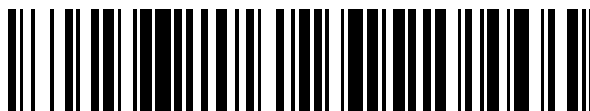


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 570**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2010 PCT/EP2010/065852**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11048173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010 E 10782210 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2491401**

54 Título: **MCAM como un biomarcador para la homeostasis de líquidos**

30 Prioridad:

21.10.2009 EP 09173601
21.10.2009 US 253658 P
23.10.2009 US 254537 P
17.03.2010 EP 10156705
17.03.2010 US 314789 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2018

73 Titular/es:

MYCARTIS N.V. (100.0%)
Technologiepark 4
9052 Gent, BE

72 Inventor/es:

KAS, KOEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 674 570 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

MCAM como un biomarcador para la homeostasis de líquidos

5 Campo de la invención

La presente solicitud desvela biomarcadores basados en proteínas y/o péptidos y agentes que se unen específicamente con los mismos, para su uso en la predicción, el diagnóstico, el pronóstico y/o la supervisión de enfermedades y afecciones en sujetos, en particular la homeostasis de líquidos alterada y la disfunción sistólica; y métodos, kits y dispositivos relacionados.

10

Antecedentes de la invención

El mantenimiento de la homeostasis tiene importancia crucial para la supervivencia de todos los organismos vivos. Cualquier organismo mantiene su estructura y sus funciones por medio de una multiplicidad de equilibrios dinámicos controlados de forma rigurosa por mecanismos de regulación interdependientes, en bucles de retroalimentación positivos y negativos particulares. Dichos mecanismos están preparados para reaccionar a cada cambio en el ambiente, o a cada alteración aleatoria, mediante una serie de modificaciones de mismo tamaño y dirección opuesta a las que crearon la alteración. El objetivo de estas modificaciones es mantener los equilibrios internos. Prácticamente todos los procesos o sistemas fisiológicos en mamíferos, tales como seres humanos, están sujetos a supervisión y control homeostáticos. Los ejemplos incluyen por ejemplo la homeostasis térmica, homeostasis circadiana, homeostasis metabólica, homeostasis endocrina, homeostasis neural, homeostasis respiratoria y homeostasis de líquidos.

15

20

25

30

35

Por un lado, muchas enfermedades resultan de la alteración de la homeostasis, una afección conocida como desequilibrio homeostático. Por otro lado, muchas enfermedades provocan de hecho desequilibrio homeostático. Con el envejecimiento, todos los organismos perderán con el tiempo eficacia en uno o más de sus sistemas de control. Las ineficacias dan como resultado gradualmente un ambiente interno inestable que aumenta el riesgo de enfermedad. Además, el desequilibrio homeostático también es responsable de los cambios físicos asociados con el envejecimiento. Aún más grave que la enfermedad y otras características del envejecimiento es la muerte. Las enfermedades que resultan de un desequilibrio homeostático, donde los mecanismos de retroalimentación negativa nominales se ven sobrepasados y toman entonces el control mecanismos de retroalimentación positiva destructivos, incluyen por ejemplo insuficiencia cardíaca, diabetes, deshidratación, hipoglucemia, hiperglucemia, gota y cualquier enfermedad provocada por una toxina presente en el torrente sanguíneo. Las enfermedades o los trastornos que pueden provocar desequilibrio homeostático, en particular homeostasis de líquidos o agua desequilibrada, incluyen por ejemplo hiponatremia, hipernatremia, deficiencia de glucocorticoides, hipotiroidismo, cirrosis, insuficiencia cardíaca congestiva e insuficiencia renal avanzada.

40

En muchas enfermedades y afecciones, un resultado favorable de tratamientos profilácticos y/o terapéuticos está fuertemente correlacionado con predicción, diagnóstico y/o pronóstico tempranos y/o precisos y supervisión cuidadosa de la enfermedad o afección. Por lo tanto, existe una necesidad continua de formas adicionales y preferentemente mejoradas de predicción, diagnóstico y/o pronóstico tempranos y/o precisos y supervisión de enfermedades y afecciones para guiar las opciones de tratamiento.

45

Puede estar claro que el diagnóstico, la predicción el pronóstico y/o la supervisión precisos y fiables del desequilibrio homeostático, y en particular el desequilibrio de homeostasis de líquidos o agua, así como diferenciación adecuada entre condiciones sobrellenadas e infrallenadas son necesarios para el tratamiento eficaz. La presente invención aborda las necesidades anteriores en la técnica identificando biomarcadores para homeostasis de líquidos alterada y parámetros asociados con la misma, y proporcionando usos para los mismos.

50

La insuficiencia cardíaca es un problema de salud pública importante en los países desarrollados y es la causa de morbilidad y mortalidad considerables entre los adultos de mayor edad. En general, los cambios en la función cardíaca asociados con la insuficiencia cardíaca dan como resultado una reducción del gasto cardíaco. Habitualmente es una enfermedad crónica caracterizada por descompensación recurrente frecuente que conduce a empeoramiento de problemas respiratorios. Además, 5 años después del diagnóstico el 50 % de los enfermos de insuficiencia cardíaca habrán muerto de la enfermedad.

55

Hay varias causas subyacentes a la insuficiencia cardíaca. Específicamente la disfunción sistólica y disfunción diastólica conduce a remodelación cardíaca y función cardíaca alterada, que dan como resultado reducción del gasto cardíaco. Ambas disfunciones se caracterizan por defectos en la función de bombeo del corazón. La disfunción sistólica resulta de una pérdida de inotropía (contractilidad) intrínseca, más probablemente debido a alteraciones en los mecanismos de transducción de señales responsables de la regulación de la inotropía, y se caracteriza por defectos en el vaciado del corazón, en particular el ventrículo, de sangre durante la contracción (es decir, la sístole). Se produce disfunción diastólica cuando el ventrículo se hace menos flexible (es decir, "más rígido"), que altera la carga ventricular y como tal se caracteriza por defectos en el llenado del corazón, en particular el ventrículo, de sangre durante la relajación (es decir, la diástole).

60

65

Como tal, la patofisiología de la disfunción sistólica y diastólica difiere, ya que los mecanismos compensatorios intrínsecos para hacer frente a ambas disfunciones difieren. Aunque la disfunción sistólica y diastólica comparten algunos síntomas comunes, la naturaleza del tratamiento difiere al menos parcialmente. Mientras que los bloqueadores beta e inhibidores de ACE están indicados para el tratamiento de la disfunción tanto sistólica como diastólica, posiblemente en combinación con diuréticos, los fármacos inotrópicos por ejemplo, tales como digoxina, están indicados específicamente para el tratamiento de la disfunción sistólica (y contraindicados para el tratamiento de la disfunción diastólica) y por ejemplo los bloqueadores del canal de calcio están indicados específicamente para el tratamiento de la disfunción diastólica (y contraindicados para el tratamiento de la disfunción sistólica).

El documento WO2006/020936 enseña métodos para evaluar cambios en la homeostasis cardiovascular, pero no se refiere a la homeostasis de líquidos alterada.

Barden *et al.* (Developmental Dynamics, 2005, 232(1): 232-244) enseña que la atenuación de la expresión de la proteína CD146 obstaculiza el desarrollo vascular en el pez cebra.

Sumario de la invención

Habiendo realizado experimentos y ensayos exhaustivos, los inventores han revelado que la molécula de adhesión celular del melanoma (MCAM, también conocida como CD146 o MUC18) representa un nuevo biomarcador ventajoso para evaluar la homeostasis de líquidos, específicamente para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar el desequilibrio homeostático, en particular la homeostasis de líquidos corporales alterada y parámetros asociados.

Los inventores han descubierto que los niveles de MCAM se correlacionan con el estado de llenado de líquido de un sujeto. Se descubrió que los niveles de MCAM estaban elevados en sujetos con alto contenido de líquidos o retención de líquidos, es decir homeostasis de líquidos corporales/agua alterada, en comparación con sujetos con contenido de líquidos comparablemente menor, es decir homeostasis de líquidos corporales/agua normal.

Por lo tanto, se desvela un método para determinar la homeostasis de líquidos en un sujeto que comprende medir la cantidad de MCAM en una muestra de dicho sujeto; particularmente se desvela un método para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar la homeostasis de líquidos o agua alterada en un sujeto, que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra de dicho sujeto.

Como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva, la medición de los niveles de MCAM y/u otros biomarcador o biomarcadores en una muestra de un sujeto puede indicar particularmente que la fase de examen de un método comprende medir la cantidad de MCAM y/o dichos otros biomarcador o biomarcadores en la muestra del sujeto. Se entiende que los métodos de predicción, diagnóstico, pronóstico y/o supervisión de enfermedades, afecciones, síntomas o valores de parámetros generalmente comprenden una fase de examen en la que se recogen datos de y/o acerca del sujeto.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para predecir, diagnosticar, supervisar y/o pronosticar hipervolemia en un sujeto que comprende las etapas de:

- (i) medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto, en donde la muestra es sangre, suero o plasma;
- (ii) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un valor euvolémico, en donde una cantidad aumentada de MCAM indica que el sujeto está sobrellenado o indica un mal pronóstico para dicho sobrellenado en el sujeto.

En una realización, dicho método comprende las etapas de:

- (i) medir la cantidad de MCAM en muestras del sujeto de dos o más puntos temporales sucesivos;
- (ii) comparar la cantidad de MCAM entre las muestras medidas en (i);
- (iii) encontrar una desviación o ausencia de desviación en la cantidad de MCAM entre las muestras comparadas en (ii);
- (iv) atribuir dicho hallazgo de desviación o ausencia de desviación a un cambio en la hipervolemia en el sujeto entre los dos o más puntos temporales sucesivos.

La supervisión puede aplicarse en el transcurso de un tratamiento médico del sujeto.

Los presentes métodos que miden MCAM como un biomarcador pueden por lo tanto determinar si un sujeto está sobrellenado o hipervolémico (es decir, tiene una presión o volumen de llenado vascular aumentado o está sujeto a acumulación de líquidos o sobrecarga de volumen). También se desvela que la medición de MCAM como un

biomarcador puede determinar por lo tanto si un sujeto está infraleno o hipovolémico (es decir, tiene presión o volumen de llenado vascular reducido o está sujeto a drenaje de líquidos o contracción de volumen); o si un sujeto tiene presión o volumen de llenado normal (eurolémico).

5 Se desvela en el presente documento que una cantidad aumentada o reducida (es decir, una desviación) de MCAM en la muestra del sujeto en comparación con un valor de referencia que representa el diagnóstico o la predicción de homeostasis de líquidos no alterada (es decir, normal, eurolémica) o que representa un buen pronóstico para homeostasis de líquidos alterada indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener homeostasis de líquidos alterada o indica un mal pronóstico para homeostasis de líquidos alterada en el sujeto. En una realización una cantidad aumentada de MCAM en la muestra del sujeto en comparación con dicho valor de referencia eurolémico indica que el sujeto está sobreleno o en riesgo de estar sobreleno o indica un mal pronóstico para dicho sobreleno en el sujeto. En otra realización una cantidad reducida de MCAM en la muestra del sujeto en comparación con dicho valor de referencia eurolémico indica que el sujeto está infraleno o en riesgo de estar infraleno o indica un mal pronóstico para dicho infraleno en el sujeto.

15 Como alternativa, una cantidad comparable (es decir, ausencia de desviación) de MCAM en la muestra del sujeto en comparación con un valor de referencia que representa el diagnóstico o la predicción de homeostasis de líquidos no alterada (es decir, normal, eurolémica) o que representa un buen pronóstico para homeostasis de líquidos alterada indica que el sujeto no tiene o no está en riesgo de tener homeostasis de líquidos alterada o indica un buen pronóstico para homeostasis de líquidos alterada en el sujeto. Como alternativa, una cantidad comparable (es decir, ausencia de desviación) de MCAM en la muestra del sujeto en comparación con un valor de referencia que representa el diagnóstico o la predicción de homeostasis de líquidos alterada o que representa un mal pronóstico para homeostasis de líquidos alterada indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener homeostasis de líquidos alterada o indica un mal pronóstico para homeostasis de líquidos alterada en el sujeto.

25 En una realización del método de supervisión de la homeostasis de líquidos como se desvela en el presente documento, un aumento o una reducción de la cantidad de MCAM en una muestra de un punto temporal posterior de los puntos temporales sucesivos en relación con una muestra de un punto temporal anterior de los puntos temporales sucesivos es indicativo respectivamente de un aumento o una reducción de la presión o el volumen de llenado vascular en el sujeto entre dichos puntos temporales posterior frente a anterior. Sin limitación, un aumento de la presión o el volumen de llenado vascular puede ser perjudicial (por ejemplo, en un paciente que padece sobreleno) o beneficioso (por ejemplo, en un paciente que padece infraleno). Una reducción de la presión o el volumen de llenado vascular puede ser perjudicial (por ejemplo, en un paciente que padece infraleno) o beneficioso (por ejemplo, en un paciente que padece sobreleno).

35 En una realización, dicha hipervolemia o estado de llenado u homeostasis de líquidos se caracteriza por un volumen de llenado vascular o una presión de llenado vascular aumentados (usados indistintamente a lo largo de la memoria descriptiva) del sujeto. En una realización adicional, dicha hipervolemia o estado de llenado u homeostasis de líquidos se caracteriza por un aumento de peso debido a la acumulación de líquidos en dicho sujeto. Por lo tanto, en una realización, el aumento de peso representa edema, tal como edema pulmonar o edema de las extremidades inferiores, y la pérdida de peso representa hidratación. El edema o la deshidratación pueden estar relacionados con el aumento de peso o la pérdida de peso, respectivamente, particularmente en una situación de sobreleno.

45 Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un sujeto necesita o no (tal como, por ejemplo, aún o ya no necesita) una terapia para tratar la hipervolemia, que comprende:

- (i) medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto, en donde la muestra es sangre, suero o plasma;
- (ii) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un valor eurolémico, en donde una cantidad aumentada de MCAM indica que el sujeto necesita una terapia para tratar la hipervolemia.

55 A modo de ejemplo y no de limitación, un paciente que tenga hipervolemia tras su ingreso o durante su estancia en un centro de cuidados médicos puede ensayarse como se enseña en el presente documento con respecto a la necesidad de continuar con un tratamiento de dicha hipervolemia y puede dársele el alta cuando dicho tratamiento ya no sea necesario o sea necesario solamente en una medida limitada dada.

La terapia desvelada es:

- (i) una terapia para restaurar la homeostasis de líquidos reduciendo la presión o el volumen de llenado vascular o invirtiendo el aumento de peso debido a la acumulación de líquidos, si la cantidad de MCAM en dicha muestra es mayor que dicho valor de referencia, en donde dicho valor de referencia representa homeostasis de líquidos normal (eurolémica) y/o el valor de referencia representa un valor umbral por encima del cual el valor es indicativo de la necesidad de una terapia para reducir el volumen de llenado vascular o para invertir el aumento de peso debido a la acumulación de líquidos; o

- (ii) una terapia para restaurar la homeostasis de líquidos aumentando la presión o el volumen de llenado vascular o invirtiendo la pérdida de peso debida al drenaje de líquidos, si la cantidad de MCAM en dicha muestra es menor que dicho valor de referencia, en donde dicho valor de referencia representa homeostasis de líquidos normal (euvolémica) y/o el valor de referencia representa un valor umbral por debajo del cual el valor es indicativo de la necesidad de una terapia para aumentar el volumen de llenado vascular o para invertir la pérdida de peso debida al drenaje de líquidos.

Se desvela en el presente documento un método para determinar si un sujeto necesita o no una terapia para ajustar el estado de llenado o la presión o el volumen de llenado vascular que comprende:

- (i) medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto;
- (ii a) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un valor umbral por encima del cual el valor es indicativo de la necesidad de una terapia para reducir el contenido de líquidos (reducir la presión o el volumen de llenado vascular); y/o
- (ii b) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un valor umbral por debajo del cual el valor es indicativo de la necesidad de una terapia para aumentar el contenido de líquidos (aumentar la presión o el volumen de llenado vascular); y
- (iii a) inferir a partir de un valor de MCAM mayor en dicha muestra en comparación con dicho valor de referencia en (ii a) la necesidad de una terapia para reducir el contenido de líquidos en dicho sujeto o la necesidad de detener una terapia para aumentar el contenido de líquidos; y/o
- (iii b) inferir a partir de un valor de MCAM menor en dicha muestra en comparación con dicho valor de referencia en (ii b) la necesidad de una terapia para aumentar el contenido de líquidos en dicho sujeto o la necesidad de detener una terapia para reducir el contenido de líquidos.

En una realización, dicha terapia para restaurar la homeostasis de líquidos reduciendo el contenido de líquidos, la presión o el volumen de llenado vascular y/o invertir el aumento de peso debido a la acumulación de líquidos comprende administrar agentes diuréticos exógenos y/o endógenos y/o ultrafiltración para retirar sales y el líquido correspondiente de la circulación. Los ejemplos de diuréticos que pueden usarse según la invención incluyen pero sin limitación sales acidificantes tales como CaCl_2 y NH_4Cl ; antagonistas del receptor de arginina vasopresina 2 tales como anfotericina B y citrato de litio inhiben la acción de la vasopresina; hidruréticos tales como Goldenrod y Juniper; antagonistas del intercambiador de Na-H tales como dopamina; inhibidores de la anhidrasa carbónica tales como acetazolamida y dorzolamida; diuréticos del asa tales como bumetanida, ácido etacrínico, furosemida y torsemida; diuréticos osmóticos tales como glucosa (especialmente en diabetes descontrolada) y manitol; diuréticos ahorradores de potasio tales como amilorida, espironolactona, triamtereno y canrenoato de potasio; tiacidas tales como bendroflumetiácida e hidroclorotiácida; xantinas tales como cafeína, teofilina y teobromina.

Como se desvela en el presente documento, dicha terapia para restaurar la homeostasis de líquidos aumentando el contenido de líquidos, la presión o el volumen de llenado vascular y/o invertir la pérdida de peso debida al drenaje de líquidos comprende administrar agentes antidiuréticos y/o vasopresores exógenos y/o endógenos. Los ejemplos de antidiuréticos que pueden usarse según la divulgación incluyen pero sin limitación hormonas antidiuréticas tales como ADH/vasopresina, desmopresina, lipresina y terlipresina; diuréticos no hormonales tales como clorpropamida y carbamacepina.

Los métodos desvelados pueden permitir, entre otras cosas, identificar pacientes que tienen disnea debida a la sobrecarga de volumen y pueden diferenciar preferentemente dichos pacientes de la disnea debida a otras causas (tales como, por ejemplo, EPOC o neumonía). Los pacientes sobrelLENADOS pueden ser indicativos de insuficiencia cardíaca (IC) y en riesgo de descompensación en insuficiencia cardíaca aguda (ICA).

Además, el estudio de Komajda *et al.* 2010 (Eur Heart J, doi: 10.1093/eurheartj/ehp604) indica que el tratamiento con la tiazolidinediona rosiglitazona se asocia con retención de fluidos y riesgo aumentado de IC en personas con diabetes de tipo 2 en la población del ensayo RECORD y apoya la recomendación de que este agente no debería continuar usándose en personas que desarrollen IC sintomática mientras usan la medicación.

Como se contemplan por lo tanto métodos para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar la hipervolemia que comprenden medir la cantidad de MCAM en un sujeto como se enseña en el presente documento, en donde el sujeto recibe o ha recibido un tratamiento antidiabético, más particularmente uno o más sensibilizadores de insulina, preferentemente uno o más agonistas del receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma (PPARgamma) (por ejemplo, PPAR-gamma 1, 2 y/o 3), más preferentemente una o más tiazolidinedionas (glitazonas) tales como preferentemente pero sin limitación rosiglitazona y/o pioglitazona.

Por lo tanto, la invención contempla MCAM, más particularmente la cantidad de MCAM, como un marcador de diagnóstico acompañante para hipervolemia en sujetos que reciben o han recibido dicho tratamiento antidiabético. El tratamiento antidiabético puede tener asociación conocida o sospechada con retención de fluidos (sobrecarga de volumen), IC o ICA, es decir, que provoca dicha afección o dichas afecciones como efectos secundarios potenciales.

5 Los métodos desvelados en el presente documento para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar la homeostasis de líquidos alterada que comprenden medir la cantidad de MCAM en un sujeto, también pueden emplearse para estratificar o clasificar los pacientes que reciben o han recibido un tratamiento antidiabético como se enseña en el presente documento para identificar los pacientes que tienen o están en riesgo de tener homeostasis
10 de líquidos alterada o que tienen un mal pronóstico para homeostasis de líquidos alterada y por lo tanto probablemente respondan a (es decir, se beneficien de) una terapia para restaurar la homeostasis de líquidos. En particular, la alteración de la homeostasis de líquidos puede ser sobrecarga de volumen y la estratificación puede identificar pacientes que responden a terapias reductoras de volumen.

15 Los inventores han descubierto además que los niveles de MCAM se correlacionan con la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI). Se ha mostrado que los sujetos con una FEVI reducida tienen niveles de MCAM alterados (especialmente aumentados), en comparación con sujetos con FEVI normal. Ya que la FEVI reducida es un rasgo característico de la disfunción sistólica, los niveles de MCAM pueden usarse para predecir, diagnosticar,
20 pronosticar y/o supervisar la disfunción sistólica.

En particular, en un estudio de 3 centros que implican la recogida prospectiva de muestras de sujetos que presentan disnea tras su ingreso en urgencias, MCAM estaba significativamente aumentado en pacientes disneicos (especialmente enfermos de ICA) que muestran FEVI indicativa de la disfunción sistólica, en comparación con
25 pacientes disneicos con FEVI y función sistólica conservadas. La disfunción sistólica puede indicar preferentemente disfunción sistólica del ventrículo izquierdo.

En otro aspecto, la invención se refiere por lo tanto a un método como se desvela en la misma para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar la hipervolemia provocada por disfunción sistólica en un sujeto.

30 Además, en la población anterior de enfermos de ICA con una predominancia de enfermos de insuficiencia cardíaca con disfunción sistólica, el valor de ABC (curva de área bajo la curva de ROC; "ROC" significa característica operativa del receptor) para diferenciar entre los pacientes disneicos con y sin ICA, es ligeramente mayor para MCAM (0,91) que para cada uno de BNP (0,88) y NT-proBNP (0,85). El valor de ABC es una medida combinada de
35 sensibilidad y especificidad y un mayor valor de ABC (es decir, cercano a 1) en general indica un rendimiento mejorado del ensayo.

Los inventores han descubierto además que los niveles de MCAM se correlacionan con el estado de llenado cardíaco. En particular, los inventores han descubierto que los niveles de MCAM son mayores en sujetos con una presión de llenado cardíaco aumentada, en comparación con sujetos con presión de llenado cardíaco normal.

40 La disfunción tanto sistólica como diastólica puede provocar acumulación de líquidos en un sujeto. Los sujetos con una disfunción sistólica, sin embargo, son más resistentes a la acumulación de líquidos y por lo tanto acumularán más volumen en comparación con pacientes con disfunción diastólica antes de que aparezcan síntomas tales como la disnea. Los inventores han descubierto que los niveles de MCAM se correlacionan con la acumulación de fluidos y
45 en particular el estado de llenado vascular o la presión o el volumen de llenado vascular como una medición de la homeostasis de líquidos. En particular, los inventores descubrieron que los niveles de MCAM son mayores en sujetos con una presión o un volumen de llenado vascular aumentado y por lo tanto MCAM es un marcador de acumulación de líquidos en un sujeto. Como corolario, los niveles de MCAM están asociados con aumento de peso debido a sobrellenado o pérdida de peso debida a infrallenado o contracción de volumen de un sujeto. Como tal, los
50 inventores han descubierto que MCAM es un marcador para determinar edema, cambios en el estado de volumen o deshidratación en un sujeto. En particular, los niveles de MCAM se correlacionan con el estado de llenado de un sujeto con defectos en la circulación sanguínea, tales como provocados por insuficiencia cardíaca, y defectos en la secreción, tales como provocados por disfunción renal o insuficiencia renal. En consecuencia, en una realización, la invención se refiere a un método como se describe en el presente documento para diagnosticar, predecir,
55 pronosticar y/o supervisar una homeostasis de líquidos alterada en un sujeto, en donde el sujeto presenta, se le diagnostica o tiene un historial médico de insuficiencia cardíaca, en particular disfunción sistólica.

Se desvela en el presente documento un método para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar la disnea asociada con o provocada por sobrecarga de volumen que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra
60 de dicho sujeto. La sobrecarga de volumen puede ser indicativa de IC, preferentemente IC debida a disfunción sistólica y puede estar en riesgo de descompensación o haberse descompensado hasta convertirse en ICA. El método puede diferenciar la disnea provocada por sobrecarga de volumen tal como IC o ICA de otras causas de disnea (por ejemplo, EPOC, neumonía).

65 También se desvela un método para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar IC, preferentemente ICA, asociada con o provocada por sobrecarga de volumen en un sujeto, que comprende medir los niveles de MCAM en

una muestra de dicho sujeto. La sobrecarga de volumen puede deberse a disfunción sistólica.

Por lo tanto, también se desvela un método para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar IC, preferentemente ICA, asociada con o provocada por disfunción sistólica en un sujeto, que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra de dicho sujeto.

La disfunción sistólica se caracteriza por una fracción de eyección reducida del ventrículo izquierdo y/o derecho, más particularmente FEVI reducida. Los inventores han descubierto que los niveles de MCAM se correlacionan con la fracción de eyección ventricular. También se desvela por lo tanto un método para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar una la fracción de eyección ventricular en un sujeto, que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra de dicho sujeto.

Puede decirse que una fracción de eyección ventricular (por ejemplo, FEVI) en un sujeto está reducida en comparación con la normal, si dicha fracción de eyección está por debajo de lo normal en cualquier grado, por ejemplo, una fracción de eyección ventricular reducida puede significar menos de aproximadamente 45 % o menos de aproximadamente 50 % o menos de aproximadamente 55 %; por ejemplo una fracción de eyección ventricular reducida puede indicar entre aproximadamente 40 % y aproximadamente 70 %, preferentemente entre aproximadamente 45 % y aproximadamente 65 % o entre aproximadamente 50 % y aproximadamente 60 %, por ejemplo, menos de aproximadamente 55 %. En un experimento ejemplar pero no limitante los niveles de MCAM proporcionaron diferenciación particularmente satisfactoria entre FEVI normal y reducida cuando el umbral ente dicha FEVI normal y reducida se ajustó al 55 %. Por lo tanto, en algunas realizaciones un umbral para fracción de eyección ventricular normal frente a reducida, en particular FEVI, puede ajustarse a un valor entre aproximadamente 50 % y aproximadamente 60 %, por ejemplo, a 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 % o 60 %, y preferentemente a 55 %, en donde un valor por encima de dicho umbral refleja fracción de eyección normal y un valor por debajo de dicho umbral indica fracción de eyección reducida. Esta FEVI reducida también puede reflejarse en una PTDVI (presión telediastólica ventricular izquierda) aumentada, la presión de precarga en el ventrículo izquierdo, antes de la contracción del ventrículo.

El descenso o la reducción del gasto cardíaco debido a una fracción de eyección ventricular reducida promueve la retención renal de sal y agua. Esta adaptación apropiada expande el volumen sanguíneo, aumentando de este modo la presión telediastólica (por ejemplo PTDVI) y el volumen. Por lo tanto, la disfunción sistólica también se caracteriza por una presión de llenado cardíaco aumentada. Por lo tanto, también se desvela un método para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar el estado de llenado cardíaco en un sujeto que comprende medir los niveles de MCAM en una muestra de dicho sujeto. El estado de llenado cardíaco puede representarse por la presión de llenado cardíaco.

Por lo tanto, se desvela un método para predecir, diagnosticar y/o pronosticar la disfunción sistólica en un sujeto que puede comprender las etapas:

- (i) medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto;
- (ii) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico conocidos de la disfunción sistólica;
- (iii) encontrar una desviación o ausencia de desviación de la cantidad de MCAM medida en (i) con respecto al valor de referencia;
- (iv) atribuir dicho hallazgo de desviación o ausencia de desviación a una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico de disfunción sistólica particular en el sujeto.

Las etapas anteriores pueden aplicarse cambiando lo que deba cambiarse a la disnea asociada con o causada por sobrecarga de volumen; a la IC o ICA asociada con o provocada por sobrecarga de volumen; a la IC o ICA asociada con o provocada por disfunción sistólica; a la fracción de eyección ventricular; o al estado de llenado cardíaco.

MCAM proporciona una diferenciación mejorada o incluso sustancialmente completa de la disnea provocada por sobrecarga de volumen tal como ICA de otras causas de disnea. Por lo tanto, los inventores contemplan que MCAM también puede ser beneficioso para preparaciones de exploración de poblaciones para seleccionar sujetos que tengan o estén en riesgo de tener una descompensación aguda. Puede emplearse uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para exploración de poblaciones (tales como, por ejemplo, exploración en una población general o en una población estratificada basándose en uno o más criterios, por ejemplo, la edad, el sexo, la ascendencia, la ocupación, la presencia o ausencia de factores de riesgo de ICA, etc.). En uno cualquiera de los métodos anteriores, el sujeto puede formar parte de una población de pacientes que muestran señales de disnea.

Los inventores han descubierto que MCAM puede usarse como un biomarcador específico para disfunción sistólica. Por lo tanto, se desvela el uso de los métodos como se describen en el presente documento para diferenciar entre

disfunción sistólica y diastólica.

En una realización, se desvela un método para diferenciar entre disfunción sistólica y disfunción diastólica en un sujeto, que comprende:

- 5 (i) medir la cantidad de MCAM en una muestra de dicho sujeto;
- (ii) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un umbral para el diagnóstico de disfunción sistólica;
- 10 (iii) atribuir el diagnóstico de disfunción sistólica en dicho sujeto si la cantidad de MCAM en dicha muestra de dicho sujeto supera dicho umbral.

15 Como se demuestra en la sección experimental, los inventores han mostrado que la predicción o el diagnóstico de disfunción sistólica o un mal pronóstico de disfunción sistólica puede estar asociado en particular con un nivel elevado de MCAM. Por lo tanto, en una realización de los métodos de predicción, diagnóstico y/o pronóstico como se enseña en el presente documento, una cantidad elevada de MCAM en la muestra del sujeto en comparación con un valor de referencia que representa la predicción o el diagnóstico de ausencia de disfunción diastólica o que representa un buen pronóstico para disfunción sistólica respectivamente indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener disfunción sistólica o indica un mal pronóstico para disfunción sistólica en el sujeto. Los niveles de MCAM elevados también pueden ser indicativos de predicción o diagnóstico o mal pronóstico de disnea asociada con o provocada por sobrecarga de volumen; o de IC o ICA asociada con o provocada por sobrecarga de volumen; o de IC o ICA asociada con o provocada por disfunción sistólica; o de fracción de eyección ventricular reducida; o de presión de llenado cardíaco aumentada.

25 También se desvela el método de supervisión de la disfunción sistólica que comprende las etapas de:

- (i) medir la cantidad de MCAM en muestras del sujeto de dos o más puntos temporales sucesivos;
- 30 (ii) comparar la cantidad de MCAM entre las muestras medidas en (i);
- (iii) encontrar una desviación o ausencia de desviación en la cantidad de MCAM entre las muestras comparadas en (ii);
- 35 (iv) atribuir dicho hallazgo de desviación o ausencia de desviación a un cambio en la disfunción sistólica en el sujeto entre los dos o más puntos temporales sucesivos.

40 Las etapas anteriores pueden aplicarse cambiando lo que deba cambiarse a la disnea asociada con o causada por sobrecarga de volumen; a la IC o ICA asociada con o provocada por sobrecarga de volumen; a la IC o ICA asociada con o provocada por disfunción sistólica; a la fracción de eyección ventricular; o al estado de llenado cardíaco.

La supervisión puede aplicarse en el transcurso de un tratamiento médico del sujeto.

45 En una realización de la predicción, el diagnóstico, el pronóstico y/o la supervisión de métodos como se enseña en el presente documento, la sensibilidad y/o especificidad (y preferentemente, la sensibilidad y especificidad) de los métodos es de al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 % o al menos el 80 %, por ejemplo, $\geq 81\%$, $\geq 82\%$, $\geq 83\%$, $\geq 84\%$, $\geq 85\%$, $\geq 86\%$, $\geq 87\%$, $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ (el símbolo " \geq " es sinónimo de las expresiones "al menos" o "igual a o más de"), por ejemplo, entre 80 % y 100 %, o entre 81 % y 95 %, o entre 83 % y 90 %, o entre 84 % y 89 % o entre 85 % y 88 %.

50 En otra realización de la predicción, el diagnóstico, el pronóstico y/o la supervisión de métodos como se enseña en el presente documento, el sujeto puede presentar uno o más síntomas y/o señales potencialmente indicativas del desequilibrio homeostático de líquidos, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica, disfunción sistólica o disfunción o insuficiencia renal. Por ejemplo, en una realización el sujeto puede presentar disnea.

55 En una realización adicional de la predicción, el diagnóstico, el pronóstico y/o la supervisión de métodos como se enseña en el presente documento, el sujeto puede presentar uno o más factores de riesgo para las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención, tales como, por ejemplo, una predisposición genética o uno o más factores de riesgo del desarrollo, ambientales o conductuales, tales como, por ejemplo, resistencia a la insulina (glucosa en sangre alterada), obesidad central, niveles altos de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) en suero, niveles bajos de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL) en suero, niveles altos de triglicéridos en suero y tensión arterial alta (hipertensión), infarto de miocardio previo y/o una o más comorbilidades, tales como diabetes, arteriopatía coronaria, asma, EPOC y/o nefropatía crónica.

65 La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a "afecciones, síntomas y/o valores de parámetros" abarca cualquiera de dichas afecciones, síntomas y/o valores de parámetros desvelados en el presente documento,

tales como en particular pero sin limitación homeostasis de líquidos alterada y cambios relacionados en el peso (por ejemplo, edema o deshidratación) y en la presión o el volumen de llenado vascular (por ejemplo PTDVI elevada); y disfunción sistólica adicional; disnea asociada con o provocada por sobrecarga de volumen; IC o ICA asociada con o provocada por sobrecarga de volumen; IC o ICA asociada con o provocada por disfunción sistólica; fracción de eyección ventricular (por ejemplo, FEVI); y estado de llenado cardíaco.

Los presentes métodos para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención pueden usarse en individuos que no se ha diagnosticado aún que los tengan (por ejemplo, exploración preventiva) o que se ha diagnosticado que los tienen, o que se sospecha que los tienen (por ejemplo, presentan uno o más síntomas característicos) o que están en riesgo de desarrollarlos (por ejemplo predisposición genética; presencia de uno o más factores de riesgo del desarrollo, ambientales o conductuales). Los métodos también pueden usarse para detectar diversos estadios de progresión o gravedad de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención. Los métodos también pueden usarse para detectar la respuesta de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención a tratamientos profilácticos o terapéuticos u otras intervenciones. Los métodos pueden usarse además para ayudar al practicante médico a decidir tras el empeoramiento, el mantenimiento del estado actual, la recuperación parcial o recuperación completa del paciente de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención, lo que da como resultado tratamiento adicional, observación o alta del paciente del SU.

Los métodos de la presente invención permiten que el practicante médico supervise el progreso de la enfermedad midiendo el nivel de MCAM en una muestra del paciente.

Por ejemplo, en pacientes que padecen sobrellenado (sobrecarga de volumen), una reducción del nivel de MCAM en comparación con un nivel de MCAM anterior (por ejemplo en el momento del ingreso en el SU) indica que la condición del sujeto está mejorando o ha mejorado, mientras que un aumento del nivel de MCAM en comparación con un nivel de MCAM previo (por ejemplo en el momento del ingreso en el SU) indica que la condición del sujeto ha empeorado o está empeorando. Dicho empeoramiento podría dar como resultado posiblemente la reaparición de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención, tal como un nuevo acontecimiento de insuficiencia cardíaca aguda.

En otro ejemplo, en pacientes que padecen infralleno (contracción de volumen), tales como por ejemplo pacientes de la unidad de cuidados intensivos, un aumento del nivel de MCAM en comparación con un nivel de MCAM anterior (por ejemplo en el momento del ingreso en la UCI) indica que la condición del sujeto está mejorando o ha mejorado, mientras que una reducción del nivel de MCAM en comparación con un nivel de MCAM previo (por ejemplo en el momento del ingreso en la UCI) indica que la condición del sujeto ha empeorado o está empeorando.

En consecuencia, se desvela además un método para supervisar un cambio en la predicción, el diagnóstico y/o el pronóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención en un sujeto, que comprende:

(i) aplicar el método de predicción, diagnóstico y/o pronóstico como se ha enseñado anteriormente en el presente documento al sujeto en dos o más puntos temporales sucesivos, por lo que la predicción, el diagnóstico y/o el pronóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención en el sujeto se determinan en dichos puntos temporales sucesivos;

(ii) comparar la predicción, el diagnóstico y/o el pronóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención en el sujeto en dichos puntos temporales sucesivos como se han determinado en (i); y

(iii) encontrar la presencia o ausencia de un cambio entre la predicción, el diagnóstico y/o el pronóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención en el sujeto en dichos puntos temporales sucesivos como se han determinado en (i).

Este aspecto permite supervisar la condición del sujeto a lo largo del tiempo. Esto puede, entre otras cosas, permitir predecir la aparición de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o supervisar en dicho sujeto la progresión de enfermedad, el agravamiento o alivio de la enfermedad, la reaparición de enfermedad, la respuesta al tratamiento, la respuesta a otros factores externos o internos, las condiciones o los factores de tensión, etc. Provechosamente, el cambio en la predicción, el diagnóstico y/o el pronóstico en el sujeto puede supervisarse en el transcurso de un tratamiento médico de dicho sujeto. Dicha supervisión puede estar comprendida, por ejemplo, por toma de decisiones acerca de si puede dársele el alta a un paciente, si necesita un cambio en el tratamiento o si necesita más tiempo de hospitalización.

Se apreciará que en los presentes métodos de predicción, diagnóstico, pronóstico y/o supervisión la medición de MCAM también puede combinarse con la evaluación de uno o más biomarcadores o parámetros clínicos adicionales relevantes para las afecciones, los síntomas y/o los parámetros según la invención.

En consecuencia, también se consideran métodos, en los que la fase de examen de los métodos comprende además medir la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más de dichos otros biomarcadores en la muestra del sujeto. A este respecto, podría usarse cualquier marcador adecuado conocido o aún desconocido.

5 Una referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a biomarcadores "distintos de MCAM" u "otros biomarcadores" abarca en general dichos otros biomarcadores que son útiles para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros desvelados en el presente documento, y puede indicar preferentemente marcadores seleccionados del grupo que consiste en: péptidos natriuréticos tales como péptido natriurético auricular (ANP), pro-ANP, parte de región media de pro-ANP (MR-proANP), péptido natriurético de tipo B (BNP), péptido natriurético de tipo pro-B (proBNP), péptido natriurético de tipo pro-B amino terminal (NTproBNP), cistatina C, lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL), albúmina (más particularmente U-albúmina), γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GT), N-Acetil-beta-(D)-Glucosaminidasa (NAG), alfa-1-microglobulina (A1M), beta-2-microglobulina (B2M), urea, creatinina, vasopresina, aldosterona, copeptina, angiotensina, ACE y fragmentos de cualquiera de los mismos.

10
15 Por lo tanto, se desvela un método para predecir, diagnosticar y/o pronosticar las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención en un sujeto que comprende las etapas:

20 (i) medir la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales en la muestra del sujeto;

(ii) usar las mediciones de (i) para establecer un perfil del sujeto de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales;

25 (iii) comparar dicho perfil del sujeto de (ii) con un perfil de referencia de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales, representando dicho perfil de referencia una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico conocidos de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención;

30 (iv) encontrar una desviación o ausencia de desviación del perfil del sujeto de (ii) con respecto al perfil de referencia;

35 (v) atribuir dicho hallazgo de desviación o ausencia de desviación a una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico particular de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención en el sujeto.

La aplicación de dicho método en dos o más puntos temporales sucesivos permite supervisar las afecciones, los síntomas y/o valores de parámetros deseados.

40 En realizaciones preferidas de los métodos de la presente invención, la detección de proteína MCAM se realiza en una muestra de plasma (es decir una fracción de muestra de sangre que no contiene células sanguíneas), lo que implica que la proteína MCAM en circulación se detecta, independientemente de si esta forma en circulación corresponde o no a la forma soluble procesada por MMP o a un producto de degradación de la longitud completa o de dicha forma soluble de MCAM. En una realización preferida, la proteína MCAM detectada no está unida a membrana o célula, sino que es más bien la forma en circulación en plasma de MCAM, independientemente de cómo se consiga la liberación de MCAM a plasma o suero *in vivo*.

50 Como se ha indicado anteriormente, los presentes métodos pueden emplear valores de referencia con respecto a la cantidad de MCAM, que pueden establecerse según procedimientos conocidos previamente empleados para otros biomarcadores. Dichos valores de referencia pueden establecerse en (es decir, constituyendo una etapa de) o externos a (es decir, no constituyendo una etapa de) los métodos de la presente invención como se define en el presente documento. En consecuencia, uno cualquiera de los métodos enseñados en el presente documento puede comprender una etapa de establecimiento de un valor de referencia para la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia (a) una predicción o un diagnóstico de la ausencia de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o un buen pronóstico de los mismos o (b) una predicción o un diagnóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o un mal pronóstico de los mismos.

También se desvela un método para establecer un valor de referencia para la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia:

60 (a) una predicción o un diagnóstico de la ausencia de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o un buen pronóstico de los mismos, o

65 (b) una predicción o un diagnóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o un mal pronóstico de los mismos,

que comprende:

(i) medir la cantidad de MCAM en:

5 (i a) una o más muestras de uno o más sujetos que no tienen las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o que no están en riesgo de tenerlos o de tener un buen pronóstico para los mismos, o

10 (i b) una o más muestras de uno o más sujetos que tienen las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o que están en riesgo de tenerlos o de tener un mal pronóstico para los mismos, y

(ii) almacenar la cantidad de MCAM

15 (ii a) como se mide en (i a) como el valor de referencia que representa la predicción o el diagnóstico de la ausencia de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o que representa el buen pronóstico para los mismos, o

20 (ii b) como se mide en (i b) como el valor de referencia que representa la predicción o el diagnóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o que representa el mal pronóstico para los mismos.

25 Los presentes métodos pueden emplear de otro modo perfiles de referencia para la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores adicionales, que pueden establecerse según procedimientos conocidos previamente empleados para otros biomarcadores. Dichos perfiles de referencia pueden establecerse en (es decir, constituyendo una etapa de) o externos a (es decir, no constituyendo una etapa de) los presentes métodos. En consecuencia, los métodos enseñados en el presente documento pueden comprender una etapa para establecer un perfil de referencia para la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales, representando dicho perfil de referencia (a) una predicción o un diagnóstico de la ausencia de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o un buen pronóstico para los mismos o (b) una predicción o un diagnóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o un mal pronóstico para los mismos.

35 Un aspecto adicional desveló un método para establecer un perfil de referencia para la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores adicionales para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención representando dicho perfil de referencia:

40 (a) una predicción o un diagnóstico de la ausencia de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o un buen pronóstico para los mismos, o

(b) una predicción o un diagnóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o un mal pronóstico para los mismos,

45 que comprende:

(i) medir la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales en:

50 (i a) una o más muestras de uno o más sujetos que no tienen las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o que no están en riesgo de tenerlos o de tener un buen pronóstico para los mismos; o

55 (i b) una o más muestras de uno o más sujetos que tienen las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o que están en riesgo de tenerlos o de tener un mal pronóstico para los mismos;

(ii)

60 (ii a) usar las mediciones de (i a) para crear un perfil de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales; o

(ii b) usar las mediciones de (i b) para crear un perfil del de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales;

65

(iii)

(iii a) almacenar el perfil de (ii a) como el perfil de referencia que representa la predicción o el diagnóstico de la ausencia de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o que representa el buen pronóstico para los mismos; o

5 (iii b) almacenar el perfil de (ii b) como el perfil de referencia que representa la predicción o el diagnóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o que representa el mal pronóstico para los mismos.

10 En el presente documento se desvela también un método para establecer una línea basal de MCAM o un valor de referencia en un sujeto, que comprende:

(i) medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto en diferentes puntos temporales en donde el sujeto no padece las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención, y

15 (ii) calcular el intervalo o valor medio del sujeto, que es la línea basal de MCAM o el valor de referencia para dicho sujeto.

En realizaciones preferidas de uno cualquiera de los métodos anteriores el sujeto puede ser humano.

20 En los métodos enseñados en el presente documento, la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o cantidad del o los biomarcadores adicionales pueden medirse por cualquier técnica adecuada tal como puede conocerse en la técnica.

25 En una realización, la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o cantidad de los uno o más biomarcadores adicionales pueden medirse usando, respectivamente, un agente de unión capaz de unirse específicamente con MCAM y/o fragmentos del mismo, y un agente de unión capaz de unirse específicamente con dichos uno o más biomarcadores adicionales. En una realización, el agente de unión puede ser un anticuerpo, aptámero, fotoaptámero, proteína, péptido, peptidomimético o una molécula pequeña.

30 En una realización adicional, la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o cantidad de los uno o más biomarcadores adicionales se mide usando una tecnología de inmunoensayo, tal como tecnologías de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA de tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA múltiple, radioinmunoensayo (RIA) o ELISPOT, o usando un método de análisis de espectrometría de masas o usando un método de cromatografía, o usando una combinación de dichos métodos.

35 En una realización, en los métodos enseñados en el presente documento, el sujeto tiene un historial médico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención. En una realización adicional, el sujeto tiene un historial médico de insuficiencia cardíaca aguda o crónica. En otra realización más, el sujeto tiene un historial médico de disfunción o insuficiencia renal.

40 Otro aspecto desvela un kit para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención en un sujeto, comprendiendo el kit (i) medio para medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto y opcionalmente o preferentemente (ii) un valor de referencia de la cantidad de MCAM o medio para establecer dicho valor de referencia, en donde dicho valor de referencia representa una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico conocido de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención.

45 El kit permite por lo tanto: medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto por el medio (i); comparar la cantidad de MCAM medida por el medio (i) con el valor de referencia de (ii) o establecida por el medio (ii); encontrar una desviación o ausencia de desviación de la cantidad de MCAM medida por el medio (i) con respecto al valor de referencia de (ii); y en consecuencia atribuir dicho hallazgo de desviación o ausencia de desviación a una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico particular de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención en el sujeto.

55 Una divulgación adicional proporciona un kit para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención en un sujeto, comprendiendo el kit (i) medio para medir la cantidad de MCAM en una muestra del sujeto y (ii) medio para medir la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores adicionales en la muestra del sujeto y opcionalmente y preferentemente (iii) medio para establecer un perfil del sujeto de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales y opcionalmente y preferentemente (iv) un perfil de referencia de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales o medio para establecer dicho perfil de referencia, representando dicho perfil de referencia una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico conocidos de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención.

65 Dicho kit permite por lo tanto: medir la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales en la muestra del sujeto respectivamente por los medios (i) y (ii); establecer (por

ejemplo, usando los medios incluidos en el kit o usando medios externos adecuados) un perfil del sujeto de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales basándose en dichas mediciones; comparar el perfil del sujeto con el perfil de referencia de (iv) o establecido por medios (iv); encontrar una desviación o ausencia de desviación de dicho perfil del sujeto con respecto a dicho perfil de referencia; y en consecuencia atribuir dicho hallazgo de desviación o ausencia de desviación a una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico particular de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención en el sujeto.

En una realización adicional de los kits anteriores, el medio para medir la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o cantidad de los uno o más biomarcadores adicionales puede comprender, respectivamente, uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente con MCAM y/o fragmentos del mismo, y uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente con dichos uno o más biomarcadores adicionales. En una realización, uno cualquiera de dichos uno o más agentes de unión pueden ser un anticuerpo, aptámero, fotoaptámero, proteína, péptido, peptidomimético o una molécula pequeña. En una realización, uno cualquiera de dichos uno o más agentes de unión puede inmovilizarse provechosamente en una fase sólida o un soporte.

En una realización adicional de los kits anteriores, el medio para medir la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o cantidad de los uno o más biomarcadores adicionales puede emplear una tecnología de inmunoensayo, tal como tecnologías de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA de tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA múltiple, radioinmunoensayo (RIA) o ELISPOT, o puede emplear una tecnología de análisis de espectrometría de masas o puede emplear una tecnología de cromatografía, o puede emplear una combinación de dichas tecnologías.

Una realización desvela por lo tanto un kit para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención que comprende:

- (a) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a MCAM y/o a fragmentos de la misma;
- (b) preferentemente, una cantidad o concentración conocida de MCAM y/o un fragmento de la misma (por ejemplo, para uso como controles, patrones y/o calibradores);
- (c) preferentemente, un valor de referencia de la cantidad de MCAM o medio para establecer dicho valor de referencia.

Dichos componentes en (a) y/o (c) pueden marcarse adecuadamente como se enseña en otra parte de la presente memoria descriptiva.

Otra realización desvela un kit para predecir, diagnosticar y/o pronosticar las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención que comprende:

- (a) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a MCAM y/o a fragmentos de la misma;
- (b) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a uno o más biomarcadores adicionales;
- (c) preferentemente, una cantidad o concentración conocida de MCAM y/o un fragmento de la misma y una cantidad o concentración conocida de dichos uno o más biomarcadores adicionales (por ejemplo, para uso como controles, patrones y/o calibradores);
- (d) preferentemente, un perfil de referencia de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de dichos uno o más biomarcadores adicionales o medio para establecer dichos perfiles de referencia.

Dichos componentes en (a), (b) y/o (c) pueden marcarse adecuadamente como se enseña en otra parte de la presente memoria descriptiva.

Un aspecto adicional se refiere al uso del kit como se describe en el presente documento para diagnosticar, predecir, pronosticar y/o supervisar las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención.

También se desvelan reactivos y herramientas útiles para medir MCAM y opcionalmente el o los biomarcadores adicionales considerados en el presente documento.

Por ejemplo, un aspecto adicional se refiere a una matriz o micromatriz de proteínas, polipéptidos o péptidos que comprende

- (a) MCAM y/o un fragmento de la misma, preferentemente una cantidad o concentración conocida de dicho MCAM y/o fragmento del mismo; y
- (b) opcionalmente y preferentemente, uno o más biomarcadores adicionales, preferentemente una cantidad o

concentración conocida de dichos uno o más biomarcadores adicionales.

Otro aspecto se refiere a una matriz o micromatriz de agentes de unión que comprende:

- 5 (a) uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a MCAM y/o a fragmentos del mismo, preferentemente una cantidad o concentración conocida de dichos agentes de unión; y
- 10 (b) opcionalmente y preferentemente, uno o más agentes de unión capaces de unirse específicamente a uno o más biomarcadores adicionales, preferentemente una cantidad o concentración conocida de dichos agentes de unión.

También se desvelan kits como se han enseñado anteriormente en el presente documento configurados como dispositivos portátiles, tales como, por ejemplo, dispositivos de cabecera, para su uso en el hogar o en situaciones clínicas.

15 Un aspecto relacionado desvela por lo tanto un dispositivo de ensayo portátil capaz de medir la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto que comprende:

- 20 (i) medio para obtener una muestra del sujeto,
- (ii) medio para medir la cantidad de MCAM en dicha muestra, y
- (iii) medio para visualizar la cantidad de MCAM medida en la muestra.

25 En una realización, los medios de partes (ii) y (iii) pueden ser iguales, proporcionando de este modo un dispositivo de ensayo portátil capaz de medir la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto que comprende (i) medio para obtener una muestra del sujeto; y (ii) medio para medir la cantidad de MCAM en dicha muestra y visualizar la cantidad de MCAM medida en la muestra.

30 En una realización, dicho medio de visualización es capaz de indicar si la cantidad de MCAM en la muestra está por encima o por debajo de un nivel umbral determinado y/o si la cantidad de MCAM en la muestra se desvía o no de un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico conocidos de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención. Por lo tanto, en una realización, el dispositivo de ensayo portátil puede comprender además convenientemente dicho valor de referencia o medio para establecer dicho valor de referencia.

35 En una realización, el nivel umbral se elige de modo que la cantidad de MCAM en la muestra anterior o posterior (dependiendo de la afección, el síntoma y/o valor de parámetro consultado) dicho nivel umbral indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o indica un mal pronóstico para los mismos en el sujeto, y la cantidad de MCAM en la muestra por encima o por debajo de dicho nivel umbral, respectivamente, indica que el sujeto no tiene o no está en riesgo de tener las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o indica un buen pronóstico para los mismos en el sujeto.

45 En una realización, el dispositivo de ensayo portátil comprende un valor de referencia que representa la predicción o el diagnóstico de la ausencia de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o que representa un buen pronóstico para los mismos, o comprende medio para establecer dicho valor de referencia, y una cantidad elevada o reducida (dependiendo de la afección, el síntoma y/o el valor de parámetro consultado) de MCAM en la muestra del sujeto en comparación con dicho valor de referencia indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o indica un mal pronóstico para los mismos en el sujeto.

50 En otra realización, el dispositivo de ensayo portátil comprende un valor de referencia que representa la predicción o el diagnóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o que representa un mal pronóstico para los mismos, o comprende medio para establecer dicho valor de referencia, y una cantidad comparable de MCAM en la muestra del sujeto en comparación con dicho valor de referencia indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros según la invención o indica un mal pronóstico para los mismos en el sujeto.

55 En una realización adicional, el medio de medición (y opcionalmente visualización) del dispositivo de ensayo portátil puede comprender un soporte sólido que tiene un extremo proximal y distal, que comprende:

- 60 - una zona de aplicación de muestras cerca del extremo proximal;
- 65 - una zona de reacción distal a la zona de aplicación de muestras; y
- una zona de detección distal a la zona de reacción;

- opcionalmente patrones de control que comprenden proteína o fragmentos peptídicos de MCAM,

por lo que dicho soporte tiene una propiedad capilar que dirige un flujo de muestra de líquido aplicada en la zona de aplicación en una dirección del extremo proximal al extremo distal y

5

- opcionalmente que comprende un fuente de líquidos que mejora el flujo capilar de una muestra más viscosa.

En una realización, la zona de reacción puede comprender una o más bandas de moléculas de unión específicas de MCAM conjugadas con un agente de detección, estando dicho conjugado de moléculas de unión específico de MCAM dispuesto sobre el soporte sólido de modo que pueda migrar con el flujo capilar de líquido; y en donde la zona de detección comprende una o más bandas de captura que comprenden una población de molécula específica de MCAM inmovilizada en el soporte sólido.

10

En una realización, la zona de reacción puede comprender adicionalmente una o más bandas de moléculas de unión específicas de MCAM de captura en una cantidad suficiente para evitar que una cantidad umbral de conjugados moleculares de unión específicos de MCAM migre a la zona de detección. En una realización alternativa, dicho dispositivo comprende adicionalmente medio para comparar la cantidad de conjugado molecular de unión específico de MCAM capturado con un valor umbral.

15

En realizaciones preferidas de los kits y dispositivos, la detección de proteína MCAM se realiza en una muestra de plasma, lo que implica que la proteína MCAM en circulación se detecta, independientemente de si esta forma en circulación corresponde o no a la forma soluble o a un producto de degradación de la forma de longitud completa o soluble. En una realización preferida, la proteína MCAM detectada por dichos kits o dispositivos no está unida a membrana o célula. Preferentemente el medio para detectar dicha proteína MCAM o fragmento es capaz de detectar la proteína de longitud completa, proteína madura o proteína procesada o la forma en circulación en plasma de la misma. Más preferentemente, dicho medio para detectar la proteína MCAM reconoce específicamente la forma en circulación en plasma de MCAM como se define en el presente documento.

20

25

Estos y aspectos adicionales y realizaciones preferidas se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones adjuntas.

30

Breve descripción de figuras

La Figura 1 ilustra la secuencia proteica del biomarcador MCAM, tomada de NP_006491 (SEQ ID NO.1). La proteína se conoce como molécula de adhesión celular de melanoma (MCAM) o como MUC18 o CD146. El péptido señal y dominios transmembrana y citoplasmáticos se indican en minúsculas. También se indica el péptido cuantificado por MASSTerclass seleccionado (pept25 — negrita, subrayado: SEQ ID NO.2). El péptido de MASSTerclass puede cuantificar la forma tanto de longitud completa como escindida soluble de MCAM.

35

La Figura 2 ilustra los niveles de MCAM (A) y BNP (B) medidos en pacientes con ICA en el momento de ingreso y en los mismos pacientes en el momento del alta del hospital. El diagrama superior muestra los valores sin procesar medidos mediante MASSTerclass o ELISA, mientras que el diagrama inferior muestra valores normalizados que son factores de cambio entre el ingreso y el alta.

40

Figura 3: Vista en plano (A) vista lateral (B) de una tira de ensayo como se desvela en el presente documento.

45

Figura 4: Vista en plano de un cartucho de ensayo como se desvela en el mismo.

La Figura 5 A-B muestra una vista lateral y una vista superior, respectivamente, de una tira reactiva como se desvela en la misma que comprende varias capas de ensayo.

50

Figura 6: ilustra en diagramas de caja y bigotes la correlación entre el aumento de peso y los niveles de MCAM en enfermos de ICA en el momento del ingreso.

Figura 7: ilustra en diagramas de caja y bigotes la correlación entre FEVI y los niveles de MCAM en enfermos de ICA en el momento del ingreso.

55

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes tanto singulares como plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa.

60

Las expresiones "que comprende", "comprende" y "comprendido por" como se usan en el presente documento son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene" y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas de métodos adicionales, no enumerados.

65

La enumeración de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones incluidos en los intervalos respectivos, así como los puntos finales enumerados.

5 Se entiende que el término "aproximadamente" como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, abarca variaciones de y desde el valor especificado, en variaciones particulares de +/-10 % o menos, preferentemente +/-5 % o menos, más preferentemente +/-1 % o menos y aún más preferentemente +/-0,1 % o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que dichas variaciones son apropiadas para realizar en la invención desvelada. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" también se desvela en sí mismo específica y preferentemente.

10 A no ser que se especifique de otro modo, todos los términos usados para desvelar la invención, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. A modo de orientación adicional, pueden incluirse definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

15 La presente invención deriva de la idea altamente innovadora de los inventores de que MCAM es un biomarcador valioso particularmente para homeostasis de líquidos, en particular desequilibrio homeostático. Los inventores han validado MCAM como un biomarcador para varios síntomas o parámetros que están asociados con la homeostasis de fluidos, tales como acumulación de líquidos, como se mide por un volumen de llenado vascular aumentado y aumento de peso, en particular edema; o por otro lado una reducción del líquido corporal, como se mide por un volumen de llenado vascular reducido y pérdida de peso, en particular deshidratación.

20 Además, los inventores han validado MCAM como un biomarcador para insuficiencia cardíaca (aguda), en particular como un biomarcador para específicamente disfunción sistólica como una causa subyacente de insuficiencia cardíaca (aguda), incluyendo parámetros asociados con disfunción sistólica tales como fracción de eyección (FE) y presión y volumen de llenado cardíaco.

25 El término "biomarcador" está generalizado en la técnica y puede indicar ampliamente una molécula biológica y/o una parte detectable de la misma cuya evaluación cualitativa y/o cuantitativa en un sujeto es predictiva o informativa (por ejemplo, predictiva, de diagnóstico y/o de pronóstico) con respecto a uno o más aspectos del fenotipo y/o el genotipo del sujeto, tales como, por ejemplo, con respecto al estado del sujeto acerca de una enfermedad o afección dada.

30 La expresión "homeostasis de líquidos" como se usa en el presente documento porta su significado establecido en la técnica. A modo de orientación adicional, la expresión "homeostasis de líquidos" se refiere a homeostasis de líquidos o agua en un sujeto, en donde el contenido de líquido o agua en un sujeto se mantiene constante o equilibrado por medio de mecanismos reguladores incluyendo bucles de retroalimentación positiva y negativa para aumentar o reducir la retención o secreción de líquidos o agua en respuesta a condiciones internas (es decir fisiológicas) y/o externas (es decir ambientales) cambiantes. La alteración de la homeostasis de líquidos conduce a desequilibrio homeostático de líquidos u homeostasis de líquidos alterada. Por lo tanto el "desequilibrio homeostático" o la "homeostasis alterada" como se usan en el presente documento se refieren a una desviación de la homeostasis (normal) con respecto al contenido de líquidos. Como tales, estas expresiones se refieren a una situación en donde está presente demasiado fluido en un sujeto (es decir un sujeto está sobrellenado), o por el contrario está presente demasiado poco fluido en un sujeto (es decir un sujeto está infrallenado). Los trastornos de la homeostasis de agua corporal pueden dividirse en trastornos hipoosmolares, en los que hay un exceso de agua corporal en relación con soluto corporal, y trastornos hiperosmolares, en los que hay una deficiencia de agua corporal en relación a soluto corporal. Por lo tanto, las mediciones de osmolaridad (por ejemplo concentración de electrolitos) proporcionan una indicación de homeostasis de líquidos. Una homeostasis de líquidos alterada o un desequilibrio homeostático de líquidos, según la invención, se refiere a un volumen de llenado vascular alterado en dicho sujeto. Una homeostasis de líquidos alterada o un desequilibrio homeostático de líquidos, según la invención, se refiere además a una situación en donde un sujeto presenta edema o por el contrario deshidratación. Según la invención, puede provocarse desequilibrio homeostático de líquidos por ejemplo, pero sin limitación, por hiponatremia, tal como hiponatremia isotónica, hiponatremia hipertónica, hiponatremia hipotónica, hiponatremia hipoosmolar hipovolémica, pérdidas de soluto extrarrenal, pérdidas de soluto renal, hiponatremia hipoosmolar euvolémica, síndrome de secreción de hormonas antiuréticas inapropiadas, deficiencia de glucocorticoides, hipotiroidismo, hiponatremia hipoosmolar hipovolémica, insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis, insuficiencia renal avanzada, hiponatremia sintomática aguda grave, hiponatremia sintomática crónica grave; hipernatremia, tal como hipernatremia hipervolémica, hipernatremia hipodépsica, hipernatremia por pérdidas de agua aumentadas, diabetes insípida central, diabetes insípida nefrogénica.

60 La expresión "acumulación de fluidos" como se usa en el presente documento significa un aumento del líquido corporal en un sujeto. Como tal, la acumulación de líquidos está asociada con conservación de líquidos. La acumulación de líquidos puede estar provocada entre otras cosas por ejemplo por insuficiencia cardíaca (aguda), en particular debido a disfunción sistólica o disfunción o insuficiencia renal, en particular una disfunción que evita o interfiere de otro modo con la secreción normal de líquidos en un sujeto, tal como síndrome nefrótico. Las

características de acumulación de líquidos incluyen un volumen de llenado vascular aumentado (o expansión de volumen vascular) y una presión de llenado vascular aumentada. Como se usan en el presente documento "estado de llenado" o "carga de líquidos" se refiere al contenido de líquidos en un sujeto, en particular contenido de líquidos vascular, tisular e intersticial. Como se usa en el presente documento "volumen de llenado vascular" se refiere a la cantidad o el volumen de líquidos en la vasculatura. Como se usa en el presente documento "presión de llenado vascular" se refiere a la presión que se genera por la cantidad o el volumen de líquidos en la vasculatura. Como se usan en el presente documento las expresiones "volumen de llenado vascular" y "presión de llenado vascular" pueden usarse indistintamente. Los síntomas de acumulación de líquidos en general y una presión y/o volumen de llenado vascular aumentados incluyen edema. Como se usa en el presente documento, "edema" se refiere a acumulación o retención de líquidos extravascular, provocada por una presión o un volumen de llenado vascular aumentado. Según la invención, la acumulación de líquidos, una presión y/o un volumen de llenado vascular aumentados y edema pueden estar provocados por insuficiencia cardíaca (aguda), disfunción sistólica, disfunción renal o cualquier mecanismo patofisiológico que se conoce en la técnica que provoca dicho desequilibrio de líquidos u homeostasis de líquidos anómala. Como se usa en el presente documento, la expresión "aumento de peso" se refiere específicamente a aumento de peso que se asocia con acumulación de líquidos y sus parámetros asociados, incluyendo presión y/o volumen de llenado vascular, cuyo aumento puede conducir a o está correlacionado con edema. Como se usa en el presente documento, la "pérdida de peso" se refiere probablemente específicamente a una reducción de líquidos y sus parámetros asociados, incluyendo presión y/o volumen de llenado vascular, cuya reducción puede conducir a o está correlacionado con deshidratación.

Como se usa en el presente documento, "disfunción renal o de riñón" o "insuficiencia renal o de riñón" porta sus significados establecidos en la técnica respectivos. A modo de orientación adicional, la expresión "disfunción renal" o "insuficiencia renal" se refiere en general a una función renal alterada, en particular la función de filtración del riñón. Como se usa en el presente documento, "insuficiencia renal o de riñón" se refiere en particular a la incapacidad de los riñones para mantener la homeostasis de líquidos. Las causas de la insuficiencia renal incluyen, pero sin limitación, reducción del aporte sanguíneo al riñón (tal como hipovolemia o deshidratación), medicación (es decir medicinas que son tóxicas para el riñón), pérdida de aporte sanguíneo al riñón debido a la obstrucción de la arteria o vena renal, lesiones o traumatismos del riñón, septicemia, rhabdomiólisis, mieloma múltiple, glomerulonefritis aguda o crónica o inflamación de los glomérulos, obstrucción de la vejiga o los uréteres, hipertrofia prostática o cáncer de próstata, cálculos renales, diabetes poco controlada, alta tensión arterial poco controlada, enfermedad de riñón poliquístico, nefropatía de reflujo.

Las expresiones "insuficiencia cardíaca", "insuficiencia cardíaca aguda" e "insuficiencia cardíaca crónica" como se usan en el presente documento portan sus significados establecidos en la técnica respectivos. A modo de orientación adicional, la expresión "insuficiencia cardíaca" como se usa en el presente documento se refiere en general a afecciones patológicas caracterizadas por un caudal sanguíneo diastólico o sistólico alterado y por lo tanto insuficiente flujo sanguíneo del ventrículo a órganos periféricos.

La "insuficiencia cardíaca aguda" o también denominada "insuficiencia cardíaca aguda descompensada" puede definirse como la aparición rápida de síntomas y señales secundarias de la función cardíaca anómala, que da como resultado la necesidad de terapia urgente. ICA puede presentarse como aguda de novo (nueva aparición de insuficiencia cardíaca aguda en un paciente sin disfunción cardíaca previamente conocida) o como una descompensación aguda de ICC. La disfunción cardíaca puede estar relacionada con disfunción sistólica o diastólica, con anomalías en el ritmo cardíaco o con discrepancia de carga previa y carga posterior. Con frecuencia es potencialmente mortal y requiere tratamiento urgente. Según la clasificación establecida, ICA incluye varias condiciones clínicas definidas en las que los pacientes presentan: (I) insuficiencia cardíaca congestiva aguda descompensada, (II) ICA con hipertensión/ crisis hipertensiva, (III) ICA con edema pulmonar, (IVa) choque cardiogénico / síndrome de bajo gasto, (IVb) choque cardiogénico grave, (V) insuficiencia de alto gasto y (VI) insuficiencia cardíaca aguda del lado derecho. Para una descripción clínica detallada, la clasificación y el diagnóstico de ICA y para un sumario de sistemas de clasificación de ICA adicionales incluyendo la clasificación de Killip, la clasificación de Forrester y la clasificación de "gravedad clínica", consúltese, entre otros, Nieminen *et al.* 2005 ("Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology". Eur Heart J 26: 384-416) y referencias en la misma.

La expresión "disfunción sistólica" como se usa en el presente documento porta su significado establecido en la técnica. A modo de orientación adicional, la expresión "disfunción sistólica" puede usarse indistintamente con expresiones sinónimas conocidas por los expertos en la materia, tales como "disfunción o insuficiencia ventricular sistólica" o "disfunción o insuficiencia cardíaca sistólica". Esencialmente, la "disfunción sistólica" se refiere a una insuficiencia de la función de bomba del corazón debida a una contractilidad reducida del ventrículo.

La expresión "disfunción diastólica" como se usa en el presente documento porta su significado establecido en la técnica. A modo de orientación adicional, la expresión "disfunción diastólica" puede usarse indistintamente con expresiones sinónimas conocidas por los expertos en la materia, tales como "disfunción o insuficiencia ventricular diastólica" o "disfunción o insuficiencia cardíaca diastólica". Esencialmente, la "disfunción diastólica" se refiere a una insuficiencia de la función de bomba del corazón debida a un llenado ventricular alterado.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fracción de eyección ventricular (izquierda)" significa la emisión del ventrículo (izquierdo) durante la sístole y representa la fracción de sangre bombeada fuera de un ventrículo (izquierdo) con cada latido del corazón. Por definición, el volumen de sangre en un ventrículo inmediatamente antes de una contracción se conoce como el volumen telediastólico. De forma similar, el volumen de sangre que queda en un ventrículo al final de la contracción es volumen telesistólico. La diferencia entre los volúmenes telediastólico y telesistólico es el volumen sistólico, el volumen de sangre eyectado con cada latido. La fracción de eyección (FE) es la fracción del volumen telediastólico que se eyecta con cada latido; es decir, es el volumen sistólico (VS) dividido por el volumen telediastólico (VTD): $FE = VS/VTD = (VTD - VTS)/VTD$.

Como se usa en el presente documento, la expresión "presión de llenado cardíaco" se refiere a la presión con la que el ventrículo se llena de sangre. Las presiones de llenado cardíaco se supervisan para estimar los volúmenes de llenado cardíaco, que, a su vez, determinan las emisiones sistólicas de los ventrículos izquierdo y derecho. Como se usa en el presente documento, la presión de llenado cardíaco es una representación de la presión telediastólica ventricular izquierda. Se conocen en la técnica métodos para determinar o estimar la presión de llenado cardíaco e incluyen mediciones de ultrasonidos (ecocardiografía) y de Doppler así como medición directa mediante cateterización del ventrículo. La presión de llenado cardíaco puede estimarse indirectamente mediante medición de la presión auricular izquierda, presión venosa central o presión de enclavamiento capilar o arterial pulmonar.

La expresión "insuficiencia cardíaca crónica" (ICC) se refiere en general a un caso de insuficiencia cardíaca que progresa tan lentamente que diversos mecanismos compensatorios actúan para llevar la enfermedad al equilibrio. Los síntomas clínicos habituales de ICC incluyen, entre otros, uno cualquiera o más de disnea, disminución de la capacidad de ejercicio, fatiga, letargo y edema periférico. Otros síntomas menos habituales incluyen uno cualquiera o más de palpitaciones, memoria o alteración del sueño y confusión, y habitualmente se producen conjuntamente con uno o más de los síntomas habituales enumerados anteriormente.

En estudios tales como el presente, la población con ICC puede diferir de la población con ICA porque los enfermos de ICC no tienen una descompensación aguda y por lo tanto no acuden al SU en el momento en que se toma la muestra clínica usada en dicho estudio o investigación. Los enfermos de insuficiencia cardíaca crónica pueden, sin embargo, descompensarse fácilmente lo que conduce a "insuficiencia cardíaca aguda".

En estudios tales como el presente, una población de pacientes disneicos sin insuficiencia cardíaca pueden comprender por ejemplo pacientes que acuden al SU con síntomas similares a la población con ICA pero en los que la causa de disnea no está relacionada con insuficiencia cardíaca descompensada aguda. Son ejemplos típicos enfermos de EPOC o neumonía. Dichos enfermos pueden tener o no un historial de insuficiencia cardíaca subyacente, que puede complicar particularmente el diagnóstico final usando medios de diagnóstico convencionales tales como mediciones de BNP o NT-pro-BNP.

Los términos "predecir" o "predicción", "diagnosticar" o "diagnóstico" y "pronosticar" o "pronóstico" son habituales y se entienden bien en la práctica médica y clínica. A modo de explicación adicional y sin limitación, "predecir" o "predicción" se refieren en general a una declaración previa, indicación o previsión de una enfermedad o afección en un sujeto que no tiene (aún) dicha enfermedad o afección. Por ejemplo, una predicción de una enfermedad o afección en un sujeto puede indicar una probabilidad, posibilidad o riesgo de que el sujeto desarrolle dicha enfermedad o afección, por ejemplo en un periodo de tiempo predeterminado o a una edad determinada. Dicha probabilidad, posibilidad o riesgo puede indicarse, entre otros, como un valor absoluto, intervalo o estadística, o puede indicarse en relación con un sujeto o una población de sujetos de control adecuados (tal como, por ejemplo, en relación con un sujeto o una población de sujetos generales, normales o sanos). Por lo tanto, la probabilidad, posibilidad o riesgo de que un sujeto desarrolle una enfermedad o afección puede indicarse provechosamente como aumentado o reducido, o como con un factor de aumento o factor de reducción en relación con un sujeto o una población de sujetos de control adecuados.

Como se usa en el presente documento, la expresión "predicción de las afecciones, los síntomas y/o los parámetros según la invención y como se describen en el presente documento", en particular desequilibrio homeostático de líquidos, acumulación de líquidos o reducción de líquidos, presión y/o volumen de llenado vascular aumentado o reducido, aumento o pérdida de peso, edema o deshidratación, disfunción sistólica, insuficiencia cardíaca (aguda), FEVI, PTDVI, presión de llenado cardíaco en un sujeto también puede significar en particular que el sujeto tiene una predicción "positiva" de los mismos, es decir, que el sujeto está en riesgo de tenerlos (por ejemplo, es riesgo aumenta significativamente frente a un sujeto o una población de sujetos de control). La expresión "predicción de ausencia de afecciones, síntomas y/o parámetros según la invención y como se describen en el presente documento" en un sujeto puede significar en particular que el sujeto tiene una predicción "negativa" de los mismos, es decir, que el riesgo del sujeto de tenerlos no aumenta significativamente frente a un sujeto o una población de sujetos de control.

Los términos "diagnosticar" o "diagnóstico" se refieren en general al proceso o acto de reconocer, decidir o concluir una enfermedad o afección en un sujeto basándose en los síntomas y las señales y/o a partir de resultados de diversos procedimientos de diagnóstico (tales como, por ejemplo, a partir del conocimiento de la presencia, ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores característicos de la enfermedad o afección diagnosticada).

- Como se usa en el presente documento, el "diagnóstico de las afecciones, los síntomas y/o los valores de parámetros anómalos según la invención y como se describen en el presente documento", en particular desequilibrio homeostático de líquidos, acumulación de líquidos o reducción de líquidos, presión y/o volumen de llenado vascular aumentado o reducido, aumento o pérdida de peso, edema o deshidratación, disfunción sistólica, insuficiencia cardíaca (aguda), FEVI, PTDVI, presión de llenado cardíaco, en un sujeto puede significar en particular que el sujeto tiene los mismos, por lo tanto, se diagnostica que tiene los mismos. El "diagnóstico de ausencia de afecciones, síntomas y/o valores de parámetros anómalos según la invención y como se describen en el presente documento, en particular desequilibrio homeostático de líquidos, acumulación de líquidos o reducción de líquidos, presión y/o volumen de llenado vascular aumentado o reducido, aumento o pérdida de peso, edema o deshidratación, disfunción sistólica, insuficiencia cardíaca (aguda), FEVI, PTDVI, presión de llenado cardíaco", en un sujeto puede significar en particular que el sujeto no tiene los mismos, por lo tanto, se diagnostica que no tiene los mismos. Puede diagnosticarse como se enseña en el presente documento que un sujeto no tiene los mismos a pesar de presentar uno o más síntomas o señales convencionales reminiscentes de los mismos.
- 15 Los términos "pronosticar" o "pronóstico" se refieren en general a una anticipación en la progresión de una enfermedad o afección y la expectativa (por ejemplo, la probabilidad, duración y/o alcance) de la recuperación.
- Un buen pronóstico de las afecciones, los síntomas y/o la normalización de los parámetros según la invención y como se describe en el presente documento puede abarcar en general anticipación de una recuperación parcial o completa satisfactoria de las afecciones, los síntomas y/o la normalización de los parámetros según la invención y como se describen en el presente documento, preferentemente en un periodo de tiempo aceptable. Un buen pronóstico de los mismos puede abarcar más habitualmente la anticipación de no empeorar o agravar adicionalmente los mismos, preferentemente en un periodo de tiempo dado.
- 25 Un mal pronóstico de las afecciones, los síntomas y/o la normalización de los parámetros según la invención y como se describe en el presente documento puede abarcar en general anticipación de una recuperación deficiente y/o recuperación insatisfactoriamente lenta, o sustancialmente ausencia de recuperación o incluso empeoramiento de los mismos.
- 30 Los diversos aspectos y realizaciones enseñados en el presente documento pueden basarse en la medición de la cantidad de MCAM u opcionalmente la medición de la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores relevantes en una muestra de un sujeto. Además pueden medirse diversos parámetros clínicos asociados con las afecciones, los síntomas y/o los parámetros como se describen en el presente documento según la invención, tales como la tasa de filtración glomerular, la diuresis, el peso o cualquier otro parámetro clínico que se conoce en la técnica que está asociado con las afecciones, los síntomas y/o los parámetros como se han descrito. También se contemplan combinaciones de los biomarcadores y parámetros clínicos como se enseñan en el presente documento.
- 40 El término "sujeto" o "paciente" como se usa en el presente documento típicamente indica seres humanos, pero también puede abarcar referencia a animales no humanos, preferentemente animales de sangre caliente, más preferentemente mamíferos, tales como, por ejemplo, primates no humanos, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.
- 45 Las expresiones "muestra" o "muestra biológica" como se usan en el presente documento incluyen cualquier muestra de ensayo biológica obtenida de un sujeto. Las muestras pueden incluir, sin limitación, sangre completa, plasma, suero, glóbulos rojos, glóbulos blancos (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica), saliva, orina, deposición (es decir, heces), lágrimas, sudor, sebo, aspirado de los pezones, lavado ductal, exudados tumorales, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, linfa, aspirado de aguja fina, líquido amniótico, líquido intersticial, cualquier otro fluido corporal, lisados celulares, productos de secreción celular, líquido de inflamación, semen y secreciones vaginales. Las muestras preferidas pueden incluir muestras que comprenden MCAM en cantidades detectables. En realizaciones preferidas, la muestra puede ser sangre completa o un componente fraccional de la misma tal como, por ejemplo, plasma, suero o un sedimento celular. Preferentemente la muestra se puede obtener fácilmente por métodos mínimamente invasivos. Las muestras también pueden incluir muestras tisulares y biopsias, homogeneizados tisulares y similares. Preferentemente, la muestra usada para detectar niveles de MCAM es plasma sanguíneo. El término "plasma" define el líquido acuoso incoloro de la sangre que no contiene células, pero en el que las células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos, trombocitos, etc.) están suspendidas, que contiene nutrientes, azúcares, proteínas, minerales, enzimas, etc.
- 50 Una molécula o analito tal como una proteína, un polipéptido o péptido, o un grupo de dos o más moléculas o analitos tales como dos o más proteínas, polipéptidos o péptidos, se "mide" en una muestra cuando la presencia o ausencia y/o cantidad de dicha molécula o analito o de dicho grupo de moléculas o analitos se detecta o se determina en la muestra, preferentemente sustancialmente con exclusión de otras moléculas y analitos.
- 60 Los términos "cantidad", "número" y "nivel" son sinónimos y en general se entienden bien en la técnica. Los términos como se usan en el presente documento se refieren a una cuantificación absoluta de una molécula o un analito en una muestra o a una cuantificación relativa de una molécula o un analito en una muestra, es decir, en relación con

otro valor tal como en relación con un valor de referencia como se enseña en el presente documento, o con un intervalo de valores que indican una expresión basal del biomarcador. Estos valores o intervalos pueden obtenerse de un único paciente o de un grupo de pacientes.

- 5 Una cantidad absoluta de una molécula o un analito en una muestra puede expresarse provechosamente como peso o como cantidad molar, o más habitualmente como una concentración, por ejemplo, peso por volumen o mol por volumen.

10 Una cantidad relativa de una molécula o un analito en una muestra puede expresarse provechosamente como un aumento o una reducción o como un factor de aumento o factor de reducción en relación con dicho otro valor, tal como en relación con un valor de referencia como se enseña en el presente documento. La realización de una comparación relativa entre primer y segundo parámetros (por ejemplo, primera y segunda cantidades) puede necesitar, aunque no es necesario, determinar en primer lugar los valores absolutos de dichos primer y segundo parámetros. Por ejemplo, un método de medición puede producir lecturas cuantificables (tales como, por ejemplo, 15 intensidades de señal) para dichos primer y segundo parámetros, en donde dichas lecturas están en función del valor de dichos parámetros y en donde dichas lecturas pueden compararse directamente para producir un valor relativo para el primer parámetro frente al segundo parámetro, sin la necesidad real de convertir primero las lecturas en valores absolutos de los parámetros respectivos.

20 Como se usa en el presente documento, el término "MCAM" corresponde a la proteína habitualmente conocida como molécula de adhesión celular de melanoma (MCAM), MUC18 o CD146, es decir las proteínas y polipéptidos habitualmente conocidos por estas designaciones en la técnica. Los términos abarcan dichas proteínas y polipéptidos de cualquier organismo en el que se encuentren, y particularmente de animales, preferentemente 25 vertebrados, más preferentemente mamíferos, incluyendo seres humanos y mamíferos no humanos, aún más preferentemente de seres humanos. Los términos abarcan en particular dichas proteínas y polipéptidos con una secuencia nativa, es decir en las que la secuencia primaria es igual que la de MCAM hallada en u obtenida de la naturaleza. Un experto en la materia entiende que las secuencias nativas de MCAM pueden diferir entre diferentes especies debido a la divergencia genética entre dichas especies. Además, las secuencias nativas de MCAM pueden diferir entre o dentro de individuos diferentes de la misma especie debido a la diversidad genética normal (variación) 30 en una especie dada. Además, las secuencias nativas de MCAM pueden diferir entre o incluso dentro de individuos diferentes de la misma especie debido a modificaciones postranscripcionales o postraduccionales. En consecuencia, todas las secuencias de MCAM halladas en u obtenidas de la naturaleza se consideran "nativas". Los términos abarcan proteínas y polipéptidos de MCAM cuando forman parte de un organismo vivo, órgano, tejido o célula, cuando forman parte de una muestra biológica, así como cuando se aíslan al menos parcialmente de dichas fuentes. 35 Los términos también abarcan proteínas y polipéptidos cuando se producen por medios recombinantes o sintéticos.

Las MCAM ejemplares incluyen, sin limitación, MCAM humana que tiene una secuencia de aminoácidos primaria como se indica en Uniprot/Swissprot (<http://www.expasy.org/>) número de referencia NP_006491 como se muestra en la Fig. 1 (SEQ ID NO: 1). Un experto en la materia también puede apreciar que dichas secuencias son de precursor 40 de MCAM y pueden incluir partes que se separan por procesamiento de la MCAM madura. Por ejemplo, la proteína MCAM puede estar en una forma soluble o puede estar unida a la membrana celular. En la Figura 1, el péptido señal y dominios transmembrana y citoplasmáticos se indican en minúsculas en la secuencia de aminoácidos. También se indica el péptido cuantificado por MASterclass seleccionado (pept25 — negrita, subrayado: SEQ ID NO.2). Este péptido de MASterclass puede cuantificar la forma tanto de longitud completa como escindida soluble de MCAM, aunque debido a la preparación experimental solamente se mide la fracción en circulación en plasma (es decir la fracción no unida a célula). 45

La proteína MCAM es específica para células endoteliales y células de músculo liso vascular y se ha usado como una herramienta para clasificar células endoteliales de una población de células sanguíneas, basándose en la forma 50 unida a membrana de CD146. MCAM pertenece a la familia supergénica de inmunoglobulina con cinco dominios de tipo inmunoglobulina (V-V-C2-C2-C2), una región transmembrana y una cola citoplasmática de 63 restos. Es por lo tanto una glucoproteína de membrana que actúa como una molécula de adhesión celular independiente de Ca²⁺ implicada en las interacciones célula a célula heterófilas. La proteína tiene un peso molecular de 130 kDa en su forma reducida (118 kDa no reducida) y la glucosilación ligada a N representa aproximadamente el cincuenta por 55 ciento del peso molecular aparente. CD146 soluble se libera por desprendimiento de ectodominio (mediante la acción de MMP). Se observaron niveles en plasma aumentados de CD146 soluble en pacientes con insuficiencia renal crónica (niveles en suero sanos: -270 ng/ml; enfermos de insuficiencia renal: -500 ng/ml) como se analiza en Saito *et al.*, 2008 (Clin Exp Nephrol. feb 2008;12(1):58- 64. Epub 5 ene 2008). Por otro lado, se observaron niveles en suero reducidos de sCD146 (CD146 soluble) en pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (EII) tal como enfermedad de Crohn, mientras que la expresión de CD146 unido a membrana aumenta en EII activa (Bardin 60 *et al.*, Inflamm. Bowel Dis. ene 2006;12(1):16-21 y Reumaux *et al.*, Inflamm. Bowel Dis. oct 2007;13(10):1315-7). Estas últimas dos publicaciones indican que hay una clara diferencia en la correlación entre la condición del paciente y los niveles de 1) la MCAM soluble y 2) la forma o las formas unidas a célula o unidas a membrana de MCAM. En una realización preferida de los métodos, kits y dispositivos de la presente invención como se definen en el presente documento, la proteína MCAM en circulación, por ejemplo la forma en circulación en el plasma sanguíneo, se 65 detecta, a diferencia de la proteína MCAM unida a membrana o célula (por ejemplo MCAM presente en la superficie

de células endoteliales).

- 5 MCAM se ha conocido como un marcador de lesión de células endoteliales, pero no se ha mostrado que sea útil para evaluar la homeostasis de líquidos, en particular el desequilibrio homeostático o los síntomas o parámetros asociados; ni se ha mostrado que esté correlacionado con la disfunción sistólica o los síntomas o parámetros asociados. Además, el marcador MCAM se usa con frecuencia como una herramienta para clasificar células endoteliales, lo que implica que se usa la proteína unida membrana (de longitud completa) (consúltese por ejemplo el documento WO2006/020936).
- 10 La referencia en el presente documento a MCAM también puede abarcar fragmentos de MCAM. Por lo tanto, la referencia en el presente documento a medición de MCAM o a medición de la cantidad de MCAM, puede abarcar la medición de la proteína o el polipéptido de MCAM, tal como, por ejemplo, medición de la forma madura y/o la forma soluble procesada por MMP (denominada para mayor brevedad "forma soluble" en lo sucesivo en el presente documento) de MCAM y/o medición de uno o más fragmentos de la misma. Por ejemplo, MCAM y/o uno o más
- 15 fragmentos de la misma pueden medirse colectivamente, de modo que la cantidad medida corresponda a la suma de las cantidades de las especies medidas colectivamente. En otro ejemplo, MCAM y/o uno o más fragmentos de la misma pueden medirse cada uno individualmente. Preferentemente, dicho fragmento o MCAM es una forma en circulación en plasma de MCAM.
- 20 La expresión "forma en circulación en plasma de MCAM" o para mayor brevedad "forma en circulación" abarca todas las proteínas MCAM o fragmentos de las mismas que circulan en el plasma, es decir no están unidas a célula o membrana. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, dichas formas en circulación pueden obtenerse de la proteína MCAM de longitud completa mediante procesamiento natural (por ejemplo escisión por MMP en su "forma soluble" como se ha indicado anteriormente) o puede resultar de procesos de degradación conocidos que se producen en
- 25 dicha muestra. En determinadas situaciones, la forma en circulación también puede ser la proteína MCAM de longitud completa, que se encuentra en circulación en el plasma. Dicha "forma en circulación" puede ser por lo tanto cualquier proteína MCAM o cualquier forma soluble procesada de MCAM o fragmentos de una de ellas, que esté en circulación en la muestra, es decir que no esté unida a una fracción celular o de membrana de dicha muestra.
- 30 Como se usa en el presente documento, las expresiones péptido natriurético auricular (ANP), pro-ANP y parte de región media de pro-ANP (MR-proANP) se refieren a péptidos conocidos habitualmente por estas designaciones en la técnica. Como explicación adicional y sin limitación, el ANP maduro *in vivo* se obtiene de los aminoácidos carboxilo terminal 99-126 de la prohormona (proANP) de 126 aminoácidos conocida por sí misma. El proANP de
- 35 región media puede referirse en particular a aproximadamente los aminoácidos 53-90 de proANP.
- Como se usan en el presente documento, las expresiones "péptido natriurético de tipo pro-B" (también abreviado como "proBNP") y "péptido natriurético de tipo pro-B amino terminal" (también abreviado como "NTproBNP") y "péptido natriurético de tipo B" (también abreviado como "BNP") se refieren a péptidos habitualmente conocidos por estas designaciones en la técnica. Como explicación adicional y sin limitación, proBNP, NTproBNP y BNP *in vivo*
- 40 derivan de la preproteína B precursora de péptido natriurético (preproBNP). En particular, el péptido proBNP corresponde a la parte de preproBNP después de la retirada de la secuencia señal (líder) de secreción N terminal de preproBNP. NTproBNP corresponde a la parte N terminal y BNP corresponde a la parte C terminal del péptido proBNP después de la escisión del último adyacente en dirección C terminal al aminoácido 76 de proBNP.
- 45 Como se usa en el presente documento, "cistatina C" se refiere a una proteína codificada por el gen CST3, que se usa principalmente como un biomarcador de la función renal. Nombres alternativos incluyen cistatina 3 (anteriormente traza gamma, post-gamma-globulina o polipéptido básico neuroendocrino). Se encuentra prácticamente en todos los tejidos y fluidos corporales. Es un potente inhibidor de proteinasas lisosómicas (enzimas de una subunidad especial de la célula que degrada proteínas) y probablemente uno de los inhibidores
- 50 extracelulares más importantes de cisteína proteasas (previene la degradación de proteínas fuera de la célula por un tipo específico de enzimas degradantes de proteínas). La cistatina C pertenece a la familia del gen de la cistatina de tipo 2.
- Como se usa en el presente documento, "lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos" o "NGAL", también
- 55 conocida como lipocalina oncogénica 24P3, uterocalina o lipocalina 2 (LCN2) se refiere a una proteína de 25 kD que se cree que se une a sustancias lipófilas pequeñas tales como lipopolisacárido (LPS) obtenido de bacterias y formilpéptidos y puede actuar como un modulador de la inflamación. NGAL puede usarse como un biomarcador para insuficiencia renal debido a lesión renal aguda.
- 60 Como se usa en el presente documento, "U-albúmina" se refiere a albúmina urinaria. Como tal, esta expresión se refiere a la concentración de albúmina hallada en orina como un marcador para la enfermedad renal, en particular defectos de filtración glomerular.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "gamma glutamil transpeptidasa" o "gamma glutamil transpeptidasa"
- 65 se usa indistintamente con "gamma glutamil transferasa" (GGT). GGT es una enzima que transfiere grupos funcionales de gamma-glutamilo. GGT está presente en las membranas celulares de muchos tejidos, incluyendo los

riñones, el conducto biliar, el páncreas, el hígado, el bazo, el corazón, el cerebro y las vesículas seminales. La GGT urinaria puede usarse como un marcador para lesión isquémica renal.

5 Como se usa en el presente documento, "N-Acetil-beta-(D)-Glucosaminidasa" o "NAG" se refiere a una enzima implicada en la hidrólisis de restos de N-acetil-(D)-glucosamida terminales en N-acetil-143-(D)-glucosaminidas. Esta enzima pertenece al grupo de hexosaminidasas. NAG se mide en orina como un marcador no invasivo de daño y enfermedad renal.

10 Como se usa en el presente documento "alfa-1-microglobulina" o MM, se refiere a un fragmento del gen precursor de alfa-1-microglobulina/bikunina (AMBP). Al M pertenece a la superfamilia de lipocalina, se considera que es un marcador de insuficiencia renal, lo que sugiere función tubular alterada. Al M puede purificarse de la orina de pacientes con proteinuria tubular renal crónica.

15 Como se usa en el presente documento "beta-2-microglobulina" o B2M se refiere a una proteína en suero hallada en asociación con la cadena pesada del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I en la superficie de casi todas las células nucleadas. En pacientes con hemodiálisis a largo plazo, se puede agregar en fibras amiloides que se depositan en espacios unidos, una enfermedad conocida como amiloidosis relacionada con diálisis. Se usan las concentraciones en suero y orina de B2M para supervisar las nefropatías glomerulares y tubulares.

20 Como se usa en el presente documento, "creatinina" se refiere a un producto de degradación de fosfato de creatina en el músculo y se produce habitualmente a una tasa bastante constante por el cuerpo (dependiendo de la masa muscular). Químicamente, la creatinina es un derivado de creatina cíclico formado espontáneamente. La creatinina es filtrada de la sangre principalmente por los riñones, aunque una pequeña cantidad es secretada de forma activa por los riñones a la orina. Hay poca o ninguna reabsorción tubular de creatinina. Si el filtrado del riñón es deficiente, los niveles en sangre aumentan. Por lo tanto, los niveles de creatinina en sangre y orina pueden usarse para calcular la eliminación de creatinina (EICr), que refleja la tasa de filtración glomerular (TFG), como una medición de la función renal.

30 Como se usa en el presente documento "vasopresina", también conocida como hormona antidiurética (ADH), se refiere a una hormona peptídica que controla la reabsorción de moléculas en los túbulos de los riñones afectando a la permeabilidad del tejido. Desempeña un papel clave en la homeostasis y la regulación de agua, glucosa y sales en la sangre. La vasopresina tiene tres efectos por los que contribuye a la osmolalidad de orina aumentada (concentración aumentada) y excreción de agua reducida: aumento de la permeabilidad a agua de las células del túbulo colector en el riñón (es decir antidiurético); aumento de la permeabilidad de la parte medular interna del túbulo colector a la urea; y estimulación de la reabsorción de sodio y cloruro. La liberación de vasopresina reducida o sensibilidad renal a AVP reducida conduce a diabetes insípida, una afección que presenta hipernatremia, poliuria y polidipsia.

40 Como se usa en el presente documento, "aldosterona" se refiere a una hormona esteroidea (familia de mineralocorticoides) producida por la sección externa (zona glomerular) de la corteza suprarrenal en la glándula suprarrenal y actúa en los túbulos distales y túbulos recolectores del riñón para provocar la conservación de sodio, secreción de potasio, retención de agua aumentada y tensión arterial aumentada. La aldosterona es una hormona que aumenta la reabsorción de sodio y agua y la liberación (secreción) de potasio en los riñones. Esto aumenta el volumen sanguíneo y, por lo tanto, aumenta la tensión arterial. Una medición de aldosterona en sangre puede denominarse una concentración de aldosterona en plasma (CAP), que puede compararse con la actividad de renina en plasma (ARP) como una relación CAP/ARP.

50 Como se usa en el presente documento, "angiotensina" se refiere a un oligopéptido en la sangre que provoca vasoconstricción, tensión arterial aumentada y liberación de aldosterona de la corteza suprarrenal. Es una hormona y un dipsógeno potente. Se obtiene de la molécula precursora angiotensinógeno, una globulina en suero producida en el hígado. Es parte del sistema de renina-angiotensina, que es una diana importante para fármacos que reducen la presión sanguínea. La angiotensina I se forma por la acción de renina en angiotensina. Parece que no tiene actividad biológica y existe solamente como un precursor de angiotensina II. La angiotensina I se convierte en angiotensina II mediante la retirada de dos restos C terminales por la enzima conversora de angiotensina (ACE). La angiotensina II tiene un efecto directo en los túbulos proximales para aumentar la reabsorción de sodio. Como se usa en el presente documento, la "enzima conversora de angiotensina" o "ACE" se refiere a una exopeptidasa que es una enzima en circulación que participa en el sistema de renina-angiotensina del cuerpo (y que media en el volumen extracelular (es decir el del plasma sanguíneo, la linfa y el líquido intersticial) y vasoconstricción arterial. Se secreta por células endoteliales pulmonares y renales y cataliza la conversión del decapeptido angiotensina I al octapéptido angiotensina II. Además, la ACE degrada bradiquinina, un vasodilatador potente y otros péptidos vasoactivos.

65 Las designaciones ANP, proANP, MR-proANP, proBNP, NTproBNP, BNP, cistatina C, lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL), U-albúmina, γ -glutamyl transpeptidasa (γ GT), N-Acetil-beta-(D)-Glucosaminidasa (NAG), alfa-1-microglobulina (A1M), beta-2-microglobulina (B2M), urea, creatinina, vasopresina, aldosterona, angiotensina y ACE (denominados en lo sucesivo en el presente documento "biomarcadores adicionales") como se

usan en el presente documento se refieren en particular en el presente documento a dichos péptidos con una secuencia nativa, es decir, péptidos de los que la secuencia primaria es la misma que la de respectivamente ANP, proANP, MR-proANP, proBNP, NTproBNP, cistatina C, lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL), U-albúmina, γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GT), N-Acetil-beta-(D)-Glucosaminidasa (NAG), alfa-1-microglobulina (A1M), beta-2-microglobulina (B2M), urea, creatinina, vasopresina, aldosterona, angiotensina, ACE BNP hallados en u obtenidos de la naturaleza. Un experto en la materia entiende que las secuencias nativas de estos biomarcadores adicionales pueden diferir entre diferentes especies debido a la divergencia genética entre dichas especies. Además, las secuencias nativas de estos biomarcadores adicionales pueden diferir entre o incluso dentro de individuos diferentes de la misma especie debido a la diversidad genética normal (variación) en una especie dada. Además, las secuencias nativas de estos biomarcadores adicionales pueden diferir entre o incluso dentro de individuos diferentes de la misma especie debido a modificaciones postranscripcionales o postraduccionales. En consecuencia, todas estas secuencias de biomarcadores adicionales halladas en u obtenidas de la naturaleza se consideran "nativas". Los términos abarcan dichos péptidos de cualquier organismo en el que se encuentren, y particularmente de animales, preferentemente vertebrados, más preferentemente mamíferos, incluyendo seres humanos y mamíferos no humanos, aún más preferentemente de seres humanos.

Las designaciones de estos biomarcadores adicionales como se usan en el presente documento abarcan los péptidos respectivos cuando forman parte de un organismo vivo, órgano, tejido o célula, cuando forman parte de una muestra biológica, así como cuando se aíslan al menos parcialmente de dichas fuentes. Los términos también abarcan los péptidos respectivos cuando se producen por medios recombinantes o sintéticos.

La referencia en el presente documento a estos biomarcadores adicionales también puede abarcar fragmentos de uno cualquiera de estos biomarcadores adicionales. Por lo tanto, la referencia en el presente documento a la medición de la presencia o ausencia y/o cantidad de estos biomarcadores adicionales, puede abarcar la medición de péptidos de estos biomarcadores adicionales y/o medición de uno o más fragmentos de uno cualquiera de estos péptidos biomarcadores adicionales. Por ejemplo, estos péptidos biomarcadores adicionales y/o uno o más fragmentos de uno cualquiera de los mismos pueden medirse colectivamente, de modo que la cantidad medida corresponda a la suma de las cantidades de las especies medidas colectivamente. En otro ejemplo, estos péptidos biomarcadores adicionales y/o uno o más fragmentos de uno cualquiera de los mismos pueden medirse cada uno individualmente.

Además, a no ser que resulte evidente de otro modo por el contexto, la referencia en el presente documento a cualquier proteína, polipéptido o péptido y fragmentos de los mismos puede abarcar también en general formas modificadas de dicha proteína, polipéptido o péptido y fragmentos tales como los que porten modificaciones postexpresión incluyendo, por ejemplo, fosforilación, glucosilación, lipidación, metilación, cisteinilación, sulfonación, glutationilación, acetilación, oxidación de metionina a sulfoxido de metionina o sulfona de metionina, y similares.

En una realización, MCAM y fragmentos de los mismos, o los biomarcadores adicionales como se describen en el presente documento y fragmentos de los mismos pueden ser humanos, es decir, su secuencia primaria puede ser la misma que una secuencia primaria correspondiente de o presente en una MCAM humana de origen natural y fragmentos de la misma, o dichos biomarcadores como se describen en el presente documento y fragmentos de los mismos. Por lo tanto, el calificador "humano" en relación con esto se refiere a la secuencia primaria de las proteínas respectivas, polipéptidos, péptidos o fragmentos, en lugar de su origen o fuente. Por ejemplo, dichas proteínas, polipéptidos, péptidos o fragmentos pueden estar presentes en o aislarse de muestras de sujetos humanos o pueden obtenerse por otro medio (por ejemplo, por expresión recombinante, traducción sin células o síntesis peptídica no biológica).

El término "fragmento" de una proteína, un polipéptido o un péptido se refiere en general a formas suprimidas o truncadas en sentido N terminal y/o C terminal de dicha proteína, polipéptido o péptido. El término abarca fragmentos que surgen por cualquier mecanismo, tal como, sin limitación, por traducción alternativa, exo y/o endoproteólisis y/o degradación de dicha proteína o polipéptido, tal como, por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*, tal como, por ejemplo, por proteólisis física, química y/o enzimática. Sin limitación, un fragmento de una proteína, un polipéptido o un péptido puede representar al menos aproximadamente 5 % o al menos aproximadamente 10 %, por ejemplo, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$ o $\geq 40\%$, tal como $\geq 50\%$, por ejemplo, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$ o $\geq 80\%$ o incluso $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ de la secuencia de aminoácidos de dicha proteína, polipéptido o péptido.

Por ejemplo, un fragmento de MCAM puede incluir una secuencia de ≥ 5 aminoácidos consecutivos, o ≥ 10 aminoácidos consecutivos, o ≥ 20 aminoácidos consecutivos, o ≥ 30 aminoácidos consecutivos, por ejemplo, ≥ 40 aminoácidos consecutivos, tal como por ejemplo ≥ 50 aminoácidos consecutivos, por ejemplo, ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 90 , ≥ 100 , ≥ 200 , ≥ 300 , ≥ 400 , ≥ 500 o ≥ 600 aminoácidos consecutivos de MCAM.

En una realización, un fragmento de MCAM puede estar truncado en dirección N terminal y/o C terminal por entre 1 y aproximadamente 20 aminoácidos, tal como, por ejemplo, por entre 1 y aproximadamente 15 aminoácidos, o por entre 1 y aproximadamente 10 aminoácidos o por entre 1 y aproximadamente 5 aminoácidos, en comparación con MCAM de longitud completa, madura (SEQ ID NO.1) o su forma soluble (consúltese la Figura 1).

- En una realización, un fragmento de ANP, proANP, MR-proANP, proBNP, NTproBNP, BNP, cistatina C, NGAL, U-albúmina, γ -GT, NAG, AI M, B1M, creatinina, vasopresina, aldosterona, angiotensina, ACE puede estar truncado en dirección N terminal y/o C terminal por entre 1 y aproximadamente 20 aminoácidos, tal como, por ejemplo, por entre 1 y aproximadamente 15 aminoácidos, o por entre 1 y aproximadamente 10 aminoácidos o por entre 1 y aproximadamente 5 aminoácidos, en comparación con ANP, proANP, MR-proANP, proBNP, NTproBNP, BNP, cistatina C, NGAL, U-albúmina, γ -GT, NAG, A1M, B1M, creatinina, vasopresina, aldosterona, angiotensina, ACE. A modo de ejemplo, se desvelan fragmentos de proBNP, NTproBNP y BNP útiles como biomarcadores en el documento WO 2004/094460.
- En una realización, pueden conseguirse fragmentos de una proteína, un polipéptido o un péptido dado mediante proteólisis *in vitro* de dicha proteína, polipéptido o péptido para obtener provechosamente péptido o péptidos detectables de una muestra.
- Por ejemplo, dicha proteólisis puede efectuarse por agentes físicos, químicos y/o enzimáticos adecuados, por ejemplo, proteinasas, preferentemente endoproteinasas, proteasa que escinde de forma interna en una cadena de proteína, polipéptido o péptido. Una lista no limitante de endoproteinasas adecuadas incluye serina proteinasas (EC 3.4.21), treonina proteinasas (EC 3.4.25), cisteína proteinasas (EC 3.4.22), ácido aspártico proteinasas (EC 3.4.23), metaloproteinasas (EC 3.4.24) y ácido glutámico proteinasas.
- Las endoproteinasas no limitantes ejemplares incluyen tripsina, quimotripsina, elastasa, endoproteinasa de *Lysobacter enzymogenes* Lys-C, endoproteinasa de *Staphylococcus aureus* Glu-C (endopeptidasa V8) o endoproteinasa de *Clostridium histolyticum* Arg-C (clostripaina). Pueden usarse más enzimas conocidas o aún no identificadas; un experto en la materia puede elegir proteasa o proteasas adecuadas basándose en su especificidad y frecuencia de escisión para conseguir formas peptídicas deseadas.
- Preferentemente, la proteólisis puede efectuarse por endopeptidasas del tipo tripsina (EC 3.4.21.4), preferentemente tripsina, tales como, sin limitación, preparaciones de tripsina de páncreas bovino, páncreas humano, páncreas porcino, tripsina recombinante, tripsina Lys-acetilada, tripsina en solución, tripsina inmovilizada en un soporte sólido, etc. La tripsina es particularmente útil, entre otras cosas debido a la alta especificidad y eficacia de escisión. La divulgación también contempla el uso de cualquier proteasa de tipo tripsina, es decir, con una especificidad similar a la de tripsina.
- De otro modo, los reactivos químicos pueden usarse para proteólisis. Por ejemplo, CNBr puede escindir en Met; BNPS-escatol puede escindir en Trp.
- Las condiciones para el tratamiento, por ejemplo, concentración de proteína, concentración de enzima o reactivo químico, pH, tampón, temperatura, tiempo, pueden ser determinadas por el experto en la materia dependiendo de la enzima o el reactivo químico empleado.
- Por lo tanto, en el presente documento se desvela también un fragmento aislado de MCAM como se ha definido anteriormente en el presente documento. Dichos fragmentos pueden proporcionar información útil acerca de la presencia y cantidad de MCAM en muestras biológicas, por lo que la detección de dichos fragmentos es de interés. Por lo tanto, los fragmentos desvelados en el presente documento de MCAM son biomarcadores útiles.
- El término "aislado" en referencia a un componente particular (tal como por ejemplo, una proteína, un polipéptido, un péptido o un fragmento del mismo) indica en general que dicho componente existe separado de — por ejemplo, se ha separado de o preparado separado de — uno o más componentes adicionales de su ambiente natural. Por ejemplo, una proteína, un polipéptido, un péptido o un fragmento humano o animal aislado existe separado de un cuerpo humano o animal donde aparece de forma natural.
- El término "aislado" como se usa en el presente documento también puede abarcar preferentemente el calificador "purificado". Como se usa en el presente documento, el término "purificado" en referencia a proteína o proteínas, polipéptido o polipéptidos, péptido o péptidos y/o fragmento o fragmentos de los mismos no requiere pureza absoluta. En su lugar, indica que dichas proteína o proteínas, polipéptido o polipéptidos, péptido o péptidos y/o fragmento o fragmentos están en un ambiente discreto en que su abundancia (expresada convenientemente en masa o peso o concentración) en relación con otras proteínas es mayor que en una muestra biológica. Un ambiente discreto indica un medio individual, tal como por ejemplo una solución individual, gel, precipitado, liofilizado, etc. Pueden obtenerse péptidos, polipéptidos o fragmentos purificados por métodos conocidos incluyendo, por ejemplo, síntesis de laboratorio o recombinante, cromatografía, electroforesis preparatoria, centrifugación, precipitación, purificación por afinidad, etc.
- La proteína o proteínas, polipéptido o polipéptidos, péptido o péptidos y/o fragmento o fragmentos pueden constituir preferentemente en peso $\geq 10\%$, más preferentemente $\geq 50\%$, tal como $\geq 60\%$, aún más preferentemente $\geq 70\%$, tal como $\geq 80\%$, y aún más preferentemente $\geq 90\%$, tal como $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$ o incluso 100% , del contenido de proteína del ambiente discreto. El contenido de proteína puede determinarse, por ejemplo, por el método de Lowry (Lowry *et al.* 1951. J Biol Chem 193: 265), opcionalmente como se describe en Hartree 1972

(Anal Biochem 48: 422-427). Además, la pureza de los péptidos o polipéptidos puede determinarse mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata.

5 También se desvelan MCAM aislada o fragmentos de MCAM que comprenden un marcador detectable. Esto facilita la detección sencilla de dichos fragmentos. El término "marcador" como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva se refiere a cualquier átomo, molécula, resto o biomolécula que pueda usarse para proporcionar una lectura o propiedad detectable y preferentemente cuantificable, y que pueda unirse a o hacerse parte de una entidad de interés, tal como un péptido o polipéptido o un agente de unión específico. Los marcadores pueden detectarse convenientemente por medios espectrométrico de masas, espectroscópico, óptico, colorimétrico, magnético, 10 fotoquímico, bioquímico, inmunológico o químico. Los marcadores incluyen sin limitación colorantes; radiomarcadores tales como ^{32}P ; ^{33}P ; ^{35}S ; ^{125}I ^{131}I ; reactivos electrodenso; enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina como se usan habitualmente en inmunoensayos); restos de unión tales como biotina-estreptavidina; haptenos tales como digoxigenina; restos luminogénicos, fosforescentes o fluorogénicos; marcadores de masas; y colorantes fluorescentes solos o en combinación con restos que pueden suprimir o 15 desplazar los espectros de emisión por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TERF).

En una realización, la MCAM aislada o fragmentos de MCAM como se enseñan en el presente documento pueden marcarse por un marcador de alteración de la masa. Preferentemente, un marcador de alteración de la masa puede implicar la presencia de un isótopo estable definido en uno o más aminoácidos del péptido frente a su péptido no 20 marcado correspondiente. Los péptidos marcados por masa son particularmente útiles como controles positivos, patrones y calibradores en aplicaciones de espectrometría de masas. En particular, los péptidos que incluyen uno o más isótopos distintos son químicamente similares, cromatográfica o electrográficamente separados de la misma manera y también se ionizan y fragmentan de la misma manera. Sin embargo, en un analizador de masas adecuado dichos péptidos y opcionalmente iones de fragmentación selectos de los mismos presentarán relaciones m/z 25 distinguibles y por lo tanto pueden diferenciarse. Los ejemplos de pares de isótopos estables distinguibles incluyen H y D, ^{12}C y ^{13}C , ^{14}N y ^{15}N o ^{16}O y ^{18}O . Habitualmente, los péptidos y proteínas de muestras biológicas analizadas en la presente invención pueden contener solo sustancialmente isótopos comunes que tienen alta prevalencia en la naturaleza, tales como por ejemplo H, ^{12}C , ^{14}N y ^{16}O . En tal caso, el péptido marcado por masa puede marcarse con uno o más isótopos poco habituales que tienen baja prevalencia en la naturaleza, tales como por ejemplo D, ^{13}C , ^{15}N 30 y/o ^{18}O . También es concebible que en casos en los que los péptidos o las proteínas de una muestra biológica incluyan uno o más isótopos poco habituales, el péptido marcado por masa puede comprender el isótopo o los isótopos habituales respectivos.

Pueden obtenerse péptidos sintéticos marcados de forma isotópica entre otros sintetizando o produciendo de forma 35 recombinante dichos péptidos usando uno o más sustratos de aminoácidos marcados de forma isotópica o modificando péptidos no marcados para introducir en los mismos uno o más isótopos distintos. A modo de ejemplo y no de limitación, pueden sintetizarse péptidos D marcados o producirse de forma recombinante en presencia de L-metionina deuterada $\text{CH}_3\text{-S-CD}_2\text{CD}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ o arginina deuterada $\text{H}_2\text{NC(=NH)-NH-(CD}_2\text{)}_3\text{-CD(NH}_2\text{)-000H}$ disponibles en el mercado. Se apreciará que cualquier aminoácido del que existan formas deuteradas o que 40 contengan ^{15}N - o ^{13}C puede considerarse para síntesis o producción recombinante de péptidos marcados. En otro ejemplo no limitante, un péptido puede tratarse con tripsina en $\text{H}_2\text{ }^{16}\text{O}$ o $\text{H}_2\text{ }^{18}\text{O}$, lo que conduce a la incorporación de dos oxígenos (^{16}O o ^{18}O , respectivamente) en los extremos COOH de dicho péptido (por ejemplo, documento US 2006/105415).

45 En consecuencia, también se contempla el uso de MCAM y fragmentos aislados de MCAM como se enseña en el presente documento, opcionalmente que comprenden un marcador detectable, como controles (positivos), patrones o calibradores en ensayos de detección cualitativos o cuantitativos (métodos de medición) de MCAM y particularmente en dichos métodos para predecir, diagnosticar, pronosticar y/o supervisar las afecciones, los síntomas y/o los parámetros en sujetos como se enseña en el presente documento. Las proteínas, los polipéptidos o los péptidos pueden proporcionarse en cualquier forma, entre otras como un precipitado, secados al vacío, liofilizados, en solución como un líquido o congelados, o inmovilizados de forma covalente o no covalente en fase 50 sólida, tal como por ejemplo, en matriz cromatográfica sólida o en vidrio o plástico u otras superficies adecuadas (por ejemplo, como parte de matrices y micromatrices de péptidos). Los péptidos pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, aislarse de fuentes naturales o prepararse de forma recombinante o sintética.

55 También se proporcionan agentes de unión capaces de unirse específicamente con uno o más de los fragmentos aislados de MCAM como se enseña en el presente documento. Se proporcionan además agentes de unión capaces de unirse específicamente con solamente uno de los fragmentos aislados de MCAM como se enseña en el presente documento. Dichos agentes de unión pueden incluir entre otros un anticuerpo, aptámero, fotoaptámero, proteína, 60 péptido, peptidomimético o una molécula pequeña.

En una realización preferida, dicho agente de unión es capaz de unirse a las formas tanto unidas a membrana como en circulación en plasma de MCAM. Preferentemente, dicho agente de unión es capaz de unirse específicamente a o detectar la forma en circulación en plasma de MCAM.

65 La expresión "unirse específicamente" como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva significa que un agente

(indicado en el presente documento también como "agente de unión específico") se une con una o más moléculas o analitos deseados, tales como una o más proteínas, polipéptidos o péptidos de interés o fragmentos de los mismos sustancialmente excluyendo otras moléculas que son aleatorias o no están relacionadas y opcionalmente incluyendo otras moléculas que están estructuralmente relacionadas.

5 La expresión "unirse específicamente" no requiere necesariamente que un agente se una exclusivamente con su diana o dianas pretendidas. Por ejemplo, puede decirse que un agente se une específicamente con una proteína o proteínas, polipéptido o polipéptidos, péptido o péptidos y/o fragmento o fragmentos de los mismos de interés si su afinidad por dicha o dichas dianas pretendidas en las condiciones de unión es al menos aproximadamente 2 veces mayor, preferentemente al menos aproximadamente 5 veces mayor, más preferentemente al menos aproximadamente 10 veces mayor, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 veces mayor, todavía más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces mayor y aún más preferentemente al menos aproximadamente 100 veces o más mayor, que su afinidad por una molécula no diana.

15 Preferentemente, el agente puede unirse con su diana o sus dianas pretendidas con constante de afinidad (K_A) de dicha unión $K_A \geq 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, más preferentemente $K_A \geq 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, incluso más preferentemente $K_A \geq 1 \times 10^8$ aún más preferentemente $K_A \geq 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, y todavía más preferentemente $K_A \geq 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ o $K_A \geq 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, en donde $K_A = [SBA_T]/[SBA][T]$, SBA indica el agente de unión específico, T indica la diana pretendida. La determinación de K_A puede llevarse a cabo por métodos conocidos en la técnica, tales como por ejemplo, usando diálisis en equilibrio y análisis de representación de Scatchard.

Los agentes de unión específicos como se usan a lo largo de esta memoria descriptiva pueden incluir entre otros un anticuerpo, un aptámero, un fotoaptámero, una proteína, un péptido, un peptidomimético o una molécula pequeña.

25 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y en general se refiere a cualquier agente de unión inmunológico. El término abarca específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes (por ejemplo, 2, 3 o más valentes) y/o multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos bi o más específicos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos en la medida en que muestren la actividad biológica deseada (en particular, la capacidad para unirse específicamente con un antígeno de interés), así como compuestos multivalentes y/o multiespecíficos de dichos fragmentos. El término "anticuerpo" no solamente incluye anticuerpos generados por métodos que comprenden inmunización, sino que también incluye cualquier polipéptido, por ejemplo, un polipéptido expresado de forma recombinante, que se haga que incluya al menos una región determinante de complementariedad (CDR) capaz de unirse específicamente con un epítipo en un antígeno de interés. Por lo tanto, el término se aplica a dichas moléculas independientemente de si se producen *in vitro* o *in vivo*.

En una realización, un anticuerpo puede ser de cualquiera de las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y preferentemente anticuerpo de la clase IgG.

40 En una realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, por ejemplo, un antisuero o inmunoglobulinas purificadas a partir del mismo (por ejemplo, purificadas por afinidad).

En otra realización preferida, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o una mezcla de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden dirigirse a un antígeno particular o un epítipo particular en un antígeno con mayor selectividad y reproducibilidad.

50 A modo de ejemplo y no de limitación, pueden realizarse anticuerpos monoclonales por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.* 1975 (Nature 256: 495), o pueden realizarse por métodos de ADN recombinante (por ejemplo, como en el documento US 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando técnicas como se describen en Clackson *et al.* 1991 (Nature 352: 624-628) y Marks *et al.* 1991 (J Mol Biol 222: 581-597), por ejemplo.

En realizaciones adicionales, los agentes de unión a anticuerpo pueden ser fragmentos de anticuerpo. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multivalentes y/o multiespecíficos formados a partir de fragmento o fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, dicuerpos, tricuerpos y multicuerpos. Se pretende que las designaciones anteriores Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, etc. tengan su significado establecido en la técnica.

60 El término anticuerpo incluye anticuerpos que se originan de o que comprenden una o más partes obtenidas de cualquier especie animal, preferentemente especies de vertebrados, incluyendo, por ejemplo, aves y mamíferos. Sin limitación, los anticuerpos pueden ser de pollo, pavo, ganso, pato, gallina de guinea, codorniz o faisán. También sin limitación, los anticuerpos pueden ser humanos, murinos (por ejemplo, de ratón, rata, etc.), de burro, de conejo, de cabra, de oveja, de cobaya, de camello (por ejemplo, *Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), de llama (por ejemplo, *Lama paccos*, *Lama glama* o *Lama vicugna*) o de caballo.

Un experto en la materia entenderá que un anticuerpo puede incluir una o más supresiones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas), en la medida en que dichas alteraciones conserva su unión del antígeno respectivo. Un anticuerpo puede incluir también una o más modificaciones nativas o artificiales de sus restos de aminoácidos constituyentes (por ejemplo, glucosilación, etc.).

5 Se conocen bien en la técnica métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales así como fragmentos de los mismos, y también métodos para producir anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos (véase por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, Nueva York, 1988; Harlow y Lane, "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, Nueva York, 1999, ISBN 0879695447; "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", por Zola, ed., CRC Press 1987, ISBN 0849364760; 10 "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach", por Dean y Shepherd, eds., Oxford University Press 2000, ISBN 0199637229; Methods in Molecular Biology, vol. 248: "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Lo, ed., Humana Press 2004, ISBN 1588290921).

15 El término "aptámero" se refiere a oligo-ADN, oligo-ARN u oligo-ADN/ARN monocatenario o bicatenario o cualquier análogo de los mismos, que puede unirse específicamente con una molécula diana tal como un péptido. Provechosamente, los aptámeros pueden presentar especificidad y afinidad bastante altas (por ejemplo, KA en el orden de $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) por sus dianas. Se describe la producción de aptámeros entre otros en el documento US 5.270.163; Ellington y Szostak 1990 (Nature 346: 818-822); Tuerk y Gold 1990 (Science 249: 505-510); o "The 20 Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications", por Klussmann, ed., Wiley-VCH 2006, ISBN 3527310592. El término "fotoaptámero" se refiere a un aptámero que contiene uno o más grupos funcionales fotoreactivos que pueden unirse covalentemente o reticular con una molécula diana. El término "peptidomimético" se refiere a un agente no peptídico que es un análogo topológico de un péptido correspondiente. Se conocen en la 25 técnica métodos para diseñar racionalmente peptidomiméticos de péptidos. Por ejemplo, el diseño racional de tres peptidomiméticos basado en el péptido de 8 unidades sulfatado CCK26-33 y de dos peptidomiméticos basados en el péptido de 11 unidades Sustancia P, y principios del diseño de peptidomiméticos relacionados, se describen en Horwell 1995 (Trends Biotechnol 13: 132-134).

30 La expresión "molécula pequeña" se refiere a compuestos, preferentemente compuestos orgánicos, con un tamaño comparable a las moléculas orgánicas usadas en general en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en su tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, por ejemplo, hasta aproximadamente 4000, preferentemente hasta aproximadamente 3000 Da, más preferentemente hasta aproximadamente 2000 Da, aún más preferentemente hasta aproximadamente 1000 Da, por ejemplo, hasta aproximadamente 900, 800, 700, 600 o hasta 35 aproximadamente 500 Da.

También se desvelan métodos para inmunizar animales, por ejemplo, animales no humanos tales como animales de laboratorio o de granja, usando (es decir, usando como el antígeno inmunizador) los fragmentos enseñados en el presente documento de MCAM, opcionalmente unidos a un vehículo de presentación. La inmunización y preparación 40 de reactivos de anticuerpos de sueros inmunitarios se conocen bien en sí mismas y se describen en documentos a los que se hace referencia en otra parte de la presente memoria descriptiva. Los animales para inmunizar pueden incluir cualquier especie animal, preferentemente especies de sangre caliente, más preferentemente especies de vertebrados, incluyendo, por ejemplo, aves y mamíferos. Sin limitación, los anticuerpos pueden ser de pollo, pavo, ganso, pato, gallina de guinea, codorniz o faisán. También sin limitación, los anticuerpos pueden ser humanos, 45 murinos (por ejemplo, de ratón, rata, etc.), de burro, de conejo, de cabra, de oveja, de cobaya, de camello, de llama o de caballo.

La expresión "vehículo de presentación" o "vehículo" indica en general una molécula inmunogénica que, cuando se une a una segunda molécula, aumenta las respuestas inmunitarias a esta última, habitualmente mediante el aporte 50 de epítopos de linfocitos T adicionales. El vehículo de presentación puede ser una estructura (poli)peptídica o una estructura no peptídica, tal como entre otros glucanos, polietilenglicoles, peptidomiméticos, polímeros sintéticos, etc. Los vehículos no limitantes ejemplares incluyen proteína del núcleo del virus de la hepatitis B humana, múltiples dominios C3d, fragmento C de toxina del tétanos o partículas Ty de levadura. Los sueros inmunitarios obtenidos o que pueden obtenerse por inmunización como se enseña en el presente documento pueden ser particularmente 55 útiles para generar reactivos de anticuerpos que se unen específicamente con uno o más de los fragmentos desvelados en el presente documento de MCAM.

También se desvela un método para seleccionar agentes de unión específica que se unen con (a) uno o más de los fragmentos de MCAM enseñados en el presente documento, sustancialmente excluyendo (b) MCAM y/u otros 60 fragmentos de la misma. Convenientemente, dichos métodos pueden basarse en la sustracción o retirada de agentes de unión que reaccionan de forma cruzada o se unen de forma cruzada con las moléculas de MCAM no deseadas en (b). Dicha sustracción puede realizarse como se conoce en la técnica mediante una diversidad de métodos de separación por afinidad, tales como cromatografía de afinidad, extracción en fase sólida por afinidad, extracción magnética por afinidad, etc.

65 Puede usarse cualquier método de separación, detección y cuantificación existente, disponible o convencional en el

presente documento para medir la presencia o ausencia (por ejemplo, lectura presente frente a ausente; o cantidad detectable frente a indetectable) y/o cantidad (por ejemplo, lectura en una cantidad absoluta o relativa, tal como, por ejemplo, concentración absoluta o relativa) de MCAM y/o fragmentos de la misma y opcionalmente del o los biomarcadores útiles para las afecciones, los síntomas y/o los parámetros según la invención en muestras (cualquier molécula o analito de interés para medir en muestras, incluyendo MCAM y fragmentos de la misma, puede indicarse posteriormente en el presente documento colectivamente como biomarcadores).

Por ejemplo, dichos métodos pueden incluir métodos de inmunoensayo, métodos de análisis de espectrometría de masas o métodos de cromatografía, o combinaciones de los mismos.

El término "inmunoensayo" se refiere en general a métodos conocidos como tales para detectar una o más moléculas o analitos de interés en una muestra, en donde la especificidad de un inmunoensayo para la molécula o las moléculas o el analito o los analitos de interés es conferida por la unión específica entre un agente de unión específica, habitualmente un anticuerpo, y la molécula o las moléculas o el analitos o los analitos de interés.

Las tecnologías de inmunoensayo incluyen sin limitación tecnologías de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) directo, ELISA indirecto, ELISA de tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA múltiple, radioinmunoensayo (RIA), ELISPOT y otras técnicas similares conocidas en este campo. Se conocen en la técnica principios de estos métodos de inmunoensayo, por ejemplo John R. Crowther, "The ELISA Guidebook", 1ª ed., Humana Press 2000, ISBN 0896037282.

A modo de explicación adicional y sin limitación, el ELISA directo emplea un anticuerpo primario marcado con el que unirse y por lo tanto cuantifican el antígeno diana en una muestra inmovilizada en un soporte sólido tal como una placa de micropocillos. El ELISA indirecto usa un anticuerpo primario no marcado que se une con el antígeno diana y un anticuerpo marcado secundario que reconoce y permite cuantificar el anticuerpo primario unido a antígeno. En ELISA de tipo sándwich el antígeno diana se captura de una muestra usando un anticuerpo de "captura" inmovilizado que se une con un sitio antigénico en el antígeno y después de la retirada de analitos no unidos el antígeno así capturado se detecta usando un anticuerpo de "detección" que se une con otro sitio antigénico en dicho antígeno, donde el anticuerpo de detección puede estar marcado directamente o ser detectable indirectamente como anteriormente. El ELISA competitivo usa un "competidor" marcado que puede ser el anticuerpo primario o el antígeno diana. En un ejemplo, se incubaba anticuerpo primario inmovilizado no marcado con una muestra, se permite que esta reacción alcance el equilibrio y después se añade antígeno diana marcado. Este último se unirá con el anticuerpo primario siempre que sus sitios de unión no estén ocupados aún por antígeno diana no marcado de la muestra. Por lo tanto, la cantidad detectada de antígeno marcado unido se correlaciona de forma inversa con la cantidad de antígeno no marcado en la muestra. El ELISA múltiple permite la detección simultánea de dos o más analitos en un único compartimento (por ejemplo, pocillo de microplaca) habitualmente en una pluralidad de direcciones de matriz (véase, por ejemplo, Nielsen y Geierstanger 2004. *J Immunol Methods* 290: 107-20 y Ling *et al.* 2007. *Expert Rev Mol Diagn* 7: 87-98 para orientación adicional). Como se aprecia, el marcaje en tecnologías de ELISA y más en general en tecnologías de inmunoensayo es habitualmente mediante conjugación con enzima (tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante) y el criterio de valoración es típicamente colorimétrico, quimioluminiscente o fluorescente, magnético, piezoeléctrico, piroeléctrico y otro.

El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica basada en competición e implica mezclar cantidades conocidas de antígeno diana marcado con radiactividad (por ejemplo, marcado con ^{125}I o ^{131}I) con anticuerpo para dicho antígeno, después añadir antígeno no marcado o "frío" de un muestra y medir la cantidad de antígeno marcado desplazado (véase, por ejemplo, "An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques", por Chard T, ed., Elsevier Science 1995, ISBN 0444821198 para orientación).

Además, los métodos de espectrometría de masas son adecuados para medir biomarcadores.

En general, cualquier técnica espectrométrica de masas (MS) que pueda obtener información precisa sobre la masa de péptidos, y preferentemente también sobre fragmentación y/o secuencia de aminoácidos (parcial) de péptidos seleccionados (por ejemplo, en espectrometría de masas en tándem, MS/MS; o en desintegración después de la fuente, TOF MS), son útiles en el presente documento. Se conocen bien por sí mismas técnicas de MS y MS/MS de péptidos adecuadas (véase, por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, vol. 146: "Mass Spectrometry of Proteins and Peptides", por Chapman, ed., Humana Press 2000, ISBN 089603609x; Biemann 1990. *Methods Enzymol* 193: 455-79; o *Methods in Enzymology*, vol. 402: "Biological Mass Spectrometry", por Burlingame, ed., Academic Press 2005, ISBN 9780121828073) y pueden usarse en el presente documento.

Los mecanismos de MS, instrumentos y sistemas adecuados para análisis de péptidos biomarcadores pueden incluir, sin limitación, MS de desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDITOF); desintegración después de la fuente (PSD) de MALDI-TOF; MALDI-TOF/TOF; espectrometría de masas MS de desorción/ionización por láser potenciada en superficie-tiempo de vuelo (SELDI-TOF); espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS); ESI-MS/MS; ESI-MS/(MS)ⁿ (n es un número entero mayor de cero); MS de trampa iónica tridimensional o lineal (bidimensional) de ESI; MS de cuádrupolo triple de ESI; TOF ortogonal cuádrupolo de ESI (Q-TOF); sistemas de MS de transformada de Fourier de ESI; desorción/ionización en silicio

(DIOS); espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS); espectrometría de masas de ionización química a presión atmosférica (APCI-MS); APCI-MS/MS; APCI- (MS)ⁿ; espectrometría de masas de fotoionización a presión atmosférica (APPI-MS); APPI-MS/MS; y APPI- (MS)ⁿ. Pueden realizarse disposiciones de fragmentación de iones peptídicos en MS en tándem (MS/MS) usando modos establecidos en la técnica, tales como, por ejemplo, disociación inducida por colisión (CID).

En una realización, la detección y cuantificación de biomarcadores por espectrometría de masas pueden implicar supervisión de reacciones múltiples (MRM), tal como se describe entre otros en Kuhn *et al.* 2004 (Proteomics 4: 1175-86).

En una realización, los métodos de análisis de péptidos por MS pueden combinarse provechosamente con métodos de separación o fraccionamiento de péptidos o proteínas cadena arriba, tal como por ejemplo con los métodos cromatográficos y otros descritos en el presente documento posteriormente.

También puede usarse cromatografía para medir biomarcadores. Como se usa en el presente documento, el término "cromatografía" abarca métodos para separar sustancia químicas, denominados así y ampliamente disponibles en la técnica. En un enfoque preferido, la cromatografía se refiere a un proceso en el que una mezcla de sustancias químicas (analitos) portadas por una corriente en movimiento de líquido o gas ("fase móvil") se separa en componentes como resultado de distribución diferencial de los analitos, a medida que fluyen alrededor o sobre una fase líquida o sólida estacionaria ("fase estacionaria"), entre dicha fase móvil y dicha fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser habitualmente un sólido finamente dividido, una lámina de material de filtro o una película fina de un líquido en la superficie de un sólido, o similares. La cromatografía también es aplicable para la separación de compuestos químicos de origen biológico, tales como, por ejemplo, aminoácidos, proteínas, fragmentos de proteínas o péptidos, etc.

La cromatografía como se usa en el presente documento puede ser preferentemente columnar (es decir en donde la fase estacionaria se deposita o envasa en una columna), preferentemente cromatografía líquida y aún más preferentemente HPLC. Aunque se conocen bien en la técnica detalles de la cromatografía, para orientación adicional véase, por ejemplo, Meyer M., 1998, ISBN: 047198373X y "Practical HPLC Methodology and Applications", Bidlingmeyer, B. A., John Wiley & Sons Inc., 1993.

Los tipos ejemplares de cromatografía incluyen, sin limitación, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC de fase normal (NP-HPLC), HPLC de fase inversa (RPHPLC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), tal como cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, cromatografía de interacción hidrófila (HILIC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) incluyendo cromatografía por filtración en gel o cromatografía por permeación en gel, cromatografía de afinidad tal como inmunoafinidad, cromatografía de afinidad metálica inmovilizada y similares.

En una realización, puede usarse cromatografía, incluyendo cromatografía mono, bidimensional o mayor, como un método de fraccionamiento peptídico junto con un método de análisis de péptidos adicional, tal como por ejemplo, con un análisis de espectrometría de masas corriente abajo como se describe en otra parte en la presente memoria descriptiva.

Pueden usarse métodos de separación, identificación o cuantificación de péptidos o polipéptidos adicionales, opcionalmente junto con cualquiera de los métodos de análisis descritos anteriormente, para medir biomarcadores en la presente divulgación. Dichos métodos incluyen, sin limitación, división por extracción química, isoelectroenfoque (IEF) incluyendo isoelectroenfoque capilar (CIEF), isotacoforesis capilar (CITP), electrocromatografía capilar (CEC) y similares, electroforesis en gel de poliacrilamida monodimensional (PAGE), electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), electroforesis en gel capilar (CGE), electroforesis en zona capilar (CZE), cromatografía electrocinética micelar (MEKC), electroforesis de flujo libre (FFE), etc.

Los diversos aspectos y realizaciones enseñados en el presente documento pueden basarse adicionalmente en la comparación de la cantidad de MCAM medida en muestras con valores de referencia de la cantidad de MCAM, en donde dichos valores de referencia representan predicciones, diagnósticos y/o pronósticos conocidos de las afecciones, los síntomas y/o los parámetros como se describen en el presente documento.

Por ejemplo, distintos valores de referencia pueden representar la predicción de un riesgo (por ejemplo, un riesgo anormalmente elevado) de tener una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención frente a la predicción de ausencia de riesgo o riesgo normal de tenerlos. En otro ejemplo, distintos valores de referencia pueden representar predicciones de diferentes grados de riesgo de tener una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención.

En un ejemplo adicional, distintos valores de referencia pueden representar el diagnóstico de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención frente al diagnóstico de la ausencia de los mismos (tal como, por ejemplo, el diagnóstico de salud, o recuperación de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención, etc.). En otro ejemplo, distintos valores de referencia pueden representar el diagnóstico de una afección,

un síntoma y/o un parámetro representativo de los mismos según la invención de diversa gravedad.

En otro ejemplo más, distintos valores de referencia pueden representar un buen pronóstico para una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención frente un mal pronóstico de los mismos. En un ejemplo adicional, distintos valores de referencia pueden representar diversos pronósticos favorables o desfavorables para una afección o un síntoma, como se determina por los parámetros según la invención.

Dicha comparación pueden incluir en general cualquier medio para determinar la presencia o ausencia de al menos una diferencia y opcionalmente el tamaño de dicha diferencia entre los valores o perfiles que se comparan. Una comparación puede incluir una inspección visual, una comparación aritmética o estadística de mediciones. Dichas comparaciones estadísticas incluyen, pero sin limitación, aplicar una norma. Si los valores o perfiles de biomarcadores comprenden al menos un patrón, la comparación para determinar una diferencia en dichos valores o perfiles de biomarcadores también puede incluir mediciones de estos patrones, de modo que las mediciones del biomarcador se correlacionen con mediciones de los patrones internos.

Los valores de referencia para la cantidad de MCAM pueden establecerse según procedimientos conocidos previamente empleados para otros biomarcadores.

Por ejemplo, un valor de referencia de la cantidad de MCAM para una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico particular de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención puede establecerse determinando la cantidad de MCAM en muestra o muestras de un individuo o de una población de individuos caracterizados por dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención (es decir, para los que dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico de la afección, el síntoma y/o el valor de parámetro según la invención es cierto). Dicha población puede comprender sin limitación ≥ 2 , ≥ 10 , ≥ 100 , o incluso varios cientos de individuos o más.

Por lo tanto, a modo de ejemplo ilustrativo, los valores de referencia de la cantidad de MCAM para los diagnósticos de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención frente a la ausencia de los mismos pueden establecerse determinando la cantidad de MCAM en muestra o muestras de un individuo o de una población de individuos a los que se ha diagnosticado (por ejemplo, basándose en otros medios adecuadamente concluyentes, tales como, por ejemplo, señales y síntomas clínicos, captura de imágenes, ECG, etc.) como, respectivamente, aquejados o no aquejados de la afección, el síntoma y/o el valor de parámetro específico según la invención.

En una realización, el valor o los valores de referencia como se entienden en el presente documento pueden expresar cantidades absolutas de MCAM. En otra realización, la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto ensayado puede determinarse directamente en relación con el valor de referencia (por ejemplo, con respecto a aumento o reducción, o factor de aumento o factor de reducción). Provechosamente, esto puede permitir comparar la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto con el valor de referencia (en otras palabras medir la cantidad relativa de MCAM en la muestra del sujeto frente al valor de referencia) sin necesidad de determinar en primer lugar las cantidades absolutas respectivas de MCAM.

El nivel de expresión o presencia de un biomarcador en una muestra de un paciente puede en ocasiones fluctuar, es decir aumentar o reducirse significativamente sin cambio (aparición, empeoramiento o mejora) de los síntomas. En dicho caso, el cambio de marcador precede al cambio en los síntomas y se convierte en una medida más sensible que el cambio de los síntomas. La intervención terapéutica puede iniciarse antes y ser más eficaz que esperar al deterioro de los síntomas. Los síntomas pueden ser (pero sin limitación): disnea, edema en las extremidades inferiores, palpitaciones cardíacas, fatiga, etc. Puede llevarse a cabo intervención temprana en un estado más benigno con seguridad en casa, lo que es una mejora importante con respecto al tratamiento de pacientes gravemente deteriorados en la sala de urgencias.

La medición del nivel de MCAM del mismo paciente en diferentes puntos temporales puede en dicho caso permitir por lo tanto la supervisión continua del estado del paciente y puede conducir a la predicción del empeoramiento o la mejora de la condición del paciente. Puede usarse un kit o dispositivo de ensayo en casa o en la clínica como se indica en el presente documento para esta supervisión continua. Uno o más valores de referencia o intervalos de niveles de MCAM ligados a una patología determinada para dicho ensayo pueden determinarse por ejemplo de antemano o durante el proceso de supervisión durante un periodo de tiempo determinado en dicho sujeto. Como alternativa, estos valores de referencia o intervalos pueden establecerse mediante conjuntos de datos de varios pacientes con fenotipos de enfermedad muy similares. Una desviación repentina de los niveles de MCAM de dicho valor de referencia o intervalo puede predecir el empeoramiento de la condición del paciente (por ejemplo en casa o en la clínica) antes de que los síntomas (con frecuencia graves) puedan de hecho sentirse u observarse.

También se desvela un método o algoritmo para determinar un cambio significativo en el nivel del marcador de MCAM en un paciente determinado, que es indicativo de cambio (empeoramiento o mejora) en el estado clínico. Además, la invención permite establecer el diagnóstico de que el sujeto se está recuperando o se ha recuperado de la afección).

En una realización los presentes métodos pueden incluir una etapa de establecer dicho valor o dichos valores de referencia. En una realización, los presentes kits y dispositivos pueden incluir medios para establecer un valor de referencia de la cantidad de MCAM para una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico particular de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención. Dichos medios pueden comprender por ejemplo una o más muestras (por ejemplo, muestras separadas o agrupadas) de uno o más individuos caracterizados por dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular de esta afección, síntoma y/o valor de parámetro según la invención.

Los diversos aspectos y realizaciones enseñados en el presente documento pueden implicar encontrar una desviación o ausencia de desviación entre la cantidad de MCAM medida en una muestra de un sujeto y un valor de referencia dado.

Una "desviación" de un primer valor con respecto a un segundo valor puede abarcar en general cualquier dirección (por ejemplo, aumento: primer valor > segundo valor; o reducción: primer valor < segundo valor) y cualquier grado de alteración.

Por ejemplo, una desviación puede abarcar una reducción de un primer valor en, sin limitación, al menos aproximadamente 10 % (aproximadamente 0,9 veces o menos), o en al menos aproximadamente 20 % (aproximadamente 0,8 veces o menos), o en al menos aproximadamente 30 % (aproximadamente 0,7 veces o menos), o en al menos aproximadamente 40 % (aproximadamente 0,6 veces o menos), o en al menos aproximadamente 50 % (aproximadamente 0,5 veces o menos), o en al menos aproximadamente 60 % (aproximadamente 0,4 veces o menos), o en al menos aproximadamente 70 % (aproximadamente 0,3 veces o menos), o en al menos aproximadamente 80 % (aproximadamente 0,2 veces o menos), o en al menos aproximadamente 90 % (aproximadamente 0,1 veces o menos), en relación con un segundo valor con el que se realiza una comparación.

Por ejemplo, una desviación puede abarcar un aumento de un primer valor en, sin limitación, al menos aproximadamente 10 % (aproximadamente 1,1 veces o más), o en al menos aproximadamente 20 % (aproximadamente 1,2 veces o más), o en al menos aproximadamente 30 % (aproximadamente 1,3 veces o más), o en al menos aproximadamente 40 % (aproximadamente 1,4 veces o más), o en al menos aproximadamente 50 % (aproximadamente 1,5 veces o más), o en al menos aproximadamente 60 % (aproximadamente 1,6 veces o más), o en al menos aproximadamente 70 % (aproximadamente 1,7 veces o más), o en al menos aproximadamente 80 % (aproximadamente 1,8 veces o más), o en al menos aproximadamente 90 % (aproximadamente 1,9 veces o más), o en al menos aproximadamente 100 % (aproximadamente 2 veces o más), o en al menos aproximadamente 150 % (aproximadamente 2,5 veces o más), o en al menos aproximadamente 200 % (aproximadamente 3 veces o más), o en al menos aproximadamente 500 % (aproximadamente 6 veces o más), o en al menos aproximadamente 700 % (aproximadamente 8 veces o más), o similares, en relación con un segundo valor con el que se realiza una comparación.

Preferentemente, una desviación puede referirse a una alteración observada estadísticamente significativa. Por ejemplo, una desviación puede referirse a una alteración observada que queda fuera de los márgenes de error de valores de referencia en una población dada (como se expresa, por ejemplo, por la desviación típica o el error típico, o por un múltiplo predeterminado de los mismos, por ejemplo, $\pm 1 \times DT$ o $\pm 2 \times DT$, o $\pm 1 \times ET$ o $\pm 2 \times ET$). La desviación también puede referirse a un valor que queda fuera de un intervalo de referencia definido por valores en una población dada (por ejemplo, fuera de un intervalo que comprende $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 75\%$ o $\geq 80\%$ o $\geq 85\%$ o $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ o incluso $\geq 100\%$ de los valores en dicha población).

En una realización adicional, puede concluirse que hay una desviación si una alteración observada es mayor que un umbral o punto de corte dado. Dicho umbral o punto de corte puede seleccionarse como se conoce en general en la técnica para proporcionar una sensibilidad y/o especificidad elegidas de los métodos de predicción, diagnóstico y/o pronóstico, por ejemplo, sensibilidad y/o especificidad de al menos 50 %, o al menos 60 %, o al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 85 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %.

Por ejemplo, en una realización, una cantidad elevada de MCAM en la muestra del sujeto — preferentemente elevada al menos aproximadamente 1,1 veces, o elevada al menos aproximadamente 1,2 veces, más preferentemente elevada al menos aproximadamente 1,3 veces, aún más preferentemente elevada al menos aproximadamente 1,4 veces, incluso más preferentemente elevada al menos aproximadamente 1,5 veces, tal como elevada entre aproximadamente 1,1 veces y 3 veces o entre aproximadamente 1,5 veces y 2 veces — en comparación con un valor de referencia que representa la predicción o el diagnóstico de ausencia de o que representa un buen pronóstico para una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener esa afección, síntoma y/o valor de parámetro según la invención o indica un mal pronóstico para esa afección, síntoma y/o valor de parámetro según la invención en el sujeto.

Cuando se encuentra una desviación entre la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto y un valor de referencia que representa una determinada predicción, diagnóstico y/o pronóstico, dicha desviación es indicativa de o puede atribuirse a la conclusión de que la predicción, el diagnóstico y/o el pronóstico de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención en dicho sujeto es diferente del representado por el valor de referencia.

5 Cuando no se encuentra desviación entre la cantidad de MCAM en una muestra de un sujeto y un valor de referencia que representa una determinada predicción, diagnóstico y/o pronóstico, la ausencia de dicha desviación es indicativa de o puede atribuirse a la conclusión de que la predicción, el diagnóstico y/o el pronóstico de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención en dicho sujeto es sustancialmente igual que el representado por el valor de referencia.

Las consideraciones anteriores se aplican de forma análoga a perfiles de biomarcadores.

10 Cuando se determinan dos o más biomarcadores diferentes en un sujeto, sus respectivas presencia, ausencia y/o cantidad pueden representarse juntas como un perfil de biomarcador, formando parte de dicho perfil los valores para cada biomarcador medido. Como se usa en el presente documento, el término "perfil" incluye cualquier conjunto de datos que represente los elementos o las características distintivos asociados con una afección de interés, tal como con una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico particular de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención. El término abarca en general entre otros perfiles de ácidos nucleicos, tales como por ejemplo perfiles genotípicos (conjuntos de datos genotípicos que representan el genotipo de uno o más genes asociados con una afección de interés), perfiles de números de copias de genes (conjuntos de datos de números de copias de genes que representan la amplificación o supresión de uno o más genes asociados con una afección de interés), perfiles de expresión génica (conjuntos de datos de expresión génica que representan los niveles de ARNm de uno o más genes asociados con una afección de interés), perfiles de metilación de ADN (conjuntos de datos de metilación que representan los niveles de metilación de ADN de uno o más genes asociados con una afección de interés), así como perfiles de proteínas, polipéptidos o péptidos, tales como por ejemplo perfiles de expresión de proteínas (conjuntos de datos de expresión de proteínas que representan los niveles de una o más proteínas asociadas con una afección de interés), perfiles de activación de proteínas (conjuntos de datos que representan la activación o inactivación de una o más proteínas asociadas con una afección de interés), perfiles de modificación de proteínas (conjuntos de datos que representan la modificación de una o más proteínas asociadas con una afección de interés), perfiles de escisión de proteínas (conjuntos de datos que representan la escisión proteolítica de una o más proteínas asociadas con una afección de interés), así como cualquier combinación de los mismos.

30 Pueden crearse perfiles de biomarcadores de varias maneras y pueden ser la combinación de biomarcadores o aspectos de biomarcadores medibles usando métodos tales como relaciones u otros métodos o algoritmos de asociación complejos (por ejemplo, métodos basados en normas). Un perfil de biomarcadores comprende al menos dos mediciones, donde las mediciones pueden corresponder al mismo biomarcador o a biomarcadores diferentes. Un perfil de biomarcadores puede comprender también al menos tres, cuatro, cinco, 10, 20, 30 o más mediciones. En una realización, un perfil de biomarcadores comprende cientos, o incluso miles, de mediciones.

35 Por lo tanto, por ejemplo, distintos perfiles de referencia pueden representar la predicción de un riesgo (por ejemplo, un riesgo anormalmente elevado) de tener una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención frente a la predicción de ausencia de riesgo o riesgo normal de tenerlos. En otro ejemplo, distintos perfiles de referencia pueden representar predicciones de diferentes grados de riesgo de tener una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención.

40 En un ejemplo adicional, distintos perfiles de referencia pueden representar el diagnóstico de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención frente al diagnóstico de ausencia de dicha afección, síntoma y/o valor de parámetro (tal como, por ejemplo, el diagnóstico de salud, recuperación de esa afección o síntoma según la invención, etc.). En otro ejemplo, distintos perfiles de referencia pueden representar el diagnóstico de una afección o un síntoma según la invención de diversa gravedad.

45 En otro ejemplo más, distintos perfiles de referencia pueden representar un buen pronóstico para una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención frente a un mal pronóstico de los mismos. En un ejemplo adicional, distintos perfiles de referencia pueden representar diversos pronósticos favorables o desfavorables para una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro según la invención.

50 Los perfiles de referencia usados en el presente documento pueden establecerse según procedimientos conocidos previamente empleados para otros biomarcadores.

55 Por ejemplo, un perfil de referencia de la cantidad de MCAM y la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores adicionales relacionados con las afecciones, los síntomas o los parámetros según la invención para una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico particular puede establecerse determinando el perfil en muestra o muestras de un individuo o de una población de individuos caracterizados por dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular (es decir, para los que dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico es cierto). Dicha población puede comprender sin limitación ≥ 2 , ≥ 10 , ≥ 100 , o incluso varios cientos de individuos o más.

60 Por lo tanto, a modo de ejemplo ilustrativo, pueden establecerse perfiles de referencia para los diagnósticos de ICA frente a ausencia de ICA determinando los perfiles de biomarcadores en muestra o muestras de un individuo o de una población de individuos a los que se ha diagnosticado, respectivamente, como aquejados o no de ICA.

En una realización los presentes métodos pueden incluir una etapa de establecer dicho perfil o dichos perfiles de referencia. En una realización, los presentes kits y dispositivos pueden incluir medios para establecer un perfil de referencia para una predicción, un diagnóstico y/o un pronóstico particular. Dichos medios pueden comprender por ejemplo una o más muestras (por ejemplo, muestras separadas o agrupadas) de uno o más individuos caracterizados por dicha predicción, diagnóstico y/o pronóstico particular.

Además, pueden emplearse análisis multiparamétricos conocidos en la técnica cambiando lo que deba cambiarse para determinar desviaciones entre grupos o valores y perfiles generados a partir de los mismos (por ejemplo, entre perfiles de biomarcadores de muestras y de referencia).

Cuando se encuentra una desviación entre el perfil de muestra y un perfil de referencia que representa una determinada predicción, diagnóstico y/o pronóstico, dicha desviación es indicativa de o puede atribuirse a la conclusión de que la predicción, el diagnóstico y/o el pronóstico en dicho sujeto es diferente del representado por el perfil de referencia.

Cuando no se encuentra desviación entre el perfil de muestra y un perfil de referencia que representa una determinada predicción, diagnóstico y/o pronóstico, la ausencia de dicha desviación es indicativa de o puede atribuirse a la conclusión de que la predicción, el diagnóstico y/o el pronóstico en dicho sujeto es sustancialmente igual que el representado por el perfil de referencia.

También se desvelan kits o dispositivos para el diagnóstico de las afecciones, los síntomas y/o los parámetros según la invención, que comprenden medios para detectar el nivel del marcador de MCAM en una muestra del paciente. En una realización más preferida, dicho kit puede usarse en situaciones clínicas o en casa. Los kits desvelados anteriormente pueden usarse para diagnosticar, para supervisar la eficacia del tratamiento de un sujeto que padece una afección o un síntoma según la invención con un agente, o para exploración preventiva de sujetos con respecto a la aparición de una afección, un síntoma y/o un valor de parámetro específico según la invención en dicho sujeto.

En una situación clínica, el kit o dispositivo puede estar en forma de un dispositivo de cabecera o en una situación de equipo de urgencias, por ejemplo como parte del equipamiento de una ambulancia u otro equipamiento de vehículo o equipo de urgencias en movimiento o como parte de un kit de primeros auxilios. El kit o dispositivo de diagnóstico puede ayudar a un practicante médico, un auxiliar de primeros auxilios o un enfermero a decidir si el paciente en observación está desarrollando una insuficiencia cardíaca aguda, después de lo cual puede realizarse la acción o el tratamiento apropiado.

Un kit de ensayo en casa da al paciente una lectura que puede comunicar a un practicante médico, un auxiliar de primeros auxilios o al servicio de urgencias de un hospital, después de lo cual puede realizarse la acción apropiada. Dicho dispositivo de ensayo en casa es particularmente interesante para personas que tengan un historial de o estén en riesgo de padecer una afección o un síntoma, representado por un parámetro según la invención, tal como insuficiencia cardíaca (por ejemplo enfermos de insuficiencia cardíaca crónica) o tengan un historial de o estén en riesgo de padecer disnea (falta de aliento), que puede estar provocado por ejemplo por insuficiencia cardíaca aguda, infecciones, problemas pulmonares, septicemia, etc. Dichos sujetos con un alto riesgo de insuficiencia cardíaca o que tengan un historial de disnea ciertamente se podrían beneficiar de tener un dispositivo de ensayo en casa desvelado en el presente documento en su casa, porque pueden distinguir así fácilmente entre un acontecimiento de insuficiencia cardíaca aguda y otro acontecimiento que provoque la disnea, dando como resultado un modo más fácil de determinar las acciones a realizar para resolver el problema.

Los kits o dispositivos típicos desvelados en el presente documento comprenden los siguientes elementos:

a) un medio para obtener una muestra del sujeto

b) un medio o dispositivo para medir la cantidad del marcador de MCAM en dicha muestra y visualizar si la cantidad del marcador de MCAM en dicha muestra está por debajo o por encima de un determinado nivel o valor umbral, lo que indica si el sujeto padece una afección o un síntoma según la invención, representado por un parámetro como se describe en el presente documento o no.

Los kits o dispositivos pueden comprender adicionalmente c) un medio para comunicarse directamente con un practicante médico, un servicio de urgencias del hospital o un puesto de primeros auxilios, que indica que una persona está padeciendo insuficiencia cardíaca aguda o no.

La expresión "nivel o valor umbral" o "valor de referencia" se usan indistintamente como un sinónimo y es como se define en el presente documento. También puede ser un intervalo de valores basales (por ejemplo "peso seco") determinado en un paciente individual o en un grupo de pacientes con condiciones de enfermedad similares.

El dispositivo o el kit puede comprender adicionalmente medios para detectar el nivel de un marcador adicional como se enseña en el presente documento.

Cualquiera de los kits como se definen en el presente documento puede usarse como un dispositivo de cabecera para su uso por el propio sujeto o por un practicante clínico.

5 En dicho kit, el medio para obtener una muestra del sujeto (a) puede ser cualquier medio para obtener una muestra del sujeto conocido en la técnica. Se conocen en la técnica ejemplos para obtener por ejemplo una muestra de sangre y podría ser cualquier tipo de pinchazo en el dedo o la piel o dispositivo basado en lanceta, que básicamente perfora la piel y da como resultado la liberación de una gota de sangre de la piel. Cuando se usa una muestra de orina, el medio para obtener una muestra del sujeto puede ser en forma de una tira absorbente como las usadas en pruebas de embarazo en casa conocidas en la técnica. De forma análoga, una muestra de saliva podría obtenerse
10 usando un hisopo bucal conocido en la técnica. Se proporcionan ejemplos de dispositivos de toma de muestras sanguíneas u otros dispositivos de toma de muestras por ejemplo en las patentes de los Estados Unidos n.º 4.802.493, 4.966.159, 5.099.857, 6.095.988, 5.944.671, 4.553.541, 3.760.809, 5.395.388, 5.212.879, 5.630.828, 5.133.730, 4.653.513, 5.368.047, 5.569.287, 4.360.016, 5.413.006 y las solicitudes de patentes de los Estados Unidos 2002/111565, 2004/0096959, 2005/143713, 2005/137525, 2003/0153900, 2003/0088191, WO9955232,
15 WO2005/049107, WO2004/060163, WO02/056751, WO02/100254, WO2003/022330, WO2004/066822, WO97/46157, WO2004/039429 o EP0364621, EP0078724, EP1212138, EP0081975 o E P0292928.

En dicho kit, el medio o dispositivo para medir la cantidad del marcador de MCAM en dicha muestra (b) puede ser cualquier medio o dispositivo que pueda detectar específicamente la cantidad de la proteína MCAM en la muestra.
20 Son ejemplos sistemas que comprenden moléculas de unión específicas de MCAM unidas a una fase sólida, por ejemplo se conocen bien en la técnica tiras de flujo lateral o dispositivos de tira reactiva y similares. Un ejemplo no limitante para realizar un ensayo bioquímico es usar una tira de ensayo y anticuerpos marcados cuya combinación no requiere ningún lavado de la membrana. La tira de ensayo se conoce bien, por ejemplo, en el campo de kits de pruebas de embarazo donde un anticuerpo anti hCG está presente en el soporte, y se porta en complejo con hCG
25 por el flujo de orina en un anticuerpo secundario inmovilizado que permite la visualización. Otros ejemplos no limitantes de dichos dispositivos, sistemas o kits de ensayo en casa pueden encontrarse por ejemplo en las siguientes patentes de los Estados Unidos: 6.107.045, US6.974.706, 5.108.889, 6.027.944, 6.482.156, 6.511.814, 5.824.268, 5.726.010, 6.001.658 o las solicitudes de patentes de los Estados Unidos: 2008/0090305 o 2003/0109067.

30 También se desvela un dispositivo de flujo lateral o tira reactiva. Dicha tira reactiva comprende una tira de ensayo que permite la migración de una muestra por flujo capilar de un extremo de la tira donde se aplica la muestra al otro extremo de dicha tira donde se mide la presencia de un analito en dicha muestra.

35 En otra realización, se desvela un dispositivo que comprende una tira reactiva. Dicha tira reactiva comprende una o más almohadillas de ensayo que cuando se humedecen con la muestra, proporcionan un cambio de color en presencia de un analito y/o indican la concentración de la proteína en dicha muestra.

40 En una realización preferida del kit desvelado, el medio o dispositivo (1) para medir la cantidad de proteína en una muestra (b) es un soporte sólido (7) que tiene un extremo proximal (2) y uno distal (3), que comprende:

- una zona de aplicación de muestras (4) cerca del extremo proximal,
- una zona de reacción (5) distal a la zona de aplicación de muestras (4), y
45
- una zona de detección (6) distal a la zona de reacción (5),

50 por lo que dicho soporte tiene una propiedad capilar que dirige un flujo de muestra de líquido aplicada en la zona de aplicación en una dirección del extremo proximal al extremo distal,

- opcionalmente, el medio o dispositivo también comprende una fuente de líquido, por ejemplo en un recipiente, una pipeta cuentagotas o un vial, que permite que muestras viscosas fluyan más fácilmente a través de la tira.

55 La zona de reacción (5) comprende una o más bandas (10) de molécula de unión a MCAM conjugada con un agente de detección (por ejemplo oro coloidal) estando dicha molécula de unión a MCAM dispuesta en el soporte sólido de modo que pueda migrar con el flujo capilar de líquido, es decir no está inmovilizada. La zona de detección (6) comprende una o más bandas de captura (11) que comprenden una población de moléculas de unión a MCAM inmovilizadas en el soporte sólido.

60 Cuando una muestra se aplica a la zona de aplicación de muestras (4), migra hacia la zona de reacción (5) por flujo capilar. Cualquier MCAM presente en la muestra reacciona con el conjugado de moléculas de unión marcadas con MCAM y el complejo así formado es portado por el flujo capilar a la zona de detección (6). La zona de detección (6), que tiene moléculas de unión a MCAM permanentemente inmovilizadas en la misma, captura e inmoviliza cualquier complejo, dando como resultado una concentración localizada de conjugado que puede visualizarse.

65 Las dos zonas (5 y 6) como se describen en el presente documento (una zona con los conjugados no fijos y una

zona con los anticuerpos de captura fijos) generalmente no se solapan. Pueden disponerse de forma adyacente con ausencia o presencia de un hueco intermedio de soporte sólido desprovisto de una banda. Una banda puede disponerse en un soporte sólido por cualquier medio, por ejemplo, absorbida, adsorbida, como revestimiento, unida covalentemente o secada, dependiendo de si es necesario que el reactivo se movilice o no.

5 Para obtener una tira de ensayo semicuantitativa en la que solamente se forma una señal una vez que el nivel de proteína MCAM en la muestra sea mayor que un determinado nivel o valor umbral predeterminado, la zona de reacción (5) que comprende las moléculas de unión a MCAM conjugadas no fijas, también podría comprender una cantidad predeterminada de anticuerpos de captura de MCAM fijos. Esto permite retirar por captura una determinada cantidad de proteína MCAM presente en la muestra, correspondiente al nivel o valor umbral predeterminado. La cantidad restante de proteína MCAM (si la hubiera) con la que se unen las moléculas de unión marcadas o conjugadas puede después dejarse migrar a la zona de detección (6). En este caso, la zona de reacción (6) solamente recibirá complejos de molécula de unión marcada-MCAM y posteriormente solo produce una señal si el nivel de la proteína MCAM en la muestra es mayor que el nivel o valor umbral predeterminado.

15 Otra posibilidad para determinar si la cantidad de la proteína MCAM en la muestra está por encima o por debajo de un determinado valor o nivel umbral, es usar un anticuerpo de captura primario que captura toda la proteína MCAM presente en la muestra, en combinación con un anticuerpo secundario marcado, que desarrolla una determinada señal o color cuando se une a la fase sólida. La intensidad del color o la señal puede compararse después con un diagrama de color o señal de referencia que indica que cuando la intensidad de la señal está por encima de una determinada señal umbral, el ensayo es positivo (es decir se diagnostica la afección, el síntoma y/o el parámetro según la invención). Como alternativa, la cantidad o intensidad del color o la señal puede medirse con un dispositivo electrónico que comprende por ejemplo un sensor de absorbancia de luz o medidor de emisión de luz, que da como resultado un valor numérico de intensidad de señal o absorbancia de color formado, que puede después presentarse al sujeto en forma de un resultado negativo si dicho valor numérico está por debajo del valor umbral o un resultado positivo si dicho valor numérico está por encima del valor umbral.

Esta realización es particularmente relevante en la supervisión del nivel de MCAM en un paciente a lo largo de un periodo de tiempo.

30 El valor de referencia o intervalo puede determinarse usando el dispositivo de uso en casa en un periodo en donde el sujