestiva; miocardiopatía hipertrófica obstructiva, especialmente estenosis subaórtica hipertrófica;
10 otras miocardiopatías hipertróficas, especialmente miocardiopatía hipertrófica no obstructiva; enfermedad endomiocárdica (eosinófila), especialmente fibrosis endomiocárdica (tropical) o endocarditis de Löffler; fibroelastosis endocárdica, especialmente miocardiopatía congénita; otras miocardiopatías restrictivas, especialmente miocardiopatía constrictiva SAI (sin especificar de otro modo (de acuerdo con ICD-10)); miocardiopatía alcohólica, miocardiopatías debido a fármacos y otros agentes externos, miocardiopatías sin especificar, especialmente
15 miocardiopatía (primaria)(secundaria) SAI; miocardiopatía en enfermedades infecciosas y parasitarias, especialmente miocardiopatía en difteria; miocardiopatía en enfermedades metabólicas, especialmente amiloidosis cardíaca; miocardiopatía en enfermedades nutricionales, especialmente miocardiopatía nutricional SAI; tofos gotosos de enfermedad cardíaca o enfermedad cardíaca tirotóxica.

20 Las formas específicamente preferidas de CMP a tratar (o prevenir) de acuerdo con la presente invención son CMP causadas por isquemia, especialmente por infarto de miocardio; por hipertensión, o por miocarditis. Por lo tanto, el tratamiento con GSTP1 de acuerdo con la presente invención se aplica preferiblemente en pacientes con miocarditis aguda, preferiblemente miocarditis infecciosa, especialmente miocarditis séptica; miocarditis aislada, miocarditis en una enfermedad bacteriana, especialmente miocarditis diftérica, gonocócica, meningocócica, sífilítica o tuberculosa;
25 miocarditis en una enfermedad vírica, especialmente miocarditis por influenza o miocarditis por paperas; miocarditis aguda o crónica en enfermedad de Chagas, miocarditis en toxoplasmosis, miocarditis reumática o miocarditis sarcoide.

Por lo tanto, las indicaciones preferidas de acuerdo con la presente invención son las enumeradas en el Capítulo IX
30 de ICD-10 (I11-I15, especialmente I21, I22 y I23; I20-I25, especialmente I21 y I22; I40-I43, especialmente I42; I50-I57, especialmente I50 y I57).

El objetivo principal de la presente invención es el tratamiento de pacientes humanos; sin embargo, en base a los presentes hallazgos, también es evidente que la CMP animal (mamífera) en la que está implicada inflamación puede
35 tratarse con éxito por GSTP1 de acuerdo con la presente invención. Esto puede ser importante para animales de granja y zoológico (especialmente cría de animales de granja, tales como (anteriormente) caballos de carreras) o animales domésticos, por ejemplo, perros, gatos y caballos.

Aunque la presente invención puede usarse también para la prevención de CMP, es evidente que el objetivo
40 principal de la presente invención reside en el tratamiento de pacientes de CMP humanos que ya han sido diagnosticados con CMP o que tienen un alto riesgo de desarrollar CMP, por ejemplo pacientes con hipertensión (por ejemplo, pacientes de Fase 2 con presión sistólica de 160 mm Hg o más y/o con presión diastólica de 100 mm Hg o más). Otra realización preferida del aspecto preventivo de la presente invención es para pacientes de angina de pecho, por lo que un infarto de miocardio podría o no haber ocurrido en este conjunto de pacientes; e puede estar
45 presente o no una insuficiencia cardíaca o fallo cardíaco (Mc Murray y col., Lancet 365 (2005), 1877-1889). Aquí, está indicada incluso la administración intravenosa continua o administración continua al músculo del corazón.

Las rutas preferidas de administración de la GSTP1 que contiene medicamento de acuerdo con la presente invención son las rutas parenterales, preferiblemente administración intraperitoneal o intravenosa, prefiriéndose
50 específicamente administración intravenosa. La administración intravenosa puede realizarse, por ejemplo, a través de inyección en bolo o por administración intravenosa continua durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, de 30 min a 6 h, especialmente de 1 a 3 h). En el proceso de la cirugía de corazón también se prefiere la administración directamente al corazón (inyección intramiocardiaca). Con esta ruta, la actividad GSTP1 puede administrarse directamente y en altas concentraciones al área de necesidad, por ejemplo, a una región de infarto.
55 Otra ruta de administración preferida es la administración al seno coronario (por ejemplo, a través de un catéter insertado en el seno coronario). Las rutas oral o mucosa (aunque se describen en principio para GSTP1; véase, por ejemplo el documento US 5.976.528 A) son menos preferidas, ya que GSTP1 es una proteína y para esta ruta son necesarias medidas específicas de protección (recubrimiento entérico, encapsulación, etc.), así como una optimización significativa con respecto a la fabricación galénica.

Las dosificaciones preferidas para la administración son dosificaciones de 0,001 a 100 mg de GSTP1/kg, preferiblemente de 0,01 a 10 mg de GSTP1/kg, especialmente de 0,1 a 1 mg de GSTP1/kg, a un ser humano individual, preferiblemente a través de administración intravenosa; o dosificaciones de 0,1 a 10000 U de GSTP1/kg, preferiblemente de 1 a 1000 U de GSTP1/kg, especialmente de 10 a 100 U de GSTP1/kg, a un ser humano individual, preferiblemente a través de administración intravenosa. Se prefieren dosificaciones a diario para la aplicación intravenosa ("kg" se refiere a kg de peso corporal de la persona a tratar). Durante la cirugía, estas dosificaciones también pueden aplicarse, como un conjunto o incluso más de una dosificación; o únicamente parte de la dosificación (teniendo en cuenta que la GSTP1 se puede aplicar directamente durante la cirugía en el área necesaria). Las formas de dosificaciones diarias "listas para usar" (por ejemplo, para un individuo humano de 80 kg y/o 60 kg) pueden prefabricarse y pueden hacerse estables al almacenamiento por liofilización o congelación (y mantenimiento a, por ejemplo, -20 °C). Después, la dosificación puede consumirse completa o únicamente parcialmente (por ejemplo, en base al peso corporal de la persona que se va a tratar).

La GSTP1 de acuerdo con la presente invención también se denomina como "GSTP1-1", "GST clase pi", "DFN7", "GST3", "GST π ", etc. y conjuga el glutatión reducido con un amplio número de electrófilos hidrófobos exógenos y endógenos (EC 2.5.1.18; Actividad catalítica: RX + glutatión = HX + R-S-glutatión). La secuencia humana (Seq. ID. No. 1) se enumera como "GSTP1_HUMAN, P09211" en la base de datos UniProtKB/SwissProt (HGNC: 4638, Entrez Gene: 2950).

SEQ.ID.NO. 1:

```

1 mppytvvyfp vrgzcaalrm lladqgqswk eevvtvetwq egslkasclly gqpkfkdgd
61 ltlyqsntil rhlgtrtlgly gkdqqaalv dmvndgvedl rckyisliyt nyeagkddyv
121 kalpgqikpf etllsqnqgg ktfivgdqis fadynlldll lihevlapgc ldafpllsay
181 vgrlsarpk1 kaflaspeyv nlpingngkq

```

Existen varias variantes de esta proteína humana (homocigotas, así como heterocigotas), las variantes más importantes son un intervalo de Ile a Val en la posición 105 y un intercambio de Ala a Val en la posición 114 (Melen y col., 2008). Otras variantes incluyen un intercambio de Gly a Glu en la posición 78, un intercambio de Thr a Ser en la posición 110, un intercambio Gly a Glu en la posición 139, un intercambio de Asp a Tyr en la posición 147 y un intercambio de Asp a His en la posición 158. Se conocen varios SNP diferentes sin afectar a la secuencia aminoacídica.

Si el paciente de CMP que se va a tratar con GSTP1 de acuerdo con la presente invención tiene tal alelo que da como resultado un intercambio aminoacídico (heterocigoto u homocigoto) comparado con la SEQ.ID.No. 1, puede ser recomendable administrar a tal paciente la forma alélica de esta proteína. Esto se prefiere específicamente para pacientes que son homocigotos para esta alelo, por ejemplo, paciente con el alelo homocigoto 105Val o 114Val (que después pueden recibir la variante GSTP1 de 105Val o 114Val, respectivamente). En tales casos, el riesgo de desarrollar reacciones adversas, especialmente reacciones inmunitarias adversas (que es siempre un tópico para los medicamentos proteínicos), se mantiene bajo. De todos modos, cualquiera de los ingredientes en la preparación farmacéutica que contiene GSTP1 de acuerdo con la presente invención que provoca o potencia una reacción inmunitaria en el paciente debe mantenerse al mínimo, si es posible.

Se conocen ortólogos de mamíferos, por ejemplo, de chimpancé (*Pan troglodytes*; NCBI accesos: 745954, XM_001152516.1, XP_001152516.1) y ratón (*Mus musculus*; NCBI accesos: 148701, NM_013541.11, NP_038569.11, AK0791445, BC0020485), pero también de animales no mamíferos, tales como pez cebra (*Danio rerio*) y gusano (*Caenorhabditis elegans*).

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende GSTP1, preferiblemente GSTP1 humana recombinante o GSTP1 de placenta humana, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la prevención o tratamiento de miocardiopatías o enfermedades cardíacas isquémicas.

De acuerdo con una realización preferida, la composición de acuerdo con la presente invención contiene de 1 a 100000 U de GSTP1, preferiblemente de 10 a 10000 U de GSTP1, especialmente de 10 a 1000 U de GSTP1. Una unidad de actividad de GSTP1 conjuga 1,0 micromoles de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno con glutatión reducido por minuto a pH 6,5 a 25 °C.

Una composición preferida de acuerdo con la presente invención también contiene un tampón. Los sistemas de tampón típicos son el sistema de ácido carbónico/HCO₃ (pH 6,2 a 8,6; neutro), tampón de ácido carbónico/silicato (pH 5,0 a 6,2; débilmente ácido), tampón de ácido acético/acetato (pH 3,7 a 5,7), tampón fosfato (NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄; pH 5,4 a 7,8), tampón de amoníaco (NH₃ + H₂O + NH₄Cl; pH 8,2 a 10,2), TRIS/HCl (Tris(hidroximetil)-aminometano; pH 7,2 a 9,0), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico; pH 6,8 a 8,2), HEPPS (ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-propano sulfónico; pH 7,3 a 8,7) o MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; pH 5,2 a 6,7). Los tampones preferidos de acuerdo con la presente invención son un tampón fosfato, un tampón Tris-HCl o un tampón HEPES, con un pH de 5,5 a 9,0, preferiblemente de 6,0 a 8,5, especialmente de 6,5 a 8,0. Las concentraciones de tampón pueden ajustarse preferiblemente de 1 mM a 1 M, especialmente de 10 mM a 0,5 M. Otros ingredientes adicionales preferidos incluyen estabilizadores, quelantes, sales, etc., tales como glicerol, glucosa, sacarosa, maltosa, EDTA o sustancias similares, NaCl, KCl, NH₄Cl y sales similares útiles en preparaciones farmacéuticas. Por supuesto, todos los ingredientes en una preparación farmacéutica tienen que ser de calidad farmacéutica.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados preferiblemente son solución salina fisiológica, aceites vegetales, aceite mineral, carboximetilcelulosa sódica acuosa o polivinilpirrolidona acuosa; sin embargo, también puede usarse agua estéril.

La GSTP1 que se va a usar de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse de diversas maneras. Como se ha mencionado anteriormente, la GSTP1 de placenta humana es una de las fuentes naturales preferidas de GSTP1. Otras fuentes preferidas son cultivos de células que (sobre)expresan GSTP1. Las preparaciones de GSTP1 también están disponibles en el mercado. La ruta de producción industrial preferida de acuerdo con la presente invención es, sin embargo, la producción recombinante de GSTP1. La producción recombinante de GSTP1 está bien establecida, así como su purificación a partir de dichas fuentes (por ejemplo, Luo y col., 2009, Wu y col., 2006; documento WO 98/21359 A1; documento US 5.976.528; etc.). Los vectores de expresión (por ejemplo, documento WO 98/21359 A1, Parte D (páginas 40 a 51) que contienen las secuencias codificantes de GSTP1 se transfieren en células huésped adecuadas (tales como células COS, HEK 293, HeLa, VERO, W138, BHK o MDCK, pero también levadura, células vegetales, de insecto y bacterianas (*S. cerevisiae*, *E. coli*, etc.)). Después, se expresa GSTP1 y se purifica de acuerdo con métodos convencionales. La producción de GSTP1 recombinante también puede usar formas variantes de GSTP1 con secuencias adicionales que facilitan la purificación, tales como péptidos quelantes de metal, dominios de proteína A, etiquetas de purificación por afinidad, etc. (por ejemplo, documento US 5,976,528 A, columna 16). Dichas variantes pueden eliminarse - después de la purificación o en el transcurso de la purificación - por ejemplo, a través de secuencias enlazadoras escindibles (proteasa, entereocinasa, etc.). Las preparaciones en lote purificadas de GSTP1 pueden contener, por ejemplo, de 1 a 200 U de actividad de GSTP1 por mg de proteína total. Las composiciones de GSTP1 farmacéuticas adecuadas contienen de 5 a 200 U/mg de proteína, especialmente de 10 a 150 U/mg de proteína. La preparación farmacéutica de acuerdo con la presente invención también se proporciona como un producto marcado apropiadamente que es estéril y útil para su administración a pacientes humanos de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a GSTP1 como una diana de diagnóstico para CMP. La presente invención proporciona el uso de GSTP1 para el diagnóstico de CMP. Aunque GSTP1 es un marcador conocido y establecido en el diagnóstico tumoral, fue sorprendente que GSTP1 es un biomarcador para CMP que es incluso superior al actual "estándar de oro", pro-BNP, con respecto a sensibilidad y especificidad.

Las miocardiopatías a las que se ha hecho referencia anterior para el uso terapéutico de GSTP1 también pueden diagnosticarse de acuerdo con la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar CMP, especialmente las indicaciones que se han mencionado anteriormente, determinando la cantidad de GSTP1 o ARNm de GSTP1 en una muestra biológica y comparando esta cantidad con la cantidad de GSTP1 o ARNm de GSTP1 en una muestra biológica con un estado de CMP definido y conocido, especialmente de un individuo humano sano o un paciente. Esta comparación puede hacerse de forma práctica, es decir, dado que una muestra real se ensaya de la misma manera que la muestra biológica (de forma directa), también puede ser una comparación virtual de manera que el valor determinado se compare con un valor conocido de una muestra sana o enferma.

Las técnicas preferidas para la determinación de la cantidad de GSTP1 incluyen técnicas tipo anticuerpo, tales como ELISA, combinadas opcionalmente con técnicas de electroforesis o radioinmunoensayo (RIA). Las técnicas de electroforesis también se pueden combinar con las técnicas MALDI.

Como alternativa, el ARNm de GSTP1 puede determinarse, por ejemplo, por RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

La diana de diagnóstico preferida es un paciente humano que se sospecha que tienen CMP, un paciente humano que está en riesgo de desarrollar CMP o un paciente humano que tiene CMP (del cual se ha controlado el avance de la enfermedad)

Las muestras biológicas preferidas de acuerdo con la presente invención incluyen muestras de sangre, plasma o suero humano o muestras de biopsia de miocardio humano. Estas muestras también pueden ensayarse mediante procedimientos rutinarios.

Típicamente, una alta concentración de GSTP1 en suero es indicativa de CMP. En personas sanas, las concentraciones en suero de GSTP1 se encuentran por debajo de 50 ng/ml o, preferiblemente, incluso por debajo de 10 ng/ml. Un estado de enfermedad de CMP puede diagnosticarse a un nivel en suero de 50 ng/ml o superior, preferiblemente a 100 ng/ml o superior. Las formas graves de CMP pueden diagnosticarse a 200 ng/ml o superior. Por supuesto, estos niveles siempre dependen de la técnica utilizada para el ensayo de la proteína GSTP1. Como alternativa, el estado de enfermedad de CMP se puede diagnosticar si el nivel en suero de GSTP1 se eleva en al menos el factor 2, preferiblemente en al menos el factor de 5, en comparación con un estado sano, especialmente el estado sano del mismo paciente.

Con la presente invención, la determinación de la cantidad de GSTP1 o ARNm de GSTP1 es una muestra puede realizarse en un periodo de tiempo muy corto mediante métodos de ensayo convencionales, tales como ELISA o PCR. En base al ADN y la secuencia aminoacídica de acuerdo con la SEQ.ID.NO.2

atgccgcct acaccgtggt ctatttccca gttcgaggcc gctgcgcggc cctgcgcatg	60
ctgctggcag atcagggcca gagctggaag gaggaggtgg tgaccgtgga gacgtggcag	120
gagggctcac tcaaagcctc ctgcctatac gggcagctcc ccaagtcca ggacggagac	180
ctcacctgt accagtcca taccatcctg cgtcacctgg gccgcaccct tgggctctat	240
gggaaggacc agcaggaggc agccctggtg gacatggtga atgacggcgt ggaggacctc	300
cgctgcaaat acgtctccct catctacacc aactatgagg cgggcaagga tgactatgtg	360
aaggcactgc ccgggcaact gaagcctttt gagaccctgc tgtcccagaa ccagggaggc	420
aagaccttca ttgtgggaga ccagatctcc ttcgctgact acaacctgct ggacttgctg	480
ctgatccatg aggtcctagc ccctggctgc ctggatgctg tccccctgct ctcagcatat	540
gtggggcgcc tcagcggccg gcccaagctc aaggccttcc tggcctcccc tgagtacgtg	600
aacctcccca tcaatggcaa cgggaaacag tga	633

y la SEQ.ID.NO.1 (y las entradas de bases de datos que se han mencionado anteriormente para el gen GSTP1 y la proteína GSTP1), la presente invención también proporciona, por ejemplo, un ensayo PCR para la identificación de infecciones por *S. aureus* o un ensayo ELISA sandwich. En un ELISA adecuado de acuerdo con la presente invención, la GSTP1 puede capturarse de una muestra biológica con un anticuerpo específico de GSTP1 y detectarse y cuantificarse con un segundo anticuerpo dirigido contra un epítipo diferente de GSTP1 o un anticuerpo que es específico para el evento de unión anterior.

La detección de transcritos de GSTP1 (ARNm) es posible por medio de pruebas de ácido nucleicos cuantitativas estándares, tales como RT-PCR cuantitativa. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un kit para determinar la cantidad de ARNm de GSTP1 en un mínimo de dos secuencias de ácidos nucleicos sintéticas para amplificar al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica GSTP1 o partes de la misma, en el que al menos de una de las secuencias de ácido nucleico sintéticas en el kit se selecciona del grupo que consiste en: (a) un par de cebadores adecuados, siendo los cebadores una secuencia de ácido nucleico que comprende 10-30 nucleótidos consecutivos de al menos uno de los siguientes: (i) el ARNm de GSTP1 de acuerdo con la SEQ.ID. NO. 2 o la secuencia complementaria de la misma; o (ii) a partir de la región no codificante 5' o 3' del gen GSTP1 (por ejemplo, en regiones que se extienden hasta 500, preferiblemente hasta 200, especialmente hasta 100, nucleótidos en la dirección 5' o 3' o secuencias complementarias de las mismas; tales secuencias están presentes en las entradas de la biblioteca de secuencias que se han mencionado anteriormente); siendo dichos cebadores útiles para la

polimerización de una secuencia nucleotídica ubicada entre los cebadores en el gen GSTP1 o su región 5' o 3' (siendo dicha secuencia nucleotídica de GSTP1 polimerizable detectable por PCR y preferiblemente de hasta 1000 pb, más preferiblemente de hasta 500 pb, aún más preferiblemente de hasta 300 pb de longitud; por otro lado, los cebadores se pueden seleccionar también para polimerizar (con PCR) todo el ARNm de GSTP1; y (b) reactivos adecuados para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Preferiblemente, el kit comprende adicionalmente: (c) instrucciones de uso y (d) opcionalmente, un control positivo y/o negativo para la determinación y/o cuantificación de ARNm de GSTP1, especialmente un ácido nucleico que codifica GSTP1 o un fragmento del mismo. Los ejemplos de reactivos de PCR adecuados incluyen tampón de reacción de PCR, Mg^{2+} (por ejemplo, $MgCl_2$), dNTP, ADN polimerasas (tales como transcriptasas inversas y ADN polimerasas termoestables (por ejemplo, ADN polimerasas relacionadas con Taq y ADN polimerasas relacionadas con Pfu)), RNasa, potenciadores o inhibidores de la reacción de PCR, agentes de control de reacción de PCR (por ejemplo, tinte de ADN bicatenario (tales como SYBRTM verde), sondas TaqManTM, balizas moleculares, y ScorpionsTM), y agua de calidad para PCR.

Los cebadores descritos en el presente documento son particularmente útiles en un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es un sistema práctica para la amplificación *in vitro* de una secuencia de bases de ADN. Por ejemplo, un ensayo PCR puede usar una polimerasa termoestable y dos cebadores de aproximadamente 10 a 30 bases: uno complementario a la cadena (+) en un extremo de la secuencia a amplificar, y el otro complementario a la cadena (-) en el otro extremo. Puesto que la muestra biológica recientemente sintetizada, que comprende: (a) un conjunto de cebadores que comprende en las cadenas de ADN, puede servir posteriormente como plantillas adicionales para las mismas secuencias de cebadores, las rondas sucesivas de hibridación de cebadores, la elongación de hebras, y la disociación pueden producir una amplificación rápida y altamente específica de la secuencia deseada. La PCR también puede usarse para detectar la existencia de una secuencia definida en una muestra que contiene ARNm de GSTP1.

A modo de ejemplo, un ensayo PCR típico de acuerdo con la presente invención puede comenzar - opcionalmente después de la transcripción inversa del ARNm en ADN - con dos cebadores oligonucleotídicos sintéticos que se unen específica y complementariamente a dos regiones del ADN diana o sus hebra complementaria, respectivamente, que codifica GSTP1 o su región 5' y/o 3' (un para cada hebra) que se va a amplificar. Estos pueden añadirse al ADN diana (que no tiene que ser puro) en presencia de exceso de desoxinucleótidos (dNTP) y una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, Taq polimerasa). En una serie (típicamente 20-40) de ciclos de temperatura, el ADN diana puede desnaturalizarse repetidamente (aproximadamente 80-100 °C, por ejemplo, 90 °C), hibridarse a los cebadores (típicamente a 40-65 °C), y una hebra de combinación puede extenderse desde los cebadores (típicamente a 65-80 °C, por ejemplo, 72 °C). Dado que las propias hebras de combinación actúan como plantillas para los ciclos posteriores, los fragmentos de ADN que coinciden con ambos cebadores se ilustran exponencialmente, en lugar de linealmente. El ADN diana no necesita ni ser puro ni abundante; por lo tanto, la PCR es específicamente adecuada en los diagnósticos clínicos de acuerdo con la presente invención.

Estas pruebas pueden emplear preferiblemente etiquetas que también son adecuados para la cuantificación, tales como biotina, moléculas fluorescentes, moléculas radiactivas, sustratos cromogénicos, marcadores de quimioluminiscencia, y similares. Los métodos para la biotinilación de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica, ya que son métodos para introducir moléculas fluorescentes y moléculas radiactivas en oligonucleótidos y nucleótidos. Los métodos de detección se conocen bien para etiquetas fluorescentes, radioactivas, quimioluminiscentes, cromogénicas, así como otras etiquetas usadas comúnmente. En resumen, la quimioluminiscencia puede identificarse y cuantificarse más directamente por sus longitudes de onda de emisión y la intensidad. Cuando se emplea biotina, se detecta mediante avidina, estreptavidina o similares, que se conjuga con un marcador detectable, tal como una enzima (por ejemplo peroxidasa de rábano picante). La estreptavidina se une con gran afinidad a la biotina, la estreptavidina no unida se elimina por lavado, y después se detecta la presencia de la enzima peroxidasa de rábano picante usando un sustrato de emisión de luminiscencia en presencia de peróxido y tampones apropiados.

La determinación de la cantidad de GSTP1 en una muestra incluye preferiblemente ELISA, RIA y FACS. La detección y la cuantificación de GSTP1 usando anticuerpos anti-GSTP1 está bien establecida en la técnica (especialmente en medicina tumoral) y puede aplicarse fácilmente con el fin de diagnosticar CMP de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, los documentos WO 98/21359 A1 ("F. Antibodies"); US 5.976.528 A, US 5.427.917 A). Los valores normales o estándar para la expresión de GSTP1 se establecen mediante la combinación de fluidos corporales o extractos celulares que se toman de sujetos mamíferos normales, preferiblemente seres humanos, con anticuerpo para GSTP1 en condiciones adecuadas para la formación de complejos. La cantidad de formación de complejo estándar puede cuantificarse por diversos métodos, preferiblemente por medios fotométricos. Las cantidades de GSTP1 expresadas en un sujeto, las muestras, el control y la enfermedad, de los tejidos biopsiados

se comparan con los valores estándar. La desviación entre los valores estándar y del sujeto establece los parámetros para diagnosticar la enfermedad. Como ya se ha indicado anteriormente, las muestras más preferidas son de las biopsias de corazón humano y muestras derivadas de la sangre humana de pacientes humanos individuales que tienen CMP, que se sospecha que tienen CMP o IHD o que están en riesgo de desarrollar CMP.

5

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y las dibujas de dibujo, pero sin limitarse a las mismas.

La figura 1 muestra un aumento de GSTP1 y TRAF2 en pacientes de DCM e ICM. (A) Las imágenes de matrices génicas representativas muestran la hibridación aumentada en secuencias de matriz de GSTP1 y TRAF2 (flechas) de sondas de ADNc marcadas. (B) Imágenes de matrices de proteínas representativas que demuestran una mejor tinción Cy5 (rojo) para las proteínas GSTP1 y TRAF2 cardíacas en pacientes de DCM e ICM en comparación con la tinción Cy3 (verde) de los controles. (C) Cuantificación de expresiones de ARNm de GSTP1 y TRAF2 de miocardio por RT-PCR en tiempo real. La expresión de GSTP1 (* $P < 0,0001$) y TRAF2 ($P < 0,0001$) aumenta significativamente en pacientes con insuficiencia cardíaca en comparación con los controles. (D) Imágenes de transferencia de Western representativas y cuantificación de expresiones de proteína de GSTP1 y TRAF2 de miocardio corregidas para los niveles de control de carga de proteína. Los niveles de expresión de proteína de miocardio se elevaron en DCM e ICM para GSTP1 ($P < 0,0001$, $P = 0,0019$) y TRAF2 ($P < 0,0001$, $P = 0,005$) en comparación con los controles. No se encontraron diferencias significativas en ARNm de GSTP1 y la expresión de proteínas cuando se compararon DCM e ICM; aunque los niveles de expresión de ARNm de TRAF2 ($tP = 0,001$) y proteína ($tP \leq 0,0001$) eran significativamente mayores en DCM en comparación con ICM. *, significativamente diferente frente a controles.

La figura 2 muestra la interacción GSTP1-TRAF2 y la activación de JNK y p38 en DCM e ICM. (A) Imágenes de transferencia de Western representativas y cuantificación de formación del complejo GSTP1-TRAF2 de miocardio en DCM, ICM y controles. Los lisados de miocardio VI se inmunoprecipitaron (IP) y los precipitados se analizaron en transferencias Western. Se encontró una asociación de GSTP1-TRAF2 significativamente inferior en DCM en comparación con ICM y los controles (* $P \leq 0,008$). (B) Imágenes de transferencia de Western representativas y cuantificación de expresión de proteína de JNK1 y p38 activa de miocardio en DCM, ICM y controles. Tanto en la expresión de proteína cardíaca de DCM como de ICM de JNK activa, así como p38 ($P < 0,0001$) se aumentó significativamente en comparación con los controles. Además, los pacientes de DCM revelan una expresión de proteína de JNK y p38 cardíaca significativamente mayor ($tP < 0,0001$) en comparación con ICM. Todas las expresiones de proteína se corrigieron para los niveles de control de carga de proteína. *, significativamente diferente frente a control.

La figura 3 muestra que GSTP1 modula el sistema TRAF2-JNK1/p38 cardíaco en cultivos de tejido cardíaco. (A) Imágenes de transferencia de Western representativas de expresiones de proteína de TRAF2, GSTP1, JNK activa y p38 activa en cultivos de tejido cardíaco tratados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de GSTP1 recombinante. (B) Cuantificación de expresiones de proteína de TRAF2, JNK activa y p38 activa en cultivos de tejido cardíaco de DCM, ICM y control tratados con GSTP1 recombinante (2,5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h. La expresión de proteína de TRAF2 se redujo significativamente en comparación con los tratados dependientes de la concentración usada (DCM: $P = 0,011$ para 2,5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,014$ para 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,003$ para 10 $\mu\text{g/ml}$; ICM: $P = 0,006$ para 2,5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,003$ para 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,0001$ para 10 $\mu\text{g/ml}$; controles: $P = 0,19$ para 2,5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,0003$ para 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,03$ para 10 $\mu\text{g/ml}$). Tras el tratamiento con GSTP1, la expresión de JNK activa disminuyó en tejido cardíaco de DCM, ICM y control en comparación con el grupo no tratado dependiente de la concentración usada (DCM: $P = 0,0009$ para 2,5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,01$ para 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,0003$ para 10 $\mu\text{g/ml}$; ICM: $P = 0,0005$ para 2,5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,007$ para 5 $\mu\text{g/ml}$, $P < 0,0001$ para 10 $\mu\text{g/ml}$; controles: $P = 0,001$ para 2,5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,69$ para 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,71$ para 10 $\mu\text{g/ml}$). Asimismo, la expresión de p38 activa disminuyó en respuesta al tratamiento con GSTP1 en tejido cardíaco de DCM, ICM y control en comparación con los tratados dependientes de la concentración usada (DCM: $P = 0,004$ para 2,5 $\mu\text{g/ml}$, $P < 0,0001$ para 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,0009$ para 10 $\mu\text{g/ml}$; ICM: $P = 0,03$ para 2,5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,0001$ para 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,008$ para 10 $\mu\text{g/ml}$; controles: $P = 0,008$ para 2,5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,0004$ para 5 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$). La comparación de las concentraciones de GSTP1 aplicadas con respecto a la reducción de TRAF2, JNK y p38 indicó que en DCM e ICM, pero no en los controles, las diferentes entre 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$, así como 10 $\mu\text{g/ml}$, fueron significativas. TRAF2: (DCM: $P = 0,01$ para 2,5 frente a 5 $\mu\text{g/ml}$ y frente a 10 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,62$ para 5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$; ICM: $P = 0,0007$ para 2,5 frente a 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,0004$ para 2,5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,35$ para 5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$; control: $P = 0,07$ para 2,5 frente a 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,06$ para 2,5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,15$ para 5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$). JNK: (DCM: $P = 0,0006$ para 2,5 frente a 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,003$ para 2,5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,48$ para 5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$; ICM: $P = 0,004$ para 2,5 frente a 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,01$ para 2,5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,88$ para 5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$; control: $P = 0,02$ para 2,5 frente a 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,05$ para 2,5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,97$ para 5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$). p38 (DCM: $P = 0,0002$ para 2,5 frente a 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,04$ para 2,5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,76$ para 5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$; ICM: $P =$

0,0006 para 2,5 frente a 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,02$ para 2,5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,41$ para 5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$; control: $P = 0,06$ para 2,5 frente a 5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,08$ para 2,5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0,29$ para 5 frente a 10 $\mu\text{g/ml}$). (C) Imágenes de transferencia de Western representativas de complejos de GSTP1-TRAF2 de miocardio de cultivos de tejido cardiaco de DCM, ICM y controles tratados con GSTP1 recombinante (5 $\mu\text{g/ml}$) y sometidos a inmunoprecipitación (IP). Se hizo la asociación de los cultivos de tejido cardiaco tratados con GSTP1 entre GSTP1 y TRAF2 de independiente de la enfermedad y significativamente mayor ($P = 0,02$ para 5 $\mu\text{g/ml}$ de concentración de GSTP1; resultados para 2,5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de concentración de GSTP1 no mostrados) en comparación con las muestras no tratadas. *, significativamente diferente frente a control. †, significativamente diferente frente a cultivos de tejido tratados con 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de GSTP1. ‡, significativamente diferente frente a tejido tratado con 5 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ de GSTP1.

La figura 4 muestra que TNF- α anula la sensibilidad de la cascada de TRAF2-JNK1/p38 con respecto a GSTP1 en cultivos cardiacos de DCM. (A) Imágenes de transferencia de Western representativas y cuantificación (B) de cultivos de tejido cardiaco de DCM, ICM y control tratados con TNF- α (50 ng/ml) y GSTP1 (5 $\mu\text{g/ml}$). La cascada de JNK ($P = 0,08$) y p38 ($P = 0,75$) activada por TNF- α , así como la expresión de proteína de TRAF2 ($P = 0,18$) no se vieron afectadas por la GSTP1 recombinante en cultivos de tejido cardiaco de DCM. En ICM y los controles, las expresiones de proteína de JNK activa ($P < 0,001$; $P < 0,002$), p38 activa ($P < 0,0002$; $P < 0,0001$) y TRAF2 ($P < 0,001$; $P = 0,003$) se redujeron notablemente en respuesta a la estimulación de GSTP1. La comparación de los cultivos de tejido cardiaco de ICM y DCM tratados con GSTP1 indica expresiones de proteína de TRAF2, JNK y p38 activas ($\dagger P < 0,001$) significativamente menores en ICM en comparación con las de DCM. (C) Imágenes de transferencia de Western representativas de lisados de tejido cardiaco inmunoprecipitado tratados con TNF- α (50 ng/ml) y GSTP1 (5 $\mu\text{g/ml}$). El fallo de GSTP1 en la asociación a TRAF2 tras la estimulación de TNF- α en tejido cardiaco de DCM estuvo presente, a diferencia del tejido cardiaco de ICM y control.

La figura 5 muestra que las concentraciones de GSTP1 mayores rescatan la disminución de JNK1/p38 mediada por TRAF2 tras el tratamiento con TNF- α . (A) Imágenes de transferencia de Western representativas y cuantificaciones (B) de cultivos de tejido cardiaco de DCM, ICM y control tratados con TNF- α (50 ng/ml) y GSTP1 (10 $\mu\text{g/ml}$). (B) Los resultados demuestran que los cultivos de tejido cardiaco de DCM tratados con GSTP1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ y TNF- α expresan una activación de JNK y p38 notablemente reducida, así como una expresión de proteína de TRAF2 reducida ($*P < 0,0001$) en comparación con controles tratados con TNF- α . (C) Los inmunoprecipitados de lisados de tejido cardiaco de DCM demuestran un aumento significativo ($P \leq 0,035$) de la asociación GSTP1-TRAF2 en 10 $\mu\text{g/ml}$ de GSTP1 en comparación con 5 mg/ml de GSTP1.

La figura 6 muestra que la GSTP1 sérica y cardiaca está asociada a CMP. (A) Las imágenes de matriz de proteínas en suero representativas demuestran una mejor tinción Cy3 (verde) y Cy5 (rojo) para la proteína GSTP1 en suero en pacientes con insuficiencia cardiaca en fase terminal (HF) ($FE \leq 35\%$; $n = 40$) en comparación con los controles ($FE \geq 65\%$; $n = 40$). (B) Las mediciones ELISA indican una elevación significativa ($*P < 0,0001$) de la concentración de GSTP1 en suero en pacientes de HF en fase terminal con ($FE \leq 35\%$; $n = 40$) frente a controles con ($FE \geq 65\%$; $n = 40$). (C) Las imágenes de matriz de proteínas de tejido cardiaco representativas demuestran una mejor tinción Cy3 (verde) y Cy5 (roja) para proteína GSTP1 cardiaca en pacientes de HF en fase terminal ($FE \leq 35\%$; $n = 40$) en comparación con los controles ($FE \geq 65\%$; $n = 20$). (D) Imágenes de transferencia de Western representativas y cuantificación de expresión de proteína GSTP1 de miocardio corregida para los niveles de control de carga de proteína. Los niveles de proteína GSTP1 se elevaron significativamente en pacientes de HF en fase terminal con $FE \leq 35\%$ frente a tejido de injerto cardiaco de control ($*P \leq 0,001$).

La figura 7 muestra la asociación de GSTP1 y proBNP en suero con la fracción de eyección (FE) y la correlación entre GSTP1 y proBNP. (A) Los pacientes con insuficiencia cardiaca con $FE \leq 22\%$ tienen concentraciones de GSTP1 en suero significativamente mayores en comparación con todos los demás grupos de FE. Los pacientes con $FE 33-42\%$, $FE 23-32\%$ y $FE \leq 22\%$ tienen una concentración de GSTP1 en suero significativamente mayor en comparación con aquellos con $FE > 52\%$ y $FE 43-52\%$. (B) Los pacientes con $FE \leq 22\%$ tienen una concentración de proBNP en suero significativamente más alta en comparación con todos los demás grupos de FE. No se observaron diferencias significativas en proBNP en suero entre todos los demás grupos de FE. (C) Gráfico de correlación de las mediciones de GSTP1 en suero y proBNP en suero para todos los sujetos de estudio. Se apreció una relación significativamente positiva entre GSTP1 y proBNP en suero ($r = 0,47$; $P < 0,0001$). $*P < 0,001$ frente a control, $\dagger P < 0,0001$ frente a $FE > 52\%$, $\ddagger P < 0,0001$ frente a $FE 43-52\%$, $\$P < 0,0001$ frente a $FE 33-42\%$, $||P < 0,0001$ frente a $FE 23-32\%$.

La figura 8 muestra la correlación de GSTP1 y proBNP en suero con respecto a la función cardiaca. (A) Correlación

de las concentraciones en suero de GSTP1 y proBNP con respecto a la fracción de eyección cardiaca (FE) en sujetos de estudio. El análisis indica una correlación negativa significativamente mayor de FE GSTP1 en suero ($r = -0,74$; $P < 0,0001$) en comparación con la concentración de proBNP en suero ($r = -0,27$; $P = 0,0006$). (B) El análisis de la curva ROC indica en el plano de corte óptimo de ≥ 226 ng/ml (línea de color negro; AUC = 0,891, $P < 0,0001$) una sensibilidad del 81 % y una especificidad del 82 % para GSTP1 en suero y en el plano de corte óptimo de ≥ 527 pg/ml (línea de color rojo; AUC = 0,624, $P = 0,0039$) una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 26 % para proBNP en suero para identificar $FE \leq 22$ %. (C) El análisis de la curva ROC indica en el plano de corte óptimo de ≥ 76 ng/ml (AUC = 0,974, $P = 0,0008$) una sensibilidad del 93 % y una especificidad del 100 % para GSTP1 en suero para identificar $FE \leq 42$ %.

10

La figura 9 muestra que GSTP1 inhibe las citocinas inflamatorias en un modelo de MI agudo de rata. (A) La inmunoprecipitación con transferencia de Western no reveló ninguna diferencia en la formación del complejo GSTP1-TRAF2 entre animales tratados con GSTP1 y de control; (B) la GSTP1 disminuyó los niveles de expresión de proteína JNK1 activada según se analizó por transferencia de Western; (C) la GSTP1 inhibe la expresión de ARNm de tejido de miocardio de varias citocinas inflamatorias. *; $p < 0,01$.

15

La figura 10 muestra que GSTP1 mejora la inflamación en el corazón dañado de rata. (A) Los animales tratados con GSTP1 tuvieron niveles significativamente mayores de formación de complejo entre GSTP1-TRAF2, GSTP1-JNK1 y GSTP1-p38, como se muestra por inmunoprecipitación y los análisis de transferencia de Western; (B) la expresión de proteínas de JNK1 activada, p38 y NF- κ B es significativamente inferior en animales tratados con GSTP1 en comparación con los controles como se muestra por los análisis de transferencia de Western; (C) la GST-P1 inhibe la expresión de ARNm de las citocinas inflamatorias TGF-B, IL-1B, IL-2 e IL-17; y aumenta la expresión de ARNm de la citocina antiinflamatoria IL-10 en miocardio dañado en comparación con los controles. *; $p < 0,001$.

20

La figura 11 muestra que GSTP1 atenúa la remodelación del miocardio en un modelo inducido de isquemia de rata de insuficiencia cardiaca. (A) La tinción de colágeno tricrómico de Goldner revela una remodelación tisular significativamente inferior en el corazón de animales tratados con GSTP1 en comparación con los controles; (B) el espesor de la pared ventricular izquierda (infarto) es significativamente mayor en ratas tratadas con GSTP1 en comparación con los controles; (C) Imágenes del ensayo Tunnel representativas de corazones de rata tratados con GSTP1 o un vehículo de control. Barra = 25 μ m; (D) Las ratas tratadas con GSTP1 tuvieron un índice apoptótico significativamente inferior en comparación con los controles. *; $p < 0,01$.

30

La figura 12 muestra que GSTP1 mejora la función ventricular izquierda en un modelo de rata de insuficiencia cardiaca inducida por isquemia. (A) Las ratas tratadas con GSTP1 tuvieron una fracción de eyección ventricular izquierda significativamente mayor 21 días posteriores al infarto de miocardio; (B) el volumen diastólico final ventricular izquierdo es significativamente mayor en los controles en comparación con animales tratados con GSTP1. *; $p < 0,05$.

35

Ejemplos:

40

1.: GSTP1 mejora la inflamación en la miocardiopatía (CMP) y enfermedad cardiaca isquémica (IHD)

Pacientes y muestreo de tejido

Este estudio se aprobó por el Comité de Ética de la Universidad de Medicina de Viena. Para los análisis de matriz iniciales se usaron muestras de tejido cardiaco de 70 pacientes con CMP que dieron su consentimiento informado para su inclusión (miocardiopatía dilatada idiopática (DCM), $n = 35$; miocardiopatía isquémica (ICM), $n = 35$). Después, se incluyeron un total de 100 pacientes con CMP (DCM, $n = 50$; ICM, $n = 50$) entre enero de 2004 y julio de 2008. La Tabla 1 resume las características demográficas, clínicas y hemodinámicas más importantes y el tratamiento de los pacientes. Todos los pacientes tenían un tratamiento para la insuficiencia cardiaca optimizado y se programaron para el trasplante cardiaco según los criterios de la American Heart Association. Todos los pacientes fueron sometidos a ecocardiografía, angiografía coronaria, la cateterización cardiaca derecha y resonancia magnética para la evaluación de la función ventricular, la viabilidad miocárdica y los parámetros hemodinámicos estándar por cardiólogos independientes. La historia clínica, los resultados de pruebas clínicas, y el tratamiento se documentaron y se codificaron y se ocultaron a los investigadores de las biopsias cardíacas. El grupo control consistió en 20 donantes de corazón, sin antecedentes de enfermedad cardiaca cuyos corazones no pudieron trasplantarse debido a razones de calidad.

55

Tabla 1: Datos demográficos, parámetros hemodinámicos y medicación de los pacientes del estudio

	ICM	DCM	P
Varones, %	50	48	0,4300
Edad (años)	58 ± 6	55 ± 7	0,1521
IMC (kg/m ²)	26 ± 3	25 ± 4	0,6688
ASC (m ²)	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	0,5883
PAP (mmHg)	30 ± 10	32 ± 8	0,2817
PECP (mmHg)	21 ± 9	22 ± 7	0,5264
RVP (unidades Wood)	2,5 ± 1,2	2,6 ± 1,7	0,8185
FEVI (%)	19 ± 6	18 ± 6	0,3755
Gasto cardiaco (L/min)	4,0 ± 0,8	4,4 ± 1,5	0,1647
Índice cardiaco (L/min/m ²)	2,1 ± 0,4	2,3 ± 0,8	0,1952
Inhibidores de ACE (sí/no)	23/4	24/11	0,1299
Antagonistas del receptor de la angiotensina II, %	21	31	0,2494
Betabloqueante, %	96	83	0,0973
Prostaglandina E2, %	22	20	0,8312
Amiodarona, %	26	29	0,8169
Levosimendán, %	19	20	0,6959

ACE, enzima convertidora de la angiotensina; IMC, índice de masa corporal; ASC, área de superficie corporal; DCM, miocardiopatía dilatada; ICM, miocardiopatía isquémica; FEVI, fracción de eyección ventricular izquierda; PAP, presión arterial pulmonar; PECP, presión de enclavamiento capilar pulmonar; RVP, resistencia vascular pulmonar.

Matriz de ADNc

Se aisló Poli(A+)-ARN con el kit Oligotex-dT (Quiagen, Valencia CA) y la síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó con transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (Promega, Madison, WI) en 2 µg de poli(A+) ARN. La cadena de ARN dentro del dúplex de ADN-ARN se degradó y los productos se purificaron en una columna de centrifugación Sephadex G-50 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Para el cebado de cadena inversa, se usó la primera cadena de ADNc para generar la segunda cadena de ADNc de marcada con [α -³²P]dCTP para las matrices de ADNc (GEArray Q Human Apoptosis Gene Array, SuperArray Bioscience, Frederick, MD) como se describe (Schäfer y col., Circulation 108 (2003), 1585-1591). Las señales de hibridación de ADNc en combinación se cuantificaron usando el software ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Matriz de proteínas de tejido cardiaco

La matriz de proteínas se realizó en una Antibody Microarray 500 (Clontech, Mountain View, CA; 507 proteínas) como se describe (Aharinejad y col., Circulation 120 (2009a), 11 Suppl: S198-205). Las proteínas en cada muestra se marcaron con 2 tintes fluorescentes diferentes y se incubaron en portaobjetos recubiertos con anticuerpos de micromatriz. Las señales fluorescentes de proteínas de ambos portamuestras se detectaron por el escáner GenePix 4000B (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). La cuantificación de la señal se realizó calculando una relación normalizada internacional (INR), produciendo la abundancia de un antígeno en una muestra de CMP con respecto a la de las muestras de control usando el Microarray Analysis Workbook automatizado (<http://bioinfo.clontech.com>). Las proteínas con valores de INR fuera del intervalo umbral se consideraron expresadas diferencialmente.

Aislamiento de ARNm y RT-PCR en tiempo real cuantitativa

El ARN total se aisló de biopsias de miocardio usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). El tejido se homogenizó en un sistema MagNA Lyser (Roche, Mannheim, Alemania) usando perlas verdes del lisador MagNA durante 20-30 segundos a 6000 rpm. Después, las muestras homogeneizadas se mezclaron con 200 µl de cloroformo, se incubaron durante 2-3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. El ARN se recogió y el ADNc se sintetizó usando 2 µg de ARN total y el kit M-MuLV-RT (Fermentas, St. Leon- Rot, Alemania). Se realizó RT-PCR en tiempo real en un instrumento LightCycler (Roche) como se describe (Aharinejad y col., Am J Transplant. 5 (2005), 2185-2192). Las secuencias de cebador eran de sentido/antisentido: GSP1: 5'-GGCAACTGAAGCCTTTTGGAG-3'/5'-TCATGGATCAGCAGCAAGTC-3'; TRAF2: 5'-GCAGAAGGTCTTGGAGATGG-3'/5'-GGTGGAGCAGCATTAAAGGTC-3'; y β 2-microglobulina: 5'-GATGAGTATGCCTGCCGTGTG-3'/5'-CAATCCAAAT-GCGGCATCT-3', las unidades de expresión de ARNm se determinaron después de la normalización en la expresión del gen de mantenimiento β 2-microglobulina como se ha descrito previamente (Aharinejad y col.,

2009a y 2005; Pfaffl, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001): e45) y se representaron para pacientes con CMP como un porcentaje con respecto a las de los controles. Las mediciones se realizaron tres veces. El valor medio de las tres mediciones de PCR en cada muestra se usó para el análisis de datos.

5 Co-inmunoprecipitación y transferencia de Western

El tejido cardíaco humano se lisó en el tampón de lisis que contenía Tris 20 mM (pH 7,5), NaCl 135 mM, ácido etilendiaminetetraacético 2 mM (EDTA), ditioneitol 2 mM (DTT), β -glicerofosfato 25 mM, pirofosfato sódico 2 mM, glicerol al 10 %, Triton X-100 al 1 %, ortovanadato sódico 1 mM, NaF 10 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF) complementado con un cóctel del inhibidor de proteasa completo (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, Estados Unidos) a 4 °C como se describe (Aharinejad y col., 2005). Los lisados se centrifugaron (15 000 g) a 4 °C durante 15 min. Para identificar la formación de complejos de GSTP1-TRAF2, las proteínas (500 μ g) se inmunoprecipitaron con el anticuerpo TRAF2 (0,5 μ g, BD Pharmingen, San Diego, CA). La proteína predepurada A/G PLUS-perlas de agarosa (Santa Cruz Biotechnology) se incubaron con los inmunocomplejos durante 2 h más y se lavaron cuatro veces con el tampón de lisis. Los inmunoprecipitados se sometieron adicionalmente a SDS-PAGE y se presidieron con el análisis de transferencia de Western usando el anticuerpo monoclonal anti-GSTP1 (Bethyl, Montgomery, TX).

Los lisados de proteínas (50 μ g/carril) se separaron por SDS-PAGE (10 %) antes de la transferencia electroforética sobre una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA) como se describe (Aharinejad y col., 2005). Las transferencias se incubaron con anticuerpo anti-GSTP1 monoclonal humano primario (Bethyl, Montgomery, TX), anti-TRAF2 monoclonal humano (BD Pharmingen, San Diego, CA), phospho-p38 policlonal humano (Promega, Madison, WI), phosphor-JNK policlonal humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-JNK policlonal humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-p38 policlonal humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), antes de la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La carga de proteínas se evaluó por tinción de Ponceau S y la inmunodetección se realizó por quimioluminiscencia (Supersig-nal-West-Pico, Pierce, Rockford, IL). Las bandas se cuantificaron mediante el software ImageQuant y las señales de proteínas específicas se normalizaron con respecto a los controles de carga y se expresaron como unidades arbitrarias. Se usó el valor medio de tres mediciones en cada muestra para el análisis de datos.

Experimentos de cultivo de tejido cardíaco

El miocardio recién aislado de pacientes de control, DCM o ICM (2 a 3 mm³) se incubó (100 piezas por placa de 6 pocillos) en DMEM que contenía suero fetal bovino al 10 % (Gibco, Carlsbad, CA), 50 U/ml de penicilina y 250 μ g/ml de estreptomycin (pH 7,2) a 37 °C en una atmósfera de aire complementada humidificada que contenía CO₂ al 5 % como se describe (Schäfer y col., 2003). Después de 6 horas, se trataron los pocillos con GSTP1 recombinante (2,5, 5 o 10 μ g/ml; Assay Design, Ann Arbor, MI) y/o TNF- α (50 ng/ml; eBioscience, San Diego, CA) (Wu y col., 2006). Tras la incubación durante 24 horas, el medio se cambió y los lisados de cultivo de tejido cardíaco se analizaron. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los parámetros clínicos, las características de los pacientes, los niveles de expresión de ARNm de GSTP1 y TRAF2, y los niveles de expresión de proteínas de GSTP1, TRAF2, p38 activa, y JNK activa se compararon entre los grupos mediante la prueba χ^2 y un análisis unidireccional de varianza (ANOVA unidireccional; prueba de Tukey) de acuerdo con la escala de la variable (continua o categórica). Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el sistema SAS para Windows, versión 9.1.3 y la Enterprise Guide, versión 4.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). El significado estadístico se ajustó a P<0,05. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE).

Resultados

GSTP1 y TRAF2 se sobreexpresan en miocardio dañado

Las matrices de perfil de tejido de cribado identificaron mayores niveles de expresión génica cardíaca de GSTP1 y TRAF2, así como niveles de expresión de proteínas en pacientes seleccionados aleatoriamente tanto con DCM como ICM en comparación con los individuos de control (figuras 1A, 1B). Para verificar los resultados obtenidos en las matrices de cribado, la expresión miocárdica de GSTP1 y TRAF2 se examinó entonces de forma prospectiva por RT-PCR en tiempo real y transferencia de Western en la cohorte de estudio. Estos análisis indicaron niveles de

expresión de ARNm de miocardio significativamente elevados en DCM e ICM tanto para GSTP1 ($P < 0,0001$) como TRAF2 ($P < 0,0001$) en comparación con los controles (figura 1C). Asimismo, los niveles de expresión de proteínas de miocardio se elevaron en DCM e ICM para GSTP1 ($P < 0,0001$, $P = 0,0019$) y TRAF2 ($P < 0,0001$, $P = 0,005$) en comparación con los controles (figura 1D). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ARNm de GSTP1 y de proteínas al comparar DCM e ICM; aunque los niveles de expresión de ARNm de TRAF2 ($P = 0,001$) y de proteínas ($P \leq 0,0001$) eran significativamente mayores en DCM en comparación con ICM (figuras 1C, 1D).

Interacción GSTP1-TRAF2 en la activación de JNK/p38

10 Dado que GSTP1 está asociada físicamente a TRAF2 y forma complejos intracelulares en las células tumorales, se determinó si esta ruta está activa en el miocardio dañado. Los presentes análisis en cultivos de tejido cardiaco mostraron que GSTP1 se asocia a TRAF2 en tejido cardiaco de ICM y de control, mientras que esta asociación fue significativamente menos ($P < 0,0001$) detectable en DCM (figura 2A). Dado que TRAF2 activa presuntamente dos MAP cinasas principales, se sabe que JNK y p38 median la inflamación en el miocardio dañado, se examinó la expresión miocárdica de la proteína p38 y JNK activa en los pacientes del estudio. Los resultados muestran que tanto la expresión de proteínas cardiacas de DCM e ICM de JNK activa como de p38 ($P < 0,0001$) se aumentó significativamente en comparación con los controles. Además, los pacientes de DCM revelaron una expresión de proteína de JNK y p38 cardiaca significativamente mayor ($P < 0,0001$) en comparación con ICM (figura 2B). Estos resultados muestran que la asociación GSTP1-TRAF2 se regula de forma diferente en DCM e ICM y que esto puede afectar a la activación de MAPK.

GSTP1 modula la activación de JNK/p38 mediada por TRAF2 cardiaca

Para determinar si GSTP1 modula la activación de JNK y p38 mediada por TRAF2, los cultivos de tejido cardiaco de los corazones dañados y los controles se trataron con GSTP1 recombinante a tres concentraciones diferentes. El resultado muestra que en los cultivos de tejido tratados con GSTP1 obtenidos de DCM, ICM y controles, las expresiones de proteína de TRAF2 se redujeron significativamente en comparación con los no tratados. De forma similar, tras el tratamiento con GSTP1, la expresión de JNK y p38 activa disminuyó en el tejido cardiaco de DCM, ICM y control en comparación con el grupo no tratado. La comparación de las concentraciones de GSTP1 aplicadas con respecto a la reducción de TRAF2, JNK y p38 muestra que en DCM e ICM, pero no en los controles, las diferentes entre 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$, así como 10 $\mu\text{g/ml}$ fueron significativas (figuras 3A, 3B).

Para probar si la GSTP1 complementada de forma exógena afecta a la formación del complejo GST-P1-TRAF2, los lisados de tejido cardiaco tratado con GSTP1 se inmunoprecipitaron con el anticuerpo TRAF2 y los inmunogranulos se sometieron a transferencia de Western. Los resultados muestran que en la asociación de los cultivos de tejido cardiaco tratado con GSTP1 entre GSTP1 y TRAF2 era independiente de la dosis y la enfermedad y significativamente mayor ($P = 0,07$ para 5 $\mu\text{g/ml}$ de concentración de GSTP1) en comparación con las muestras sin tratar (figura 3C).

40 Estos resultados muestran que en cultivos de tejido cardiaco, la GSTP1 afecta a la expresión de proteína de TRAF2 y actúa como un regulador negativo de la activación de JNK1 y p38 a través de la formación del complejo GSTP1-TRAF2.

TNF- α anula la sensibilidad de la cascada TRAF2/JNK/p38 a GST-P1 en DCM

45 Para determinar si GSTP1 interactúa con la activación de JNK y p38 inducida por TNF- α indicada en miocardio dañado, los tejidos de cultivo cardiaco aislados de DCM, ICM y controles se trataron con TNF- α recombinante seguido de GSTP1 a 5 $\mu\text{g/ml}$. Estos experimentos demuestran que la cascada de JNK ($P = 0,08$) y p38 ($P = 0,75$) activada por TNF- α , así como la expresión de proteína TRAF2 ($P = 0,18$) no se ven afectados por la GSTP1 recombinante en cultivos de tejido cardiaco de DCM. Sin embargo, en cultivos aislados de ICM y de controles, las expresiones de proteínas de JNK ($P < 0,001$; $P < 0,002$), p38 ($P < 0,0002$; $P < 0,0001$) y TRAF2 ($P < 0,001$; $P = 0,003$) se reducen notablemente en respuesta a la estimulación de GSTP1 (figura 4A). Para entender los resultados divergentes obtenidos para el grupo DCM frente al grupo ICM, los lisados de tejido cardiaco tratados con TNF- α y GSTP1 se inmunoprecipitaron y los inmunogranulos se sometieron a transferencia de Western. Estos análisis muestran el fallo de GSTP1 para asociarse a TRAF2 tras la estimulación de TNF- α en tejido cardiaco de DCM (figura 4B). Este efecto, sin embargo, no estaba presente en el tejido cardiaco de ICM y de control (figura 4C). Estos datos muestran el fallo de la unión de TRAF2 mediada por TNF- α a GSTP1 en cultivos de tejido cardiaco de DCM en 5 $\mu\text{g/ml}$ de GSTP1.

GSTP1 rescata la disminución de JNK1/p38 mediada por TRAF2 tras el tratamiento con TNF- α a mayores concentraciones

5 Teniendo en cuenta que la expresión de proteínas del tejido cardiaco de TRAF2 en DCM era aproximadamente dos veces mayor en comparación con ICM y los controles, y considerando los resultados que se han descrito anteriormente, se ensayó el efecto de una mayor concentración de GSTP1 tras el tratamiento con TNF- α . Los resultados demuestran que los cultivos de tejido cardiaco de DCM tratados con GSTP1 a 10 μ g/ml y TNF- α a 50 ng/ml expresan una activación de JNK y p38 notablemente reducida, así como una expresión de proteína de TRAF2 reducida ($P < 0,0001$; figuras 5A, 5B). De manera importante, los inmunoprecipitados de lisados de tejido cardiaco de DCM demuestran un aumento significativo ($P \leq 0,035$) de la asociación GSTP1-TRAF2 en 10 μ g/ml en comparación con 5 mg/ml de GSTP1.

Estos datos muestran que mayores concentraciones de GSTP1 inhiben la activación de JNK y p38 inducida por TNF- α en DCM a través de la formación del complejo GSTP1-TRAF2 y también afectan a la expresión de TRAF2.

En el presente ejemplo, GSTP1 y TRAF2 se identificaron como mediadores novedosos de CMP. La interacción entre GSTP1 y TRAF2 se ha identificado previamente en neoplasias (Wu y col. 2006), sin embargo, la conexión con CMP no se ha sugerido antes. De forma interesante, la capacidad de GSTP1 para asociarse a TRAF2 difería entre DCM e ICM de una manera dependiente de TNF- α . Aunque el papel proinflamatorio devastador de la señalización de TNF- α en CMP está bien establecido, los ensayos clínicos han indicado paradójicamente una función más complicada para TNF- α en CMP. Por lo tanto, las rutas específicas del direccionamiento relacionadas con la señalización de TNF- α pueden proporcionar un enfoque más selectivo en el tratamiento de CMP. TRAF2 es un regulador central de la señalización de TNF- α que media la activación de MAPK. Al mismo tiempo, GSTP1 puede anular la activación de MAPK a través de la asociación a TRAF2 y, en consecuencia, suprimir la señalización de TNF- α . Los presentes datos muestran una elevación significativa de JNK y p38 activas en miocardio de DCM en comparación con ICM y los controles.

De forma importante, se demostró que el reabastecimiento de las reservas intracelulares de GSTP1 con proteína GSTP1 recombinante suprime de forma eficaz las respuestas inflamatorias sistémicas y localizadas a través de la inhibición de la señalización de MAPK. Misteriosamente, a diferencia de los hallazgos observados en el miocardio de DCM nativo en este estudio, la GSTP1 recombinante indujo la inhibición de las actividades de JNK y p38, si como la disminución de expresión de proteína TRAF2 total en cultivos de tejido cardiaco. Este efecto se acompañó de un aumento considerable en la asociación de GSTP1-TRAF2 en todos los cultivos de células cardiacas tratados con GSTP1. Además, se observaron los efectos máximos de la atenuación de GSTP1 en el sistema TRAF2-JNK/p38 en 5 μ g/ml y no vieron afectados por los aumentos adicionales de concentración. Estos resultados contradicen los obtenidos con el tejido cardiaco. Sin embargo, después del tratamiento con, los niveles de expresión de JNK/p38 y TRAF2 activa eran más altos en los cultivos de pacientes con DCM. Dado que no se observó ninguna diferencia en la formación del complejo GSTP1-TRAF2 tras la incubación de GSTP1 en DCM en comparación con tejidos de cultivo cardiaco de ICM y de control, factores adicionales pueden contribuir a una regulación intracelular de la asociación de GSTP1-TRAF2 en CMP. La discrepancia entre los datos obtenidos por el análisis de muestras miocárdicas y experimentos *in vitro* puede explicarse por la presencia de un factor circulante soluble normalmente presente en el miocardio nativo, pero no en cultivos de tejido cardiaco. Ya que TNF- α se eleva en gran medida en el suero de pacientes con CMP y se ha visto implicado en la patología subyacente, los cultivos de tejido cardiaco se preincubaron antes de la administración de GSTP1 recombinante para introducir los efectos de TNF- α en el modelo *in vitro*. Notablemente, la incubación de cultivos de tejido cardiaco estimulados TNF- α con 5 μ g/ml de GSTP1 no afectó a la asociación de GSTP1-TRAF2 en cultivos cardiacos de ICM, mientras que en los cultivos cardiacos de DCM, la formación del complejo GSTP1-TRAF2 se anuló completamente. Además, la alta expresión inalterada de JNK/p38 activa, así como TRAF2 se observó exclusivamente en cultivos de tejido cardiaco de DCM. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por el análisis de biopsias miocárdicas y apoyan completamente que la interacción alterada de GSTP1-TRAF2 en pacientes con DCM dio como resultado un aumento de la actividad de MAPK.

Estos datos muestran que los aumentos adicionales de la concentración de GSTP1 restauran la asociación de GSTP1-TRAF2 e inhiben la actividad de JNK1 y p38 en cultivos de tejido cardiaco de DCM tras la estimulación de TNF- α . Estos resultados muestran que la atenuación inducida por TNF- α de la unión de GSTP1-TRAF2 que está únicamente asociada a la patología de DCM, puede anularse por mayores concentraciones de GSTP1. Además, se demostró que en los cultivos de tejido cardiaco de ICM tanto la actividad de JNK1 como de p38 se inhibe por la

GSTP1 recombinante de una manera independiente de la dosis y de TNF- α . Estos resultados muestran que la acción de GSTP1 en ICM puede ocurrir, aunque de una manera independiente de TRAF2.

En conclusión, estos resultados muestran que la función novedosa de GST-P1 en la modulación de TNF- α /TRAF2 causó la activación de JNK1/p38 en DCM. Además, la asociación GSTP1-TRAF2 se protege por la estimulación de TNF- α en DCM pero no el miocardio de ICM o control de una manera dependiente de la concentración de GSTP1. Estos hallazgos muestran (véase también: resumen publicado posteriormente Aharinejad y col., *Circulation* 120 (noviembre de 2009), S905; enhancement of cardiovascular sensitivity to cyclophosphamide: Haberzettl y col., *Circulation* 120 (noviembre de 2009), S718) la funcionalidad de la presente invención como una estrategia terapéutica avanzada y fiable que dirige la actuación inflamatoria de GSTP1.

2.: GSTP1 en suero es un marcador sensible de CMP

Pacientes y métodos

15

Pacientes

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Medicina de Viena. Las muestras en suero de pacientes con CMP (FE \leq 35 %; n = 40) y voluntarios sanos (FE \geq 65 %; n = 40) se usaron para los análisis de matrices iniciales. Después, un total de 161 pacientes que dieron su consentimiento informado para su inclusión se incluyeron de forma prospectiva. La cohorte de estudio incluyó 141 pacientes con CMP en fase terminal programados para trasplante cardiaco y 20 pacientes con FE conservada que se sometieron a una cirugía de la válvula aórtica o mitral aislada convencional. Todos los pacientes fueron sometidos a ecocardiografía, angiografía coronaria, y la cateterización cardiaca derecha para la evaluación de la función ventricular y los parámetros hemodinámicos estándar por dos cardiólogos independientes. La historia clínica, los resultados de pruebas clínicas, y el tratamiento se documentaron, se codificaron y se ocultaron a los investigadores de las muestras en suero.

Los pacientes del estudio se subdividieron en grupos en base a su FE ventricular izquierda evaluada por ecocardiografía como se indica a continuación: FE $>$ 52 %; FE 52-43 %; FE 42-33 %, FE 32-23 % y FE \leq 22 % como se describe (Lee y col., *Circulation* 119 (2009) 3070-3077). El grupo de control (n = 20) consistió en 10 hombres y 10 mujeres, con edades entre 30-61 años (51,8 \pm 3,2 años).

Recogida en suero y tejido cardiaco

Las muestras en sangre venosa periférica se recogieron en el diagnóstico de CMP o poco antes del trasplante (Aharinejad y col., *Am. J. Transplant.* 9 (2009b), 199-159). Las muestras en suero se codificaron y se concentraron en nitrógeno líquido hasta el análisis. Se obtuvieron múltiples biopsias miocárdicas de la pared ventricular izquierda anterior (VI) de los corazones explantados de pacientes de trasplante (FE \leq 35 %; n = 40) y de 20 corazones de donantes que no pudieron trasplantarse por motivos de calidad (FE \geq 65 %, edad media 45 \pm 10, 12 hombres, 8 mujeres), se codificaron y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido.

Matrices de proteínas en suero y tejido cardiaco

Para la matriz de proteínas se obtuvieron muestras en suero seleccionadas aleatoriamente de pacientes con CMP en fase terminal poco antes del trasplante y de voluntarios sanos y se agruparon para cada grupo. Para la matriz de proteínas de tejido cardiaco, se usaron lisados tisulares (Abraham y col., *Circ. Res.* 87 (2000), 644-647) de biopsias miocárdicas VI de corazones explantados en pacientes de trasplante (n = 40) y corazones de control de donantes (n = 20). La matriz de proteínas se realizó en Antibody Microarray 500 (Clontech, Mountain View, CA; 507 proteínas), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las proteínas en cada muestra se marcaron con 2 tintes fluorescentes diferentes (Cy3 y Cy5) y se incubaron en portaobjetos recubiertos con anticuerpos de micromatrices. Las señales fluorescentes de proteínas de ambos portaobjetos se detectaron por escáner GenePix 4000B (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). La cuantificación de la señal se realizó calculando una relación normalizada internacionalmente (INR) usando el Microarray Analysis Workbook automatizado (<http://bioinfo.clontech.com>).

55 Ensayos de GSTP1 y pro BNP

Se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para GSTP1 (HEPKIT™-Pi, Biotrin International Ltd., Dublín, Irlanda) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La reacción de sustrato se cuantificó espectrofotométricamente usando un lector de microplacas automatizado de 96 pocillos (Anthos, Salzburg, Austria) a

450 nm. Se midió proBNP N-terminal en suero sin diluir automáticamente por un ELISA no competitivo quimioluminiscente (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) en un analizador Roche Elecsys 2010.

Aislamiento de ARNm y RT-PCR en tiempo real cuantitativa

5

Se aisló el ARNm total de biopsias de VI usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) con un sistema MagNA Lyser (Roche, Mannheim, Alemania). El análisis por RT-PCR en tiempo real se realizó en un instrumento LightCycler (Roche) como se describe (Aharinejad y col., 2009b, Abraham y col., 2000). Las secuencias de cebador eran de sentido/antisentido: GSTP1: 5'-CCAAAGGTGGTGGAGCTTCAT-3'/5'-TCTACCCAGCATGGAGGAAC-3'; y β 2-microglobulina: 5'-GATGAGTATGCCTGCCGTGTG-3'/5'-CAATCCAAATGCG-GCATCT-3'. Los niveles de expresión de ARNm de GSTP1 se normalizaron con respecto a la señal de β 2-microglobulina como un gen de mantenimiento (Aharinejad y col., 2009b, Abraham et al, 2000). El valor medio de tres mediciones de PCR en cada muestra se usó para el análisis de datos.

10

15 Análisis por transferencia de Western

Se prepararon lisados tisulares (Aharinejad y col., 2009b) y se analizó la expresión de GSTP1 mediante transferencia de Western usando anticuerpo anti-GSTP1 monoclonal humano primario (Bethyl, Montgomery, TX). Las bandas de proteínas se cuantificaron mediante el software ImageQuant y las señales de proteínas específicas se normalizaron con respecto a los controles de carga. El valor medio de tres mediciones en cada muestra se usó para el análisis de datos.

20

Análisis estadístico

25

Las concentraciones en suero de GSTP1 y proBNP se compararon entre los grupos de pacientes mediante el análisis de la varianza (ANOVA unidireccional; prueba de Tukey). Para investigar la relación entre GSTP1 y proBNP, así como la relación de GSTP1 con respecto a la edad, PAP, PECP, RVP, índice cardiaco y creatinina, se computaron los coeficientes de correlación por rangos de Spearman (rS). Se usó la regresión logística univariada para describir la utilidad de GSTP1 y proBNP como predictores de FE. Se usaron análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC) correspondientes para encontrar niveles de corte óptimos. La sensibilidad y la especificidad de los cortes de GSTP1 y proBNP se calcularon por un análisis de tablas. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el sistema SAS para Windows, versión 9.1.3 y Enterprise Guide, versión 4.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). El significado estadístico se ajustó a $P < 0.05$. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

30

Resultados

GSTP1 está asociada a CMP

40

Los datos demográficos, características clínicas y la medicación más relevante para CMP de los pacientes del estudio se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Datos demográficos, características clínicas y la medicación más relevante para CMP de los pacientes del estudio.

Característica	Valor
Edad (años)	53 \pm 13
Hombre/Mujer	119/42 (74 %/26 %)
Diabetes mellitus	34 (21 %)
IDDM	22 (14 %)
NIDDM	12 (7 %)
Clasificación funcional de NYHA	
II	25 (15 %)
III	94 (59 %)
IV	42 (26 %)
Diagnóstico	
Enfermedad Valvular	20 (12 %)
ICM	43 (27 %)
DCM	86 (53 %)
Otros	12 (8 %)

Parámetros hemodinámicos	
FE (%)	24±14
PAP (mmHg)	31 ± 9
PECP (mmHg)	21 ± 8
RVP (unidades Wood)	2,58 ± 1,41
Índice cardiaco (l/min/m ²)	2,20 ± 0,69
Hallazgos en laboratorio	
Creatinina (mg/dl)	1,32 ± 0,44
GSTP1 (ng/ml)	271 ± 173
proBNP (pg/ml)	1200 ± 630
Medicación	
Bloqueante de ACE	111 (69 %)
Antagonistas del receptor de la angiotensina II	39 (24 %)
Betabloqueante	131 (81 %)
Levosimendán (SIMPAX)	21 (13 %)
DCM = miocardiopatía dilatada; FE = fracción de eyección ventricular izquierda; ICM = miocardiopatía isquémica; IDDM = diabetes mellitus insulino dependiente; NIDDM = diabetes mellitus no insulino dependiente; NYHA = New York Heart association; PAP = presión arterial pulmonar; PECP = presión de enclavamiento capilar pulmonar; RVP = resistencia vascular pulmonar	

En la detección de matriz de proteínas dirigida de muestras en suero agrupadas en pacientes con CMP seleccionados la GSTP1 se identificó como una proteína novedosa que se asociará a CMP. La figura 6A muestra las imágenes de matrices de GSTP1 e indica que sus niveles de proteína en suero aumentan en pacientes con CMP en comparación con voluntarios sanos. Tras estos análisis de cribado, la concentración de GSTP1 en suero se determinó en la misma cohorte de pacientes seleccionada para los análisis de cribado por ELISA específico de GSTP1. Estos resultados muestran que las concentraciones de GSTP1 en suero aumentan significativamente en pacientes de HF en fase terminal en comparación con las muestras de control (figura 6B, $P \leq 0,001$).

Para aprender acerca de los niveles de proteína de GSTP1 de miocardio, se inició una caracterización de proteínas en tejido usando las muestras miocárdicas VI de los mismos pacientes de HF en fase terminal analizados por matrices en suero y se usaron biopsias miocárdicas VI de corazones donados como controles. Los resultados de la caracterización tisular indican niveles de expresión de GSTP1 elevados en el miocardio de pacientes de HF en fase terminal en comparación con los controles (figura 6C). Para validar estos hallazgos, se realizaron análisis de transferencia de Western en tejidos cardíacos y se encontraron niveles de expresión de proteína de GSTP1 aumentados en pacientes con HF en fase terminal en comparación con los controles ($P < 0,001$; figura 6D).

Asociación de GSTP1 y proBNP con FE

Para entender la asociación de GSTP1 con CMP, sus niveles en suero se analizaron en todos los pacientes del estudio y se representaron estos resultados en relación con la FE del paciente. Seleccionado este tipo de análisis, que permite la diferenciación entre FE conservada y reducida, se encontraron concentraciones de GSTP1 en suero significativamente mayores en pacientes con $FE \leq 22\%$ en comparación con todos los demás grupos de FE (figura 7A; $P < 0,0001$). Además, los pacientes con CMP con una FE entre el 23-32 % y una FE del 33-42 % tuvieron concentraciones en suero de GSTP1 significativamente mayores en comparación con los de una FE entre el 43-52 % o $> 52\%$ (figura 7A; $P < 0,0001$). El mismo tipo de análisis para proBNP en suero reveló que en la presente cohorte de pacientes únicamente aquellos con una $FE \leq 22\%$ tuvieron concentraciones de proBNP en suero significativamente mayores ($P < 0,0001$) en comparación con todos los demás grupos de FE, excepto para los pacientes con una FE entre el 33-42 % (figura 7B). No se observaron diferencias significativas para la proBNP circulante cuando se compararon otros grupos de FE. En toda la población, se apreció una relación positiva significativa entre GSTP1 y proBNP ($r = 0,47$, $P < 0,0001$; figura 7C).

Valor diagnóstico de GSTP1 en suero en comparación con proBNP en CMP

Para ilustrar la correlación entre GSTP1 y proBNP en suero con FE se realizó un análisis de diagrama de dispersión que incluyó todos los pacientes del estudio (figura 8A). Estos análisis revelaron una correlación negativa significativa ($r = -0,74$; $P < 0,0001$) entre GSTP1 y FE que era mayor que la correlación entre proBNP y FE ($r = -0,27$; $P = 0,0006$). Al introducir las mediciones de GSTP1 en suero en la curva ROC, el análisis para la $FE \leq 22\%$, que se identificó como significativamente diferente tanto para GSTP1 como proBNP en análisis de regresión logística univariados, a un nivel de corte óptimo de ≥ 226 ng/ml de GSTP1 en suero, tenía una sensibilidad del 81 % y una especificidad del

82 % para identificar una FE \leq 22 % (AUC = 0,891, P<0,0001). El mismo tipo de análisis a un nivel de corte de \geq 527 pg/ml reveló una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 26 % para proBNP en suero para diagnosticar pacientes con CMP con una FE \leq 22 % (AUC = 0,624, P = 0,0039) (figura 8B). Después, se analizó la capacidad de los niveles en suero de GSTP1 para diagnosticar grupos de pacientes de FE mayor, como se indica por los análisis univariados que se han mostrado anteriormente (proBNP no fue significativamente diferente entre los grupos de pacientes con FE>22 %). Los análisis de la curva ROC indicaron que GSTP1 a un nivel de corte óptimo de \geq 76 ng/ml diagnóstica pacientes con CMP con FE \leq 42 % con una sensibilidad del 93 % y una especificidad del 100 % (AUC = 0,974, P = 0,0008) (figura 8C).

10 Correlación de GSTP1 y proBNP con parámetros demográficos y clínicos

Las asociaciones entre GSTP1 y proBNP y las características clínicas de los pacientes del estudio se ilustran en la Tabla 3.

15 Tabla 3: Análisis de correlación de Spearman entre GSTP1 y proBNP y variables clínicas de los pacientes del estudio

Covariables	GSTP		proBNP	
	r _s	P	r _s	P
GSTP1 ng/ml			0,4690	<0,0001
FE	-0,7442	<0,0001	-0,2666	0,0006
Edad (años)	-0,1375	0,0241	0,1756	0,0259
PECP (mmHg)	0,0577	0,5027	-0,0451	0,6039
RVP (Unidades Wood)	-0,0620	0,4682	-0,0594	0,4908
Índice cardiaco (l/min/m ²)	-0,1103	0,2534	0,1531	0,1153
Creatinina (mg/dl)	-0,1560	0,0686	-0,0649	0,4543

FE = fracción de eyección; PAP = presión arterial pulmonar; PECP = presión de enclavamiento capilar pulmonar; RVP = resistencia vascular pulmonar.

Tanto para GSTP1 en suero (r = -0,137; P = 0,0241) como proBNP en suero (r = 0,175; P = 0,0259) únicamente se descubrió una ligera, pero no relevante, correlación con la edad de los pacientes entre los pacientes del estudio. No se observó una correlación significativa entre la concentración de GSTP1 en suero y la presión arterial pulmonar, la presión de enclavamiento capilar pulmonar, la resistencia vascular pulmonar, el nivel de creatinina en suero y el índice cardiaco. Asimismo, no se observó ninguna asociación al género y la diabetes mellitus (P \geq 0,408) ni para GSTP1 en suero ni para proBNP en suero.

25 Persisten brechas de tratamiento significativas en el uso de la gestión basada en la evidencia a pesar de los resultados optimistas de los ensayos clínicos aleatorios. La aparición de los biomarcadores cardíacos como herramientas clínicas cada vez más eficaces sugiere el potencial para dirigir con éxito la terapia y reducir la carga de enfermedad. Estudios innovadores han identificado una diversidad de marcadores moleculares novedosos de valor diagnóstico y pronóstico en CMP. ProBNP se acepta actualmente como un parámetro sustituto en el control de CMP, sin embargo, el trabajo de la rutina clínica indica resultados divergentes en pacientes con CMP. El propósito del presente estudio fue, por tanto, encontrar un marcador en suero de CMP no invasivo y que responda rápidamente que permita la monitorización de los pacientes con CMP tanto con FE reducida como conservada. La detección dirigida de acuerdo con la presente invención mostró que GSTP1 se asocia con la CMP en fase terminal. Las concentraciones séricas de GSTP1 diagnosticaron específicamente CMP con asociación significativa a FE independientemente de las características demográficas y clínicas en esta cohorte de pacientes. Cabe destacar que los coeficientes de correlación notablemente más altos se mostraron para la asociación de GSTP1 en suero a FE en comparación con proBNP. Además, la GSTP1 en suero muestra un mejor poder de diagnóstico en pacientes con CMP con FE \leq 22 % en comparación con proBNP. De manera más importante, la GSTP1 diagnosticó una FE \leq 42 %, mientras que proBNP no pudo.

Está bien establecido que la FE es un determinante del riesgo cardíaco en pacientes con CMP. La relación de riesgo para la mortalidad por todas las causas aumentó en un 39 % por cada reducción del 10 % en la FE por debajo del 45 %. Sin embargo, las características clínicas de CMP pueden aparecer en pacientes con una FE> 45 % denominada como CMP con FE conservada. Por lo tanto, el presente hallazgo de que GSTP1 es capaz de discriminar pacientes con CMP con una FE \leq 42% es de gran importancia diagnóstica y pronóstica. Aunque proBNP es una herramienta establecida para el diagnóstico de CMP y se correlaciona con FE, los valores indicados con respecto a proBNP son bastante divergentes y, evidentemente, son elevados tanto en CMP con FE conservada

como FE reducida, dando como resultado su uso clínico limitado. Por otra parte se recomienda usar proBNP principalmente para la exclusión de CMP con FE normal en pacientes con síntomas atribuidos a CMP. Sin embargo, dado que el género y la edad avanzada se asocian a mayores niveles de proBNP (Costello-Boerrigter y col., J. Am. Coll. Cardiol. 47 (2006), 345-353), las propiedades de diagnóstico propuestas de proBNP podrían ser demasiado
5 inespecíficas para diferenciar la CMP con FE conservada en pacientes de edad avanzada.

Aparentemente, proBNP puede predecir una FE <30 % con una sensibilidad y una especificidad del 90 % y del 71 %, respectivamente en una población de CMP con una FE <45 %. Otros estudios indicaron que proBNP en plasma detecta una FE <28 % con un 77 % de sensibilidad y un 69 % de especificidad en una cohorte de pacientes con una
10 FE <50 %, y se descubrió que proBNP puede predecir una FE <40 % con área bajo la curva de 0,69. En el presente estudio, proBNP tenía una sensibilidad del 97 % pero únicamente una especificidad del 26 % para diagnosticar una FE ≤22 % con un área bajo la curva de 0,62. La especificidad inferior de proBNP en el presente estudio puede explicarse por el hecho de que el nivel de corte se seleccionó para identificar FE inferiores en comparación con otros estudios. Este criterio se seleccionó para demostrar la utilidad de GSTP1 para diagnosticar una FE ≤22 %. Además,
15 el presente estudio no tenía ningún criterio de exclusión para FE y esto podría haber influido en las características del ensayo con respecto a proBNP que se había mostrado previamente que variaba en pacientes con CMP con FE conservada.

La razón de la elevación de GSTP1 en suero en pacientes con CMP no está clara. Sin embargo, se están
20 acumulando pruebas de que GSTP1 participa en la regulación de la señalización del estrés y protege las células contra la apoptosis a través de su actividad de unión a ligando no catalítica.

Los resultados del presente estudio muestran que la GSTP1 es un marcador sérico sensible, específico, económico y rápidamente medible superior a proBNP en CMP. Es importante destacar que, la GSTP1 discrimina entre FE
25 conservada y reducida con una alta sensibilidad y especificidad y, por lo tanto, puede servir como una herramienta novedosa en la orientación de los ensayos clínicos en pacientes con CMP.

3.: Modelo animal de IHD y CMP para tratamiento con GSTP1

30 Con el fin de tener un modelo que imite tanto la IHD como CMP en seres humanos, el modelo de ligadura de la ramificación anterior de la arteria coronaria izquierda en la rata se ha seleccionado para probar adicionalmente el principio de la presente invención. En este modelo, la IHD se induce tras la ligadura de dicha ramificación de la arteria coronaria, y con el tiempo, los animales desarrollarán posteriormente CMP. Por lo tanto, el modelo el más adecuado para mostrar la eficacia de la invención sugerida para la prevención o el tratamiento tanto de IHD como de
35 CMP.

Los siguientes experimentos se realizarán de acuerdo con el protocolo publicado por Aharinejad y col. (Cardiovasc. Res. 79 (2008), 395-404). La investigación se adaptará a la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals publicada por US National Institutes of Health (Publicación del NIH n.º 85-23, revisada 1996) y se confirmará por el
40 Institutional Ethics Committee at the Medical University of Vienna. El Prof. Dr. Seyed-hossein Aharinejad, MD, PhD estará al cargo del diseño y supervisión de la realización del estudio.

Se codificaron ratas Sprague Dawley macho (Harlan, Borchon, Alemania) para los experimentos. Debido al comprimido hemodinámico esperado, la fibrilación ventricular, la ruptura miocárdica y la hemorragia tras un infarto de
45 miocardio (MI), se espera que el número de animales supervivientes sea de aproximadamente el 60-70 %. Por lo tanto, en cada grupo con infarto de miocardio, se incluirán un total de 18 animales. Las ratas se anestesiaron con inyección por intraperitoneal de Ketazol (100 mg/kg de peso corporal) y Rompun (10 mg/kg de peso corporal), se intubarán por vía traqueal usando un catéter de calibre 14 y se ventilarán con Isoflurano al 1,5 % a 55 ciclos por minuto (volumen tidal: 2,5 ml) antes de someterlas a toracotomía lateral izquierda. La ramificación anterior de la
50 arteria coronaria izquierda (ACI) se ligará con un lazo de polipropileno 7-0 (Ethicon, Somerville, NJ) o se dejará intacta en un procedimiento simulado. El día (d) 7 posterior al MI, la función ventricular izquierda (VI) se evaluará por ecocardiografía. Después, los animales con una función cardíaca inicial comparable se codificarán y se asignarán a los grupos 1-8 como se muestra en la Tabla 4. Para tratar el dolor esperado tras MI, los animales recibirán inmediatamente después de la inducción de MI, y el primer día posterior al MI, 0,6 mg/100 g de peso corporal de
55 Piritramid (Dipidolor® en una solución de glucosa al 5 %) s.c. Además, los animales recibirán Piritramid a través de su agua para beber durante 3 días a 0,6 mg/100 g de peso corporal (250 ml de agua más 20 ml de solución de glucosa al 5 %) y los días 4-7 posteriores al MI a 0,3 mg/100 g de peso corporal.

El d7, inmediatamente después de la inducción del MI, el tratamiento comenzará en los grupos 1-4 como se indica a

continuación. El grupo 1 recibirá a diario inyecciones por vía intraperitoneal de solución de Ringer durante dos semanas (control), mientras que los grupos 2-4 recibirán inyecciones diarias de GSTP1 recombinante a una dosis de 10, 20 y 40 mg/peso corporal durante dos semanas, respectivamente. El d21, el tratamiento comenzará en los grupos 5-8 como se indica a continuación. El grupo 5 recibirá inyecciones por vía intraperitoneal a diario de solución de Ringer durante dos semanas (control), mientras que los grupos 6-8 recibirán inyecciones diarias de GSTP1 recombinante a una dosis de 10, 20 y 40 mg/peso corporal durante dos semanas, respectivamente. El grupo 9 incluye 10 animales con procedimiento simulado. El d52 y d86, la función VI se evaluará de nuevo, y los animales se sacrificarán el día 88 posterior al MI.

10

Tabla 4: Grupos de animales y su tratamiento

Grupo	Tratamiento	Sacrificio	N.º de animales	Aplicación y dosis
1	Ringer	d88	18	i.p.
2	GSTP1	d88	18	i.p., 10 mg/kg de pc, 2 semanas
3	GSTP1	d88	18	i.p., 20 mg/kg de pc, 2 semanas
4	GSTP1	d88	18	i.p., 40 mg/kg de pc, 2 semanas
5	Ringer	d88	18	i.p.
6	GSTP1	d88	18	i.p., 10 mg/kg de pc, 2 semanas
7	GSTP1	d88	18	i.p., 20 mg/kg de pc, 2 semanas
8	GSTP1	d88	18	i.p., 40 mg/kg de pc, 2 semanas
9	Simulado	d88	10	-
N.º total de animales		154	154	
pc: peso corporal				

Grupo	Tratamiento	Sacrificio	N.º de animales	Aplicación y dosis
1	Ringer	d88	18	i.p.
2	GSTP1	d88	18	i.p., 10 mg/kg de pc, 2 semanas
3	GSTP1	d88	18	i.p., 20 mg/kg de pc, 2 semanas
4	GSTP1	d88	18	i.p., 40 mg/kg de pc, 2 semanas
5	Ringer	d88	18	i.p.
6	GSTP1	d88	18	i.p., 10 mg/kg de pc, 2 semanas
7	GSTP1	d88	18	i.p., 20 mg/kg de pc, 2 semanas
8	GSTP1	d88	18	i.p., 40 mg/kg de pc, 2 semanas
9	Simulado	d88	10	
N.º total de animales			154	

Se evaluaron los siguientes parámetros (1-11): 1. Fracción de eyección VI (FE), volumen sistólico final VI (VSF), volumen diastólico final VI (VDF) usando ecocardiografía

2. Relación corazón con respecto al peso corporal

3. Histología e inmunocitoquímica para tamaño de infarto, espesor de la pared de infarto y fibrosis, así como angiogénesis, proteínas inflamatorias, incluyendo p38, jun cinasa e interleucinas (únicamente se mencionan ejemplos para las rutas inflamatorias)

4. Rutas de señalización

5. Ensayos de unión a promotor

6. Ensayo TÚNEL para evaluación de la apoptosis

7. RT-PCR cuantitativa, así como transferencia de Western, e inmunoprecipitación para la evaluación de GSTP1 y relacionada con sus rutas, TRAF, TNF- α y sus receptores; MMP y sus inhibidores TIMP, VEGF-A y sus receptores (únicamente se mencionan ejemplos aquí)

8. ELISA de niveles de GSTP1 en suero y proteínas relacionadas

15 Todos los datos se codificarán y se almacenarán usando Microsoft ACCESS. El análisis de varianza (ANOVA; prueba de t o ANOVA no paramétrico) y la prueba chi² se usarán basándose en la dependencia del parámetro a analizar (numérico o alfanumérico, distribución normal o no) para comparar los datos entre los grupos. La prueba de correlación de Spearmans y el análisis de regresión logística se usarán para evaluar la correlación entre los

parámetros evaluados. Se usará SAS versión 9.1.3 para los análisis estadísticos.

4.: Efecto del tratamiento con GSTP1 sobre la inflamación, morfología cardíaca y función en un modelo de rata de infarto de miocardio agudo e insuficiencia cardíaca inducida por isquemia.

5

El siguiente experimento demuestra el principio, si el tratamiento con glutatión S-transferasa P1-1 (GSTP1) es beneficioso para contrarrestar las cascadas inflamatorias activadas tras un infarto de miocardio agudo y en el proceso de la insuficiencia cardíaca inducida por isquemia resultado en un modelo de rata experimental aceptado.

10 Materiales y métodos

Animales y modelo de infarto de miocardio

Todos los experimentos se aprobaron por el Institutional Animal Care and Use Committee at the Vienna Medical University. Se codificaron para los experimentos un número total de 60 ratas macho Sprague Dawley (Harlan, Borchon, Alemania). Debido al compromiso hemodinámico, la fibrilación ventricular, la ruptura miocárdica y la hemorragia tras un infarto de miocardio, el número de animales supervivientes con función cardíaca inicial comparable fue de 48. Las ratas se anestesiaron, se intubaron por vía traqueal y se ventilaron con una mezcla de oxígeno/isoflurano antes de someterse a una toracotomía lateral izquierda. Después, la ramificación de la arteria coronaria izquierda se ligó con un lazo de polipropileno 7-0 (Ethicon, Somerville, NJ, Estados Unidos). Se aplicó una inyección de dosis individual intraperitoneal de GSTP1 recombinante (1 mg/kg disuelto en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS); $n = 24$) (Assay Design, Ann Arbor, MI) o 1 ml de PBS ($n = 24$), 1 h después de la inducción del infarto de miocardio. La función ventricular izquierda (VI) se evaluó mediante ecocardiografía un día ($n = 48$) y tres semanas ($n = 24$) después de la inducción del infarto de miocardio como se describe a continuación. Después, se sacrificaron un total de 12 animales en cada grupo un día después del tratamiento; y los 12 animales restantes en cada grupo se sacrificaron 3 semanas después de la inducción del infarto de miocardio (Aharinejad y col., 2008).

Mediciones hemodinámicas por ecocardiografía

30

En ratas anestesiadas, se midieron las longitudes del eje largo VI máximas (L) y el trazado del área endocárdica usando una cabeza de exploración de matriz lineal de 15 MHz para calcular el volumen diastólico final VI (VDFVI) y sistólica final VI (VSFVI) y la fracción de eyección VI (FEVI = $VDFVI - VSFVI / VDFVI$). Las mediciones utilizaron tres ciclos cardíacos consecutivos (Aharinejad y col., 2008).

35

Histología e inmunquímica

Los ventrículos se cortaron en sección transversal en el punto medio de su eje largo, antes de que fueran congelados o fijados por inmersión en formalina. Las muestras incluidas en parafina se usaron para H&E, ensayo Tunnel, así como tinción de colágeno tricrómica de Goldner. Los ensayos TUNEL (kit de detección de muerte celular *in situ*) se realizaron por triplicado de acuerdo con el protocolo del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Suiza). Los portaobjetos se contratiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) y se incluyeron en antifadent AF1 (Citifluor, Leicester, Reino Unido). Se obtuvieron imágenes digitales por microscopía de fluorescencia (Nikon, Melville, NY). La morfometría se realizó como se describe (Aharinejad y col., 2008).

45

Aislamiento de ARNm y RT-PCR en tiempo real cuantitativa

Se aisló ARN total de tejidos de miocardio usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el sistema MagNA Lyser (Roche, Mannheim, Alemania) como se describe (Aharinejad y col., 2008). Las mediciones por RT-PCR en tiempo real por triplicado se realizaron en un instrumento LightCycler (Roche) como se describe (Aharinejad y col., 2008). Las secuencias de cebador eran de sentido/antisentido: GSTP1: 5'-GGCAACTGAAGCCTTTTGAG-3'/5'-TCATGGATCAGCAGCAAGTC-3'; factor 2 asociado al receptor del factor de la necrosis tumoral (TRAF2): 5'-GCAGAAG-GTCTTGGAGATGG-3'/5'-GGTGGAGCAGCATTAAAGGTC-3'; y β 2-microglobulina: 5'-GATGAGTATGCCTGCCGTGTG-3'/5'-CAATCCAAATGCG-GCATCT-3'. La expresión de ARNm se calculó y se representó para animales tratados como porcentaje con respecto al de los controles.

55

Co-inmunoprecipitación y transferencia de Western

Los lisados de tejido cardiaco se prepararon como se describe (Schäfer y col., 2003). Para la detección de los complejos GSTP1-TRAF2, GSTP1-JNK1 y GSTP1-p38, las proteínas (500 µg) se inmunoprecipitaron con 0,5 µg de anticuerpos correspondientes contra TRAF2 (BD Pharmingen, San Diego, CA), JNK1 y p38 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Los inmunocomplejos se incubaron con A/G PLUS-perlas de agarosa (Santa Cruz Biotechnology) y se precipitaron mediante transferencia de Western usando el anticuerpo GSTP1 (Bethyl, Montgomery, TX) como se describe (Schäfer y col., 2003). Las transferencias se incubaron con anticuerpos GSTP1 monoclonales humanos primarios (Bethyl) y TRAF2 (BD Pharmingen) o phospho-p38 policlonales (Promega, Madison, WI), phospho-JNK1, JNK1 y p38 (Santa Cruz Biotechnology) antes de la incubación con anticuerpos secundarios (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los niveles de expresión se corrigieron para la proteína de carga de control.

Análisis estadístico

15 Todos los parámetros se compararon entre los grupos por la prueba χ^2 y un análisis de varianza unidireccional (ANOVA unidireccional; prueba de Tukey) de acuerdo con la escala de la variable (continua o categórica). Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el sistema SAS para Windows, versión 9.1.3 y la Enterprise Guide, versión 4.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). El significado estadístico se ajustó a $P < 0,05$. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE).

Resultados

GSTP1 mejora la sobreexpresión miocárdica de citocinas inflamatorias tras un MI agudo

25 La inmunoprecipitación y los análisis de transferencia de Western revelaron que en el modelo de infarto de miocardio agudo, el tratamiento con GSTP1 no cambió la formación de los complejos GSTP1-TRAF2 (figura 9A). La transferencia de Western reveló que, aunque GSTP1 puede reducir los niveles de proteína de tejido cardiaco de JNK1 activada ($p < 0,01$; figura 9B), no hubo ninguna diferencia en los niveles de expresión de proteínas de P38 y NF- κ B activadas en comparación con los controles. Además, la GSTP1 inhibió las expresiones de tejido cardiaco de las citocinas inflamatorias, incluyendo TGF- β , IL-1 β , IL-2 e IL-17 ($p < 0,01$; figura 9C) en comparación con los controles; aunque los niveles de expresión de IL-10 no cambiaron significativamente tras el tratamiento con GSTP1 (figura 9C).

35 GSTP1 mejora la expresión miocárdica de las citocinas proinflamatorias a través de la señalización de NF- κ B regulada por TRAF2 en el miocardio dañado

La inmunoprecipitación y los análisis de transferencia de Western revelaron que las ratas tratadas con GSTP1 tuvieron una formación significativamente aumentada de complejos GST-P1-TRAF2, GSTP1-JNK1 y GSTP1-p38 en su tejido cardiaco dañado 3 semanas posteriores al MI en comparación con los controles ($p < 0,001$; figura 10A). Además, las ratas tratadas con GSTP1 tuvieron una expresión de proteínas significativamente reducida de JNK1 y p38 activadas en su tejido de miocardio dañado en comparación con los controles ($p < 0,001$; figura 10B). Además, las ratas tratadas con GSTP1 tuvieron menores expresiones de ARNm de tejido cardiaco de TGF- β , IL-1 β , IL-2 e IL-17 en comparación con los controles ($P \leq 0,001$; figura 10C). Por el contrario, la expresión de ARNm de tejido cardiaco de la citocina antiinflamatoria IL-10 se aumentó significativamente en animales tratados con GSTP1 en comparación con los controles ($p < 0,001$; figura 10C). Estos resultados muestran que el tratamiento con GSTP1 inhibe la señalización proinflamatoria de JNK1, p38 y NF- κ B mediada por TRAF2 y mejora la expresión de citocinas miocárdicas en la insuficiencia cardiaca inducida por isquemia.

50 GSTP1 mejora la remodelización en el miocardio dañado de rata

Los análisis morfométricos revelaron que el espesor de la pared VI se aumentó en ratas tratadas con GSTP1 ($2,2 \pm 0,4$ mm) en comparación con las ratas de control ($1,3 \pm 0,5$ mm; figuras 11A y 11B). Para analizar el efecto del tratamiento con GSTP1 sobre el tejido miocárdico de rescate en las zonas infartadas y periinfartadas, se realizó un ensayo TUNEL. Los resultados de estos ensayos muestran una reducción significativa de los eventos apoptóticos en la zona infartada y periinfartada de los animales tratados con GSTP1 en comparación con los animales de control (figura 11C y 11D). Estos datos muestran que el tratamiento con GSTP1 reduce significativamente la remodelación miocárdica y la apoptosis tisular miocárdica posterior al MI en el corazón dañado de rata.

GSTP1 mejora la función cardiaca

Habiendo mostrado que la GSTP1 es eficaz contrarrestando la inflamación y la remodelación miocárdica en un modelo de rata de insuficiencia cardiaca inducida por isquemia y de infarto de miocardio agudo, se probó la función VI en el miocardio de rata dañado. Los resultados mostraron que la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) 3 semanas posteriores al MI era significativamente mayor en ratas tratadas con GSTP1 en comparación con el grupo no tratado ($p < 0,05$, figura 12A). Además, el volumen diastólico final VI (VDFVI) se mejoró (disminuyó) significativamente en el grupo tratado con GSTP1 3 semanas posteriores al MI en comparación con los animales de control ($p < 0,05$, figura 12B). Estos datos muestran que el tratamiento con GSTP1 mejora significativamente la FEVI y atenúa la dilatación VI asociada a la insuficiencia cardiaca inducida por isquemia

El papel de los mediadores inflamatorios en la fisiopatología de la insuficiencia cardiaca ha adquirido un creciente interés en las últimas dos décadas. Diferentes estudios experimentales han descrito el efecto inotrópico negativo de TNF- α en la función VI. Además, se ha indicado que TNF- α promueve la remodelación del VI, la hipertrofia cardiaca y la pérdida de cardiomiocitos progresiva a través de la apoptosis. La evidencia creciente sobre el papel patológico de los mediadores inflamatorios en el ajuste de la insuficiencia cardiaca ha dado lugar a una serie de ensayos clínicos multicéntricos que están diseñados para direccionar el TNF- α en pacientes con insuficiencia cardiaca. Sin embargo, los resultados de estos ensayos fueron desalentadores. Una explicación de estos resultados es que los bajos niveles fisiológicos de TNF- α pueden ser importantes para la remodelación y reparación de tejido cardiaco. De acuerdo con este argumento, estudios experimentales han descrito una función opuesta de TNF- α en la remodelación tisular cardiaca a través de sus dos receptores diferentes TNFR1 y TNFR2. Se ha mostrado que, mientras que TNFR1 agrava la remodelación, la hipertrofia y la apoptosis, TNFR2 mejora estos eventos. Sin embargo, el mecanismo del efecto mediado por TNFR2 en la insuficiencia cardiaca aún no está claro. Recientemente, se ha mostrado que TRAF2 es un regulador central de la señalización de TNF- α que media la activación de MAPK. Además, la interacción entre TNFR2 y TRAF2 da como resultado la activación de NF- κ B. Además, se ha indicado que GSTP1 es un regulador negativo importante de la señalización inducida por TNF- α mediante la formación de interacciones con TRAF2. En este sentido, la GSTP1 puede inhibir la activación de MAPK en líneas celulares neoplásicas indirectamente a través de su interacción con TRAF2 o directamente a través de su interacción con JNK1 y P38. Estos resultados, junto con los hallazgos de la presente invención de que GSTP1 y TRAF2 aumentan en pacientes con insuficiencia cardiaca, muestran que la formación del complejo GSTP1-TRAF2 está asociada a la patogénesis de la insuficiencia cardiaca. Los experimentos de cultivo tisular en pacientes con insuficiencia cardiaca revelaron que, aunque la adición de TNF- α puede suprimir el efecto antiinflamatorio de GSTP1, este efecto puede conservarse aumentando la dosis de GSTP1. Las propiedades antiinflamatorias de GSTP1 se aprobaron por los actuales resultados *in vivo*. El modelo experimental usado en el presente documento reveló que la GSTP1 fue capaz de mejorar la reacción inflamatoria y disminuir la remodelación cardiaca después de la inducción de MI. De forma interesante, la GSTP1 no fue únicamente capaz de suprimir los mediadores proinflamatorios como; IL-1, IL-2, JNK1, P38 y NF- κ B, sino que también pudo aumentar la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10. Además, los resultados de acuerdo con la presente invención revelaron que la GSTP1 protege el tejido cardiaco contra la apoptosis en el corazón dañado. De acuerdo con esto, se ha mostrado en ámbitos oncológicos que la GSTP1 atenúa la autofosforilación de la cinasa 1 reguladora de la señal de la apoptosis potenciada por TRAF2 (ASK1) y, por lo tanto, inhibe la apoptosis celular inducida por TRAF2-ASK1 suprimiendo la interacción de TRAF2 y ASK1.

En conclusión, la presente invención proporciona una función novedosa de la GSTP1 en la modulación de la activación de JNK1/p38 causada por TNF- α /TRAF2 en la insuficiencia cardiaca. La inhibición selectiva de la señalización inflamatoria mediada por TNF- α /TRAF2 mediante GSTP1 fue debido a que el presente modelo animal mostró ser un tratamiento beneficioso para pacientes con miocardiopatías o enfermedades cardiacas isquémicas, especialmente para pacientes con infarto de miocardio e insuficiencia cardiaca.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Medizinische Universität wien

55 <120> Uso de GSTP1

<130> R 57040

<150> EP 09174692.5
 <151> 30-10-2009

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 1

Met Pro Pro Tyr Thr Val Val Tyr Phe Pro Val Arg Gly Arg Cys Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Arg Met Leu Leu Ala Asp Gln Gly Gln Ser Trp Lys Glu Glu
 20 25 30

Val Val Thr Val Glu Thr Trp Gln Glu Gly Ser Leu Lys Ala Ser Cys
 35 40 45

Leu Tyr Gly Gln Leu Pro Lys Phe Gln Asp Gly Asp Leu Thr Leu Tyr
 50 55 60

Gln Ser Asn Thr Ile Leu Arg His Leu Gly Arg Thr Leu Gly Leu Tyr
 65 70 75 80

Gly Lys Asp Gln Gln Glu Ala Ala Leu Val Asp Met Val Asn Asp Gly
 85 90 95

Val Glu Asp Leu Arg Cys Lys Tyr Ile Ser Leu Ile Tyr Thr Asn Tyr
 100 105 110

Glu Ala Gly Lys Asp Asp Tyr Val Lys Ala Leu Pro Gly Gln Leu Lys
 115 120 125

Pro Phe Glu Thr Leu Leu Ser Gln Asn Gln Gly Gly Lys Thr Phe Ile
 130 135 140

Val Gly Asp Gln Ile Ser Phe Ala Asp Tyr Asn Leu Leu Asp Leu Leu
 145 150 155 160

Leu Ile His Glu Val Leu Ala Pro Gly Cys Leu Asp Ala Phe Pro Leu
 165 170 175

Leu Ser Ala Tyr Val Gly Arg Leu Ser Ala Arg Pro Lys Leu Lys Ala
 180 185 190

Phe Leu Ala Ser Pro Glu Tyr Val Asn Leu Pro Ile Asn Gly Asn Gly
 195 200 205

Lys Gln
 210

<210> 2
 <211> 633
 <212> ADN
 <213> humano

ES 2 630 654 T3

<400> 2
 atgccgccct acaccgtggt ctatttccca gttcgaggcc gctgcgcggc cctgcgcatg 60
 ctgctggcag atcagggcca gagctggaag gaggaggtgg tgaccgtgga gacgtggcag 120
 gagggctcac tcaaagcctc ctgcctatac gggcagctcc ccaagttcca ggacggagac 180
 ctcaccctgt accagtccaa taccatcctg cgtcacctgg gccgcaccct tgggctctat 240
 ggggaaggacc agcaggaggc agccctggtg gacatggtga atgacggcgt ggaggacctc 300
 cgctgcaaat acgtctccct catctacacc aactatgagg cgggcaagga tgactatgtg 360
 aaggcactgc ccgggcaact gaagcctttt gagaccctgc tgtcccagaa ccagggaggc 420
 aagaccttca ttgtgggaga ccagatctcc ttcgctgact acaacctgct ggacttgctg 480
 ctgatccatg aggtcctagc ccctggctgc ctggatgctg tccccctgct ctcagcatat 540
 gtggggcgcc tcagcgcgcc gcccaagctc aaggccttcc tggcctcccc tgagtacgtg 600
 aacctcccca tcaatggcaa cgggaaacag tga 633

5 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> cebador

15 <400> 3
 ggcaactgaa gcctttgag 20

20 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador

25 <400> 4
 tcatggatca gcagcaagtc 20

30 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador

35 <400> 5
 gcagaaggtc ttgagatgg 20

40 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

ES 2 630 654 T3

	<220> <223> cebador	
5	<400> 6 ggtggagcag cattaaggtc	20
10	<210> 7 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> cebador	
15	<400> 7 gatgagtatg cctgccgtg g	21
20	<210> 8 <211> 19 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> cebador	
25	<400> 8 caatccaaat gcggcatct	19
30	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> cebador	
35	<400> 9 ccaaaggagg tgagcttcat	20
40	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 10 tctaccagc atggaggaac	20

REIVINDICACIONES

1. Glutación S-transferasa P1 (GSTP1) para su uso en la prevención o tratamiento de miocardiopatías.
- 5 2. GSTP1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la miocardiopatía es miocardiopatía dilatada, especialmente miocardiopatía congestiva; miocardiopatía hipertrófica obstructiva, especialmente estenosis subaórtica hipertrófica; otra miocardiopatía hipertrófica, especialmente miocardiopatía hipertrófica no obstructiva; miocardiopatía isquémica, enfermedad endomiocárdica (eosinófila), especialmente fibrosis endomiocárdica (tropical) o endocarditis de Löfller; fibroelastosis endocárdica, especialmente miocardiopatía
10 congénita; otra miocardiopatía restrictiva, especialmente miocardiopatía constrictiva SAI; miocardiopatía alcohólica, miocardiopatía debida a fármacos y otros agentes externos, miocardiopatías sin especificar, especialmente miocardiopatía (primaria)(secundaria) SAI; miocardiopatía en enfermedades infecciosas y parasitarias, especialmente miocardiopatía en difteria; miocardiopatía en enfermedades metabólicas, especialmente amiloidosis
15 cardiaca; miocardiopatía en enfermedades nutricional, especialmente miocardiopatía nutricional SAI; tofos gotosos de enfermedad cardiaca o enfermedad cardiaca tirotóxica.
3. GSTP1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizada por que** se usa en un medicamento que se administra por vía parenteral, preferiblemente, por vía intraperitoneal o intravenosa, especialmente por vía intravenosa.
20
4. GSTP1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** el medicamento se administra en una dosificación de 0,001 a 100 mg de GSTP1/kg, preferiblemente de 0,01 a 10 mg de GSTP1/kg, especialmente de 0,1 a 1 mg de GSTP1/kg, a un ser humano individual, preferiblemente a través de administración intravenosa.
25
5. GSTP1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, **caracterizada por que** el medicamento se administra en una dosificación de 0,1 a 10000 U de GSTP1/kg, preferiblemente de 1 a 1000 U de GSTP1/kg, especialmente de 10 a 100 U de GSTP1/kg, a un ser humano individual, preferiblemente a través de administración intravenosa.
30
6. Composición farmacéutica que comprende GSTP1, preferiblemente GSTP1 humana recombinante o GSTP1 de placenta humana, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la prevención o tratamiento de miocardiopatías.
- 35 7. Composición de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada por que** contiene de 1 a 100000 U de GSTP1, preferiblemente de 10 a 10000 U de GSTP1, especialmente de 10 a 1000 U de GSTP1.
8. Composición de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, **caracterizada por que** contiene un tampón, preferiblemente un tampón fosfato, un tampón Tris-HCl o un tampón HEPES, con un pH de 5,5 a 9,0, preferiblemente de 6,0 a 8,5, especialmente de 6,5 a 8,0.
40
9. Uso de GSTP1 o ARNm de GSTP1 para el diagnóstico *in vitro* de miocardiopatía.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** la miocardiopatía es una
45 miocardiopatía de acuerdo con la reivindicación 2.
11. Un método *in vitro* para diagnosticar miocardiopatías, especialmente una miocardiopatía de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** la cantidad de GSTP1 o ARNm de GSTP1 en una muestra biológica se determina y se compara con una muestra biológica con una miocardiopatía definida, especialmente con una
50 muestra biológica de un individuo sano.
12. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado por que** la muestra biológica es una sangre humana, plasma o muestra sérica o una muestra humana de biopsia de miocardio.

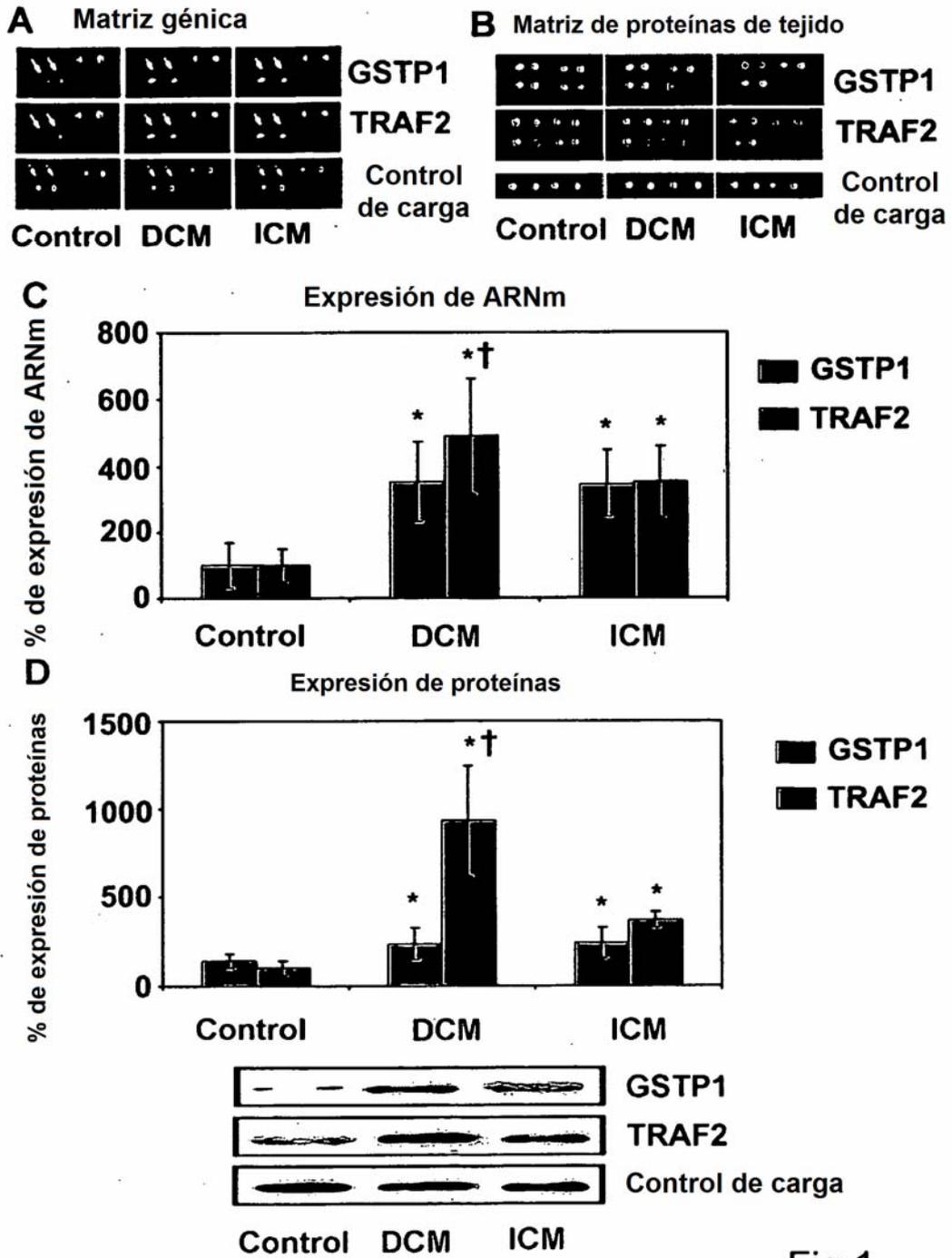


Fig.1

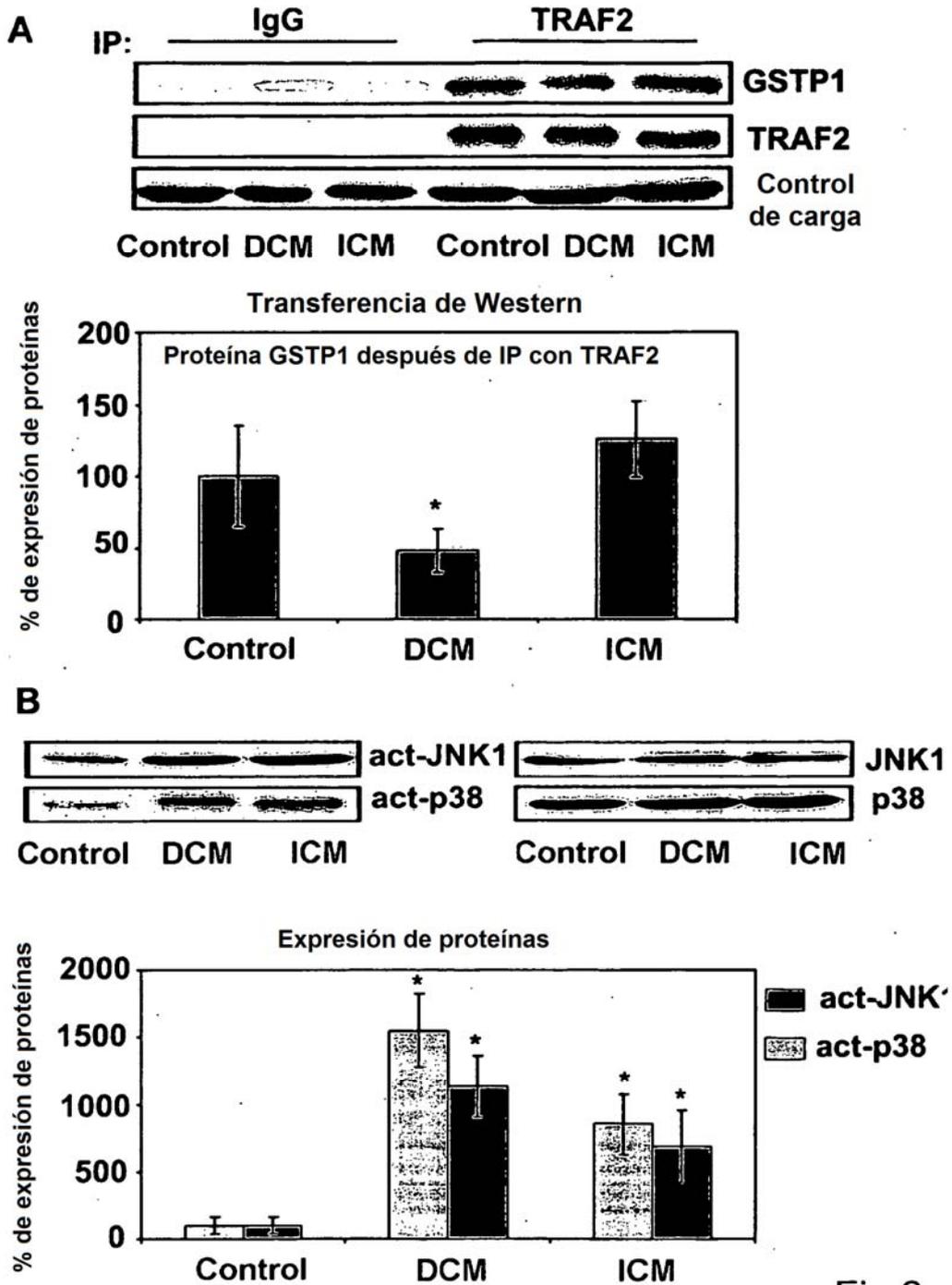


Fig.2

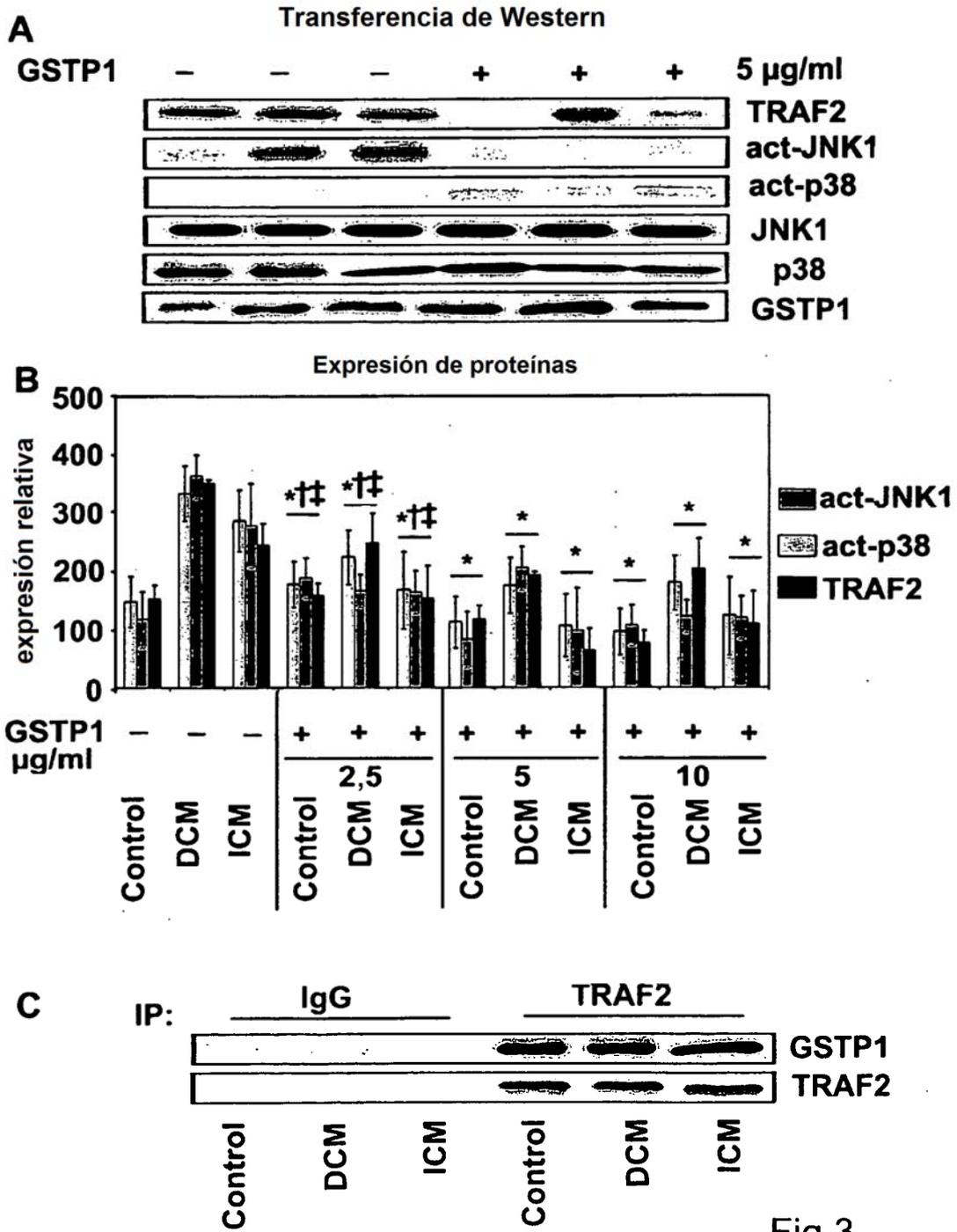


Fig.3

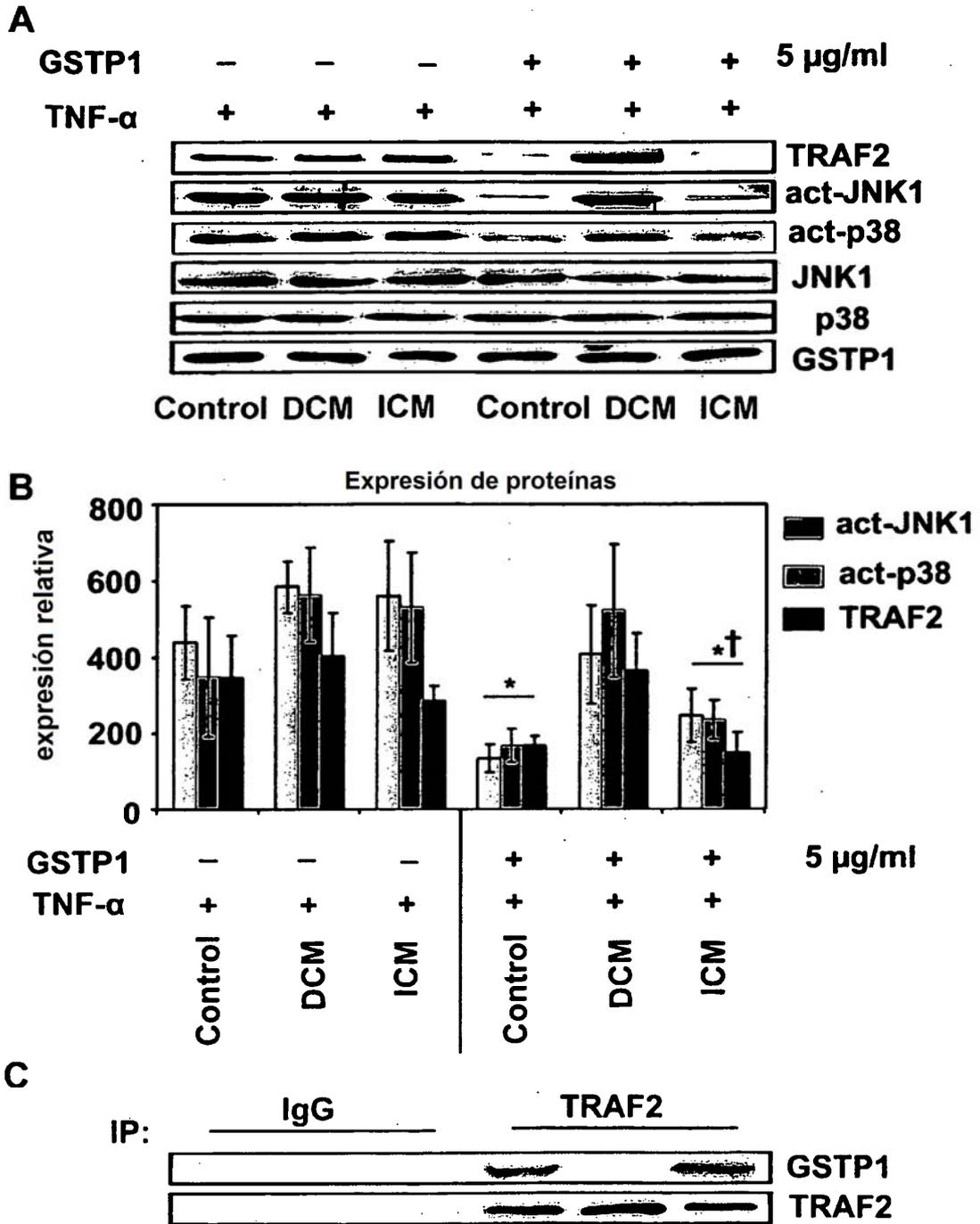


Fig.4

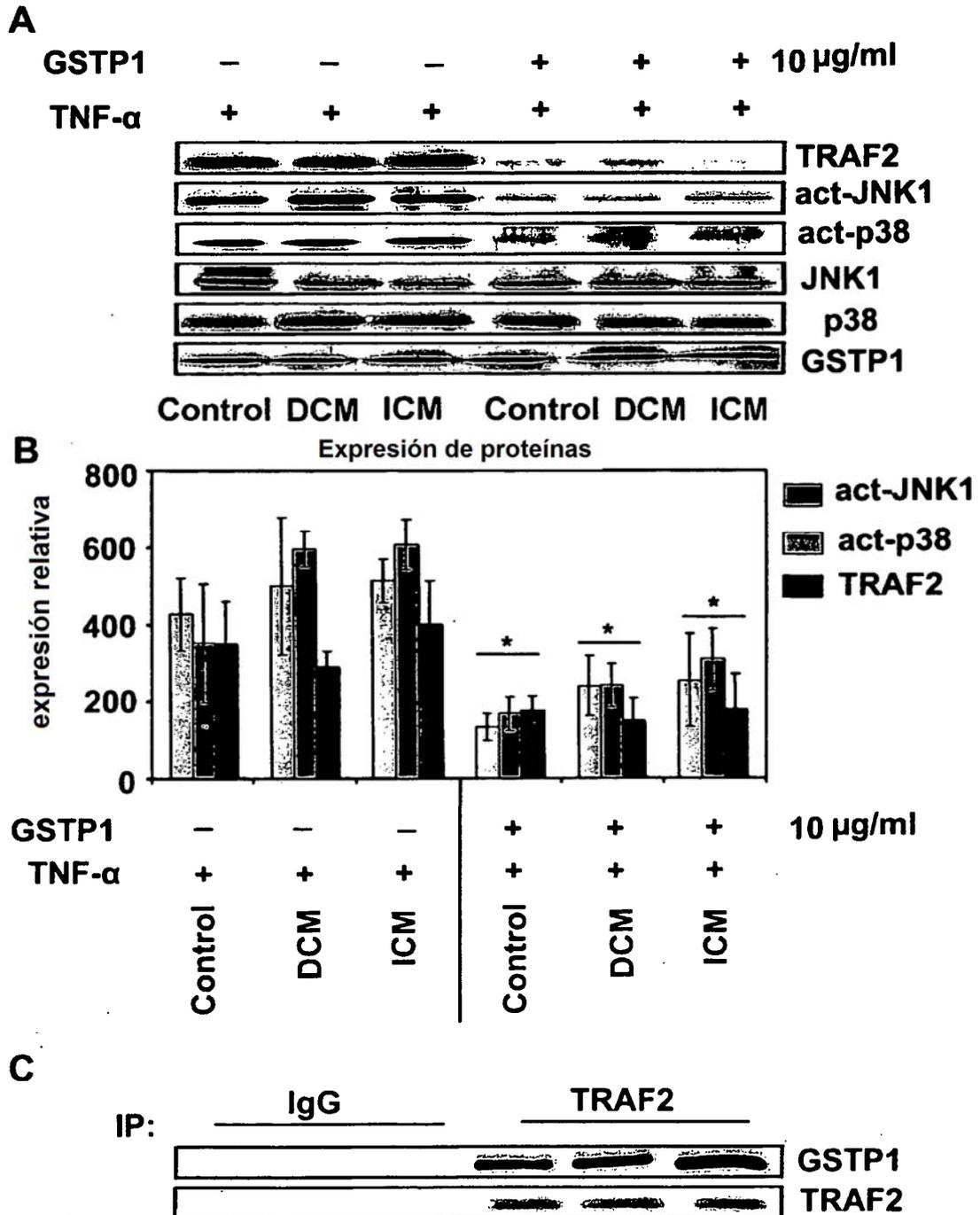


Fig.5

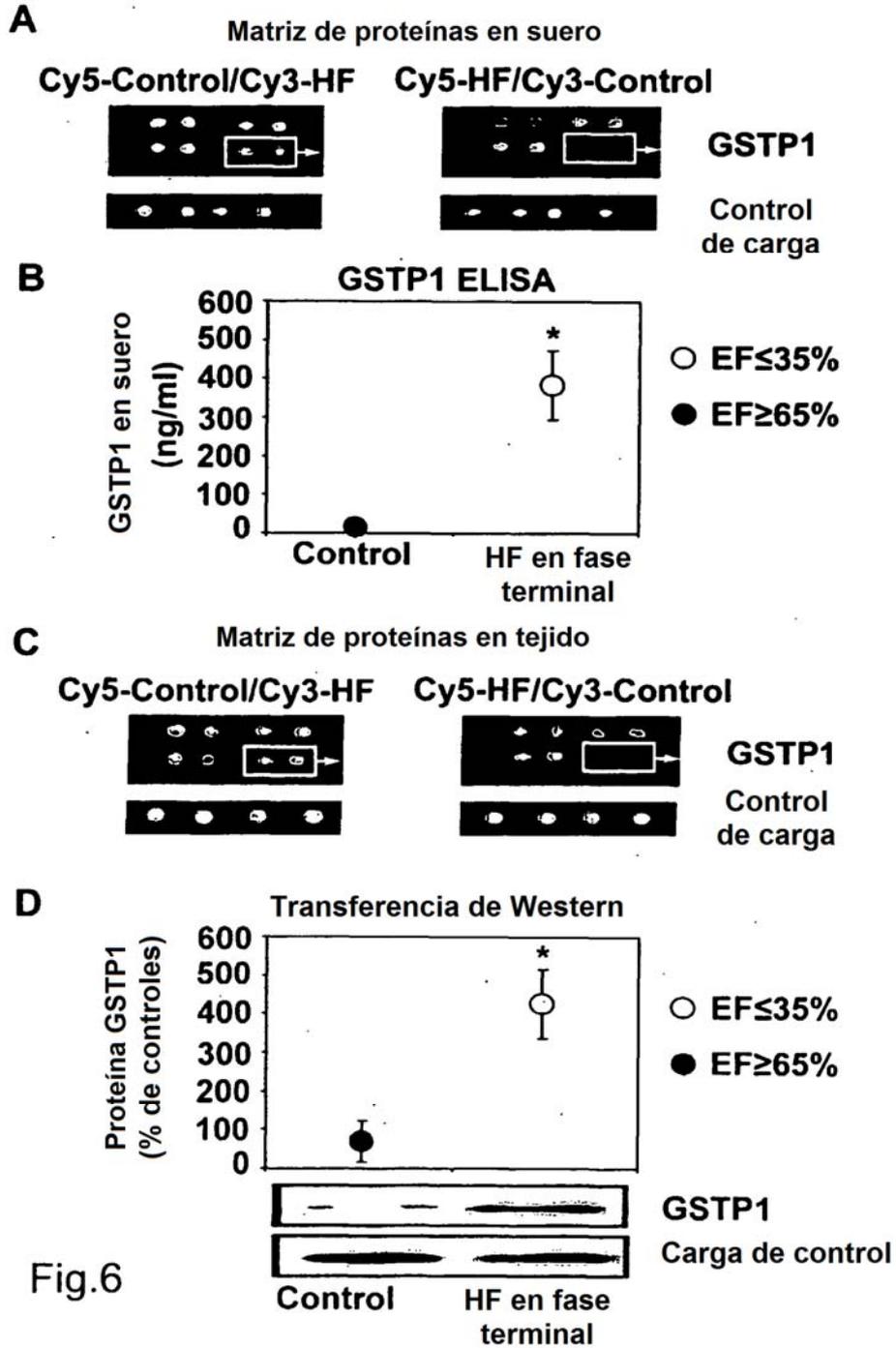


Fig.6

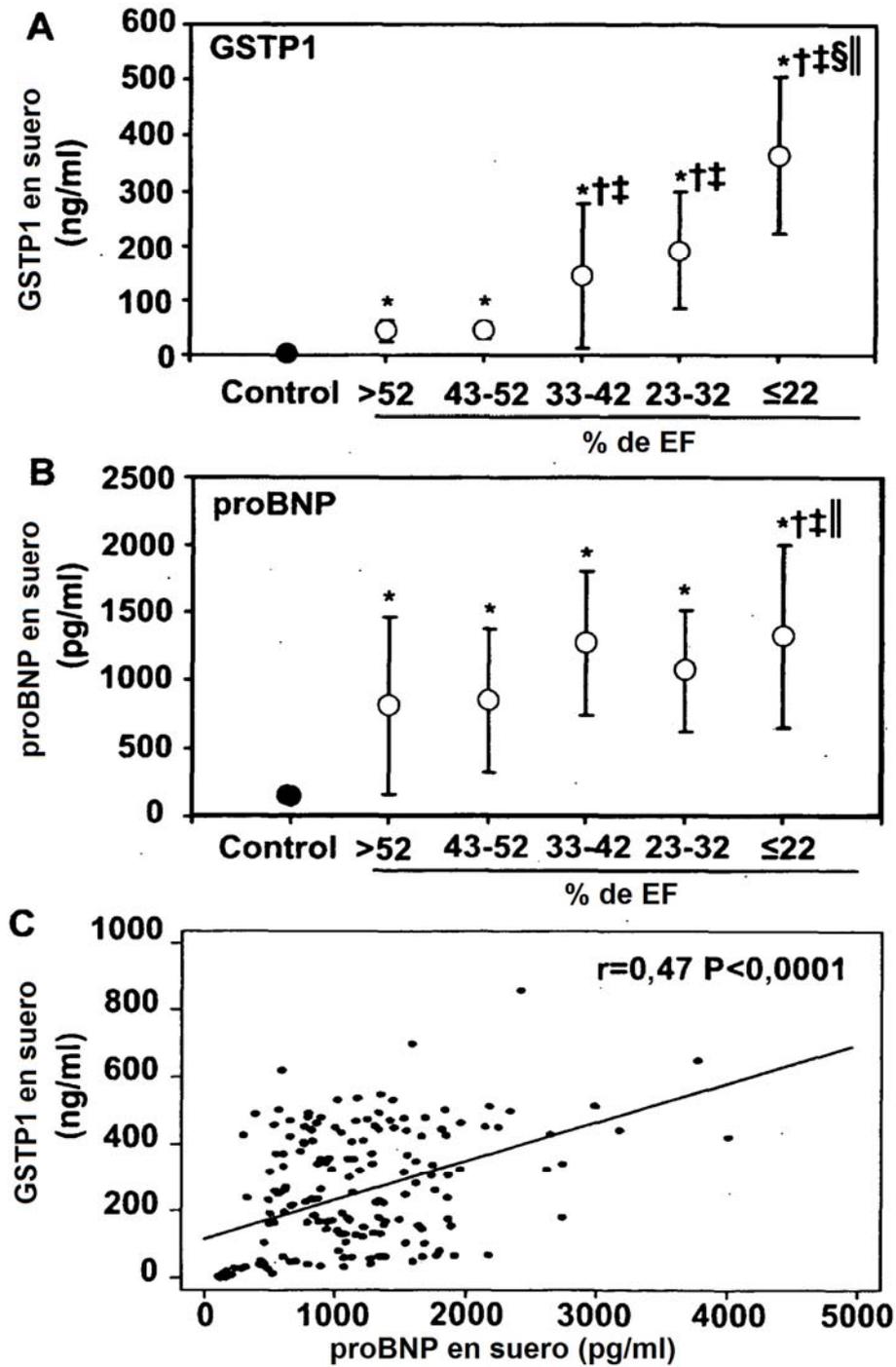


Fig.7

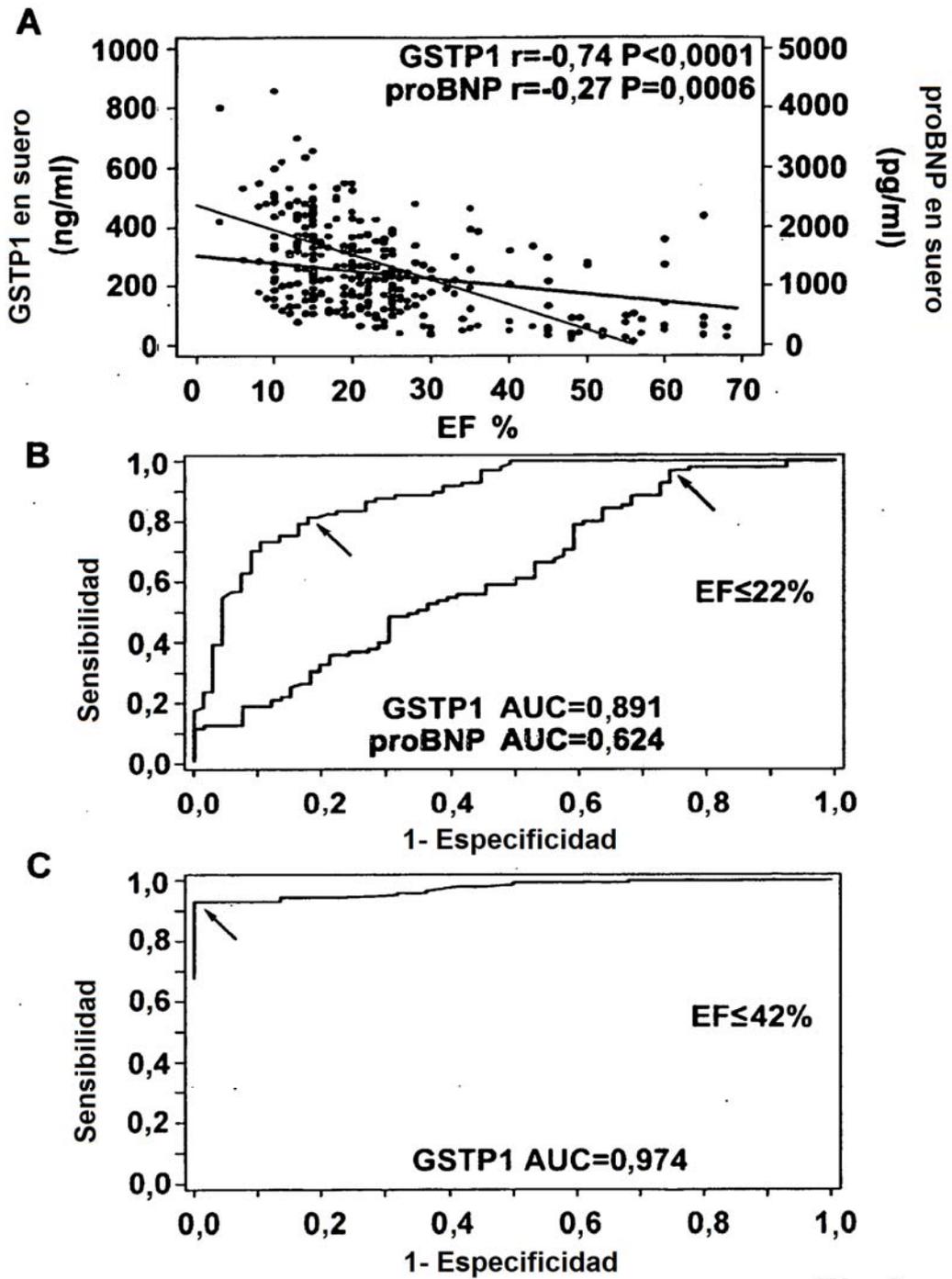


Fig.8

Modelo de MI agudo

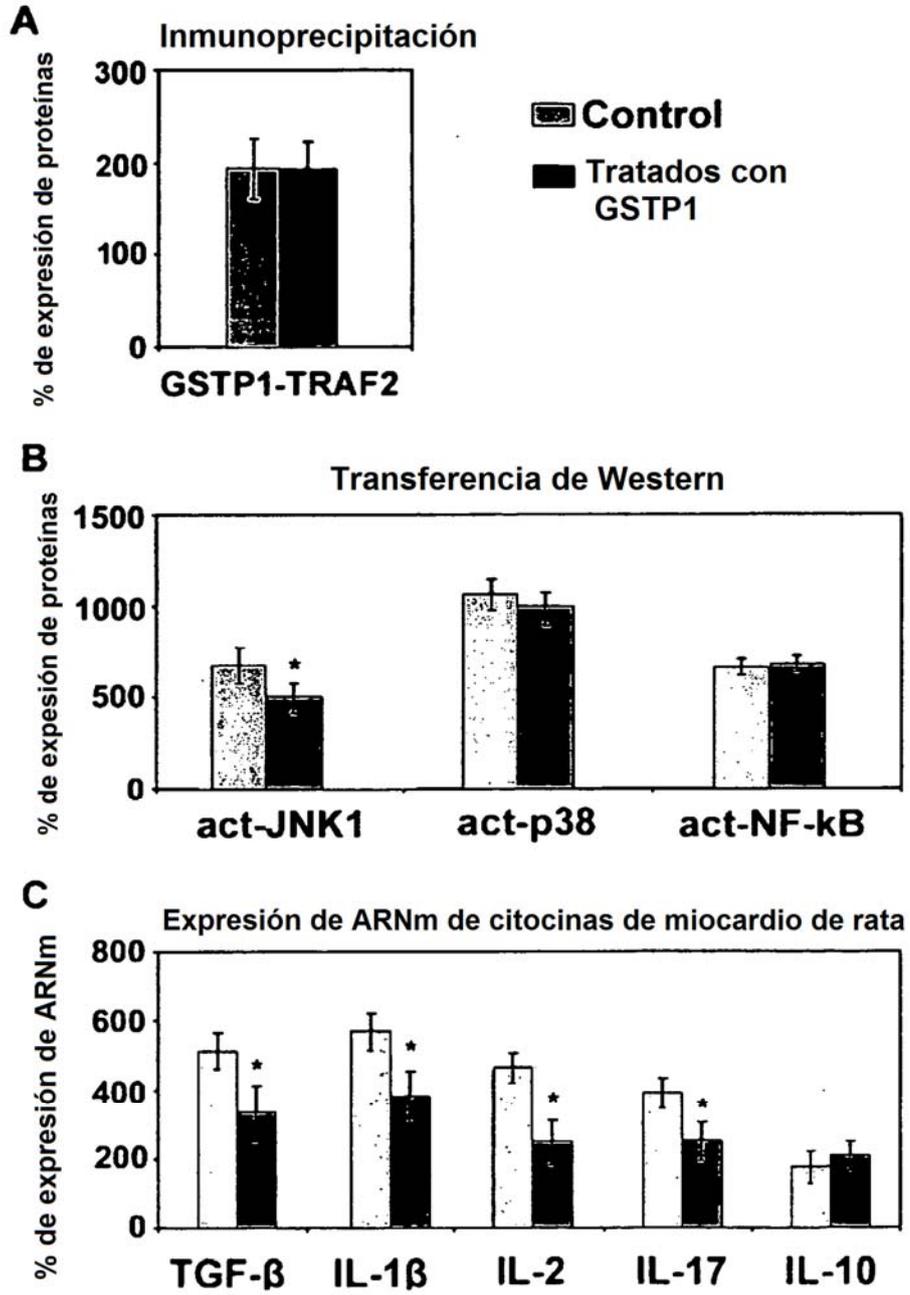


Fig.9

Modelo de insuficiencia cardiaca

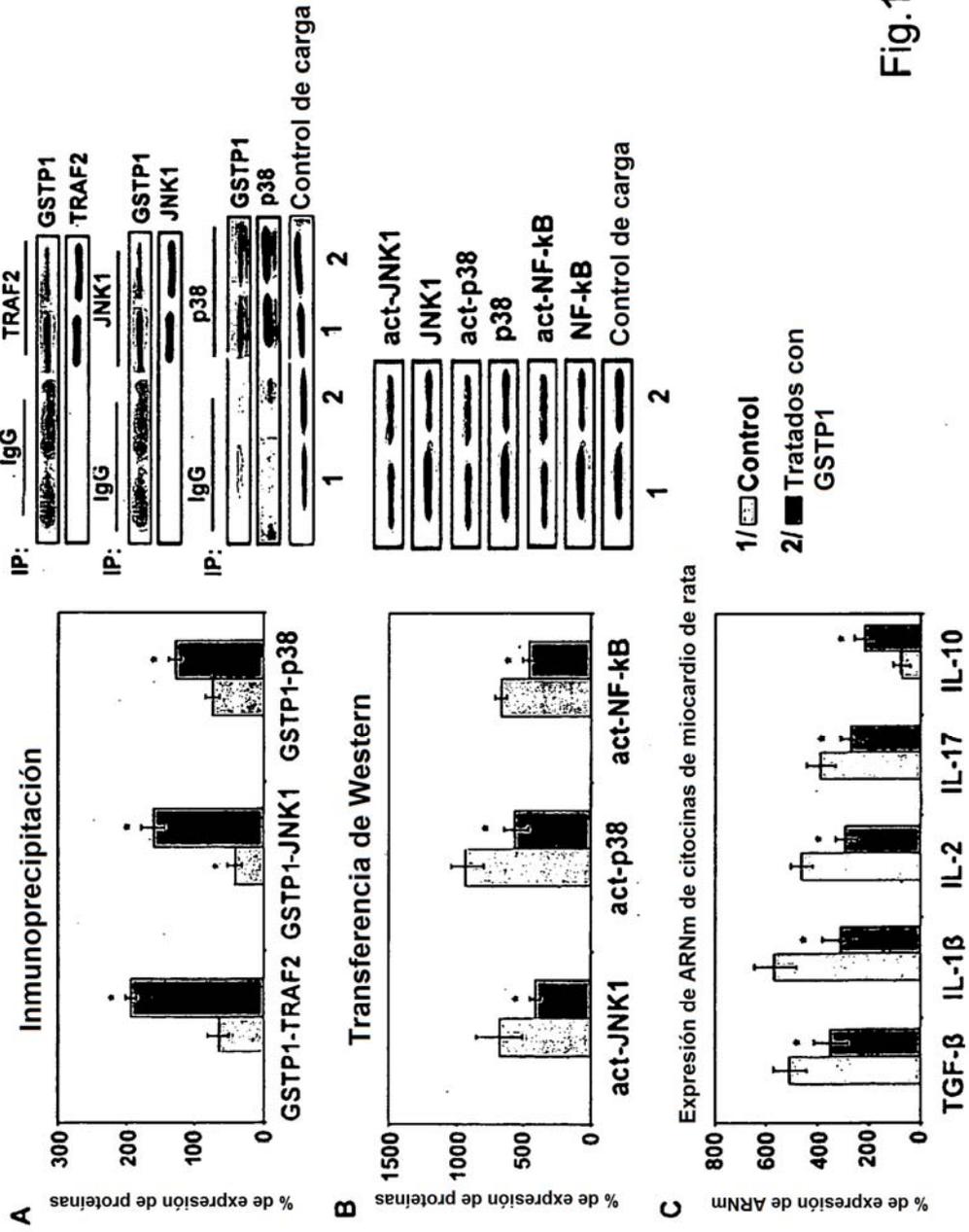


Fig.10

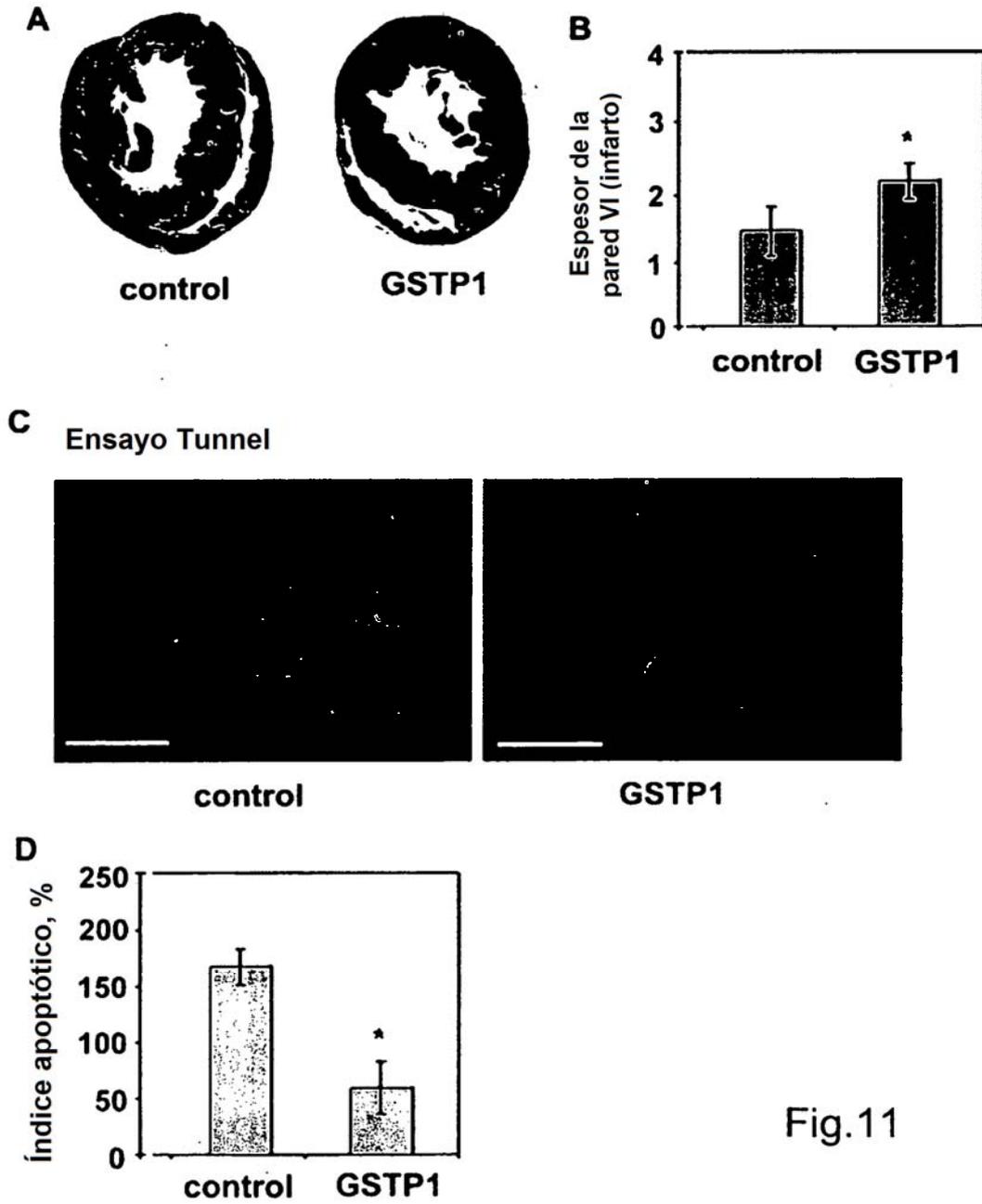


Fig.11

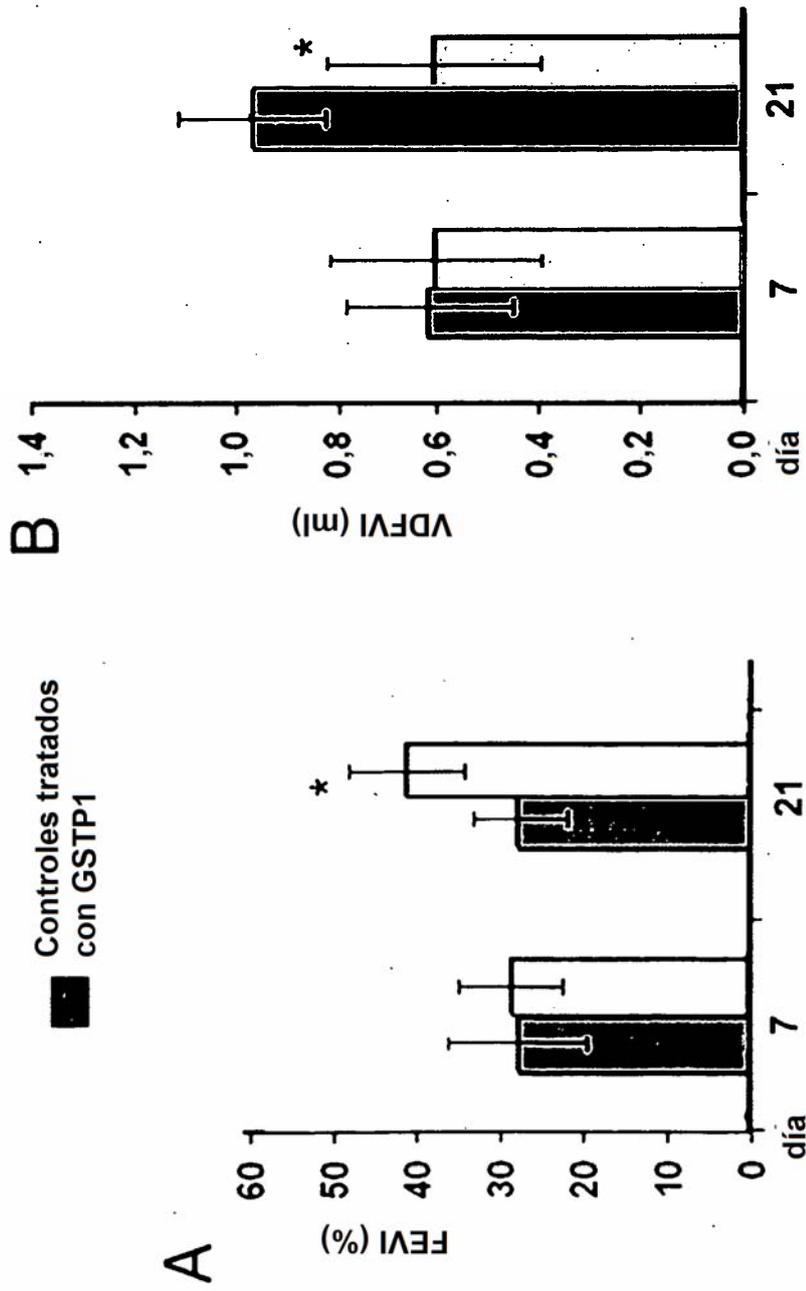


Fig.12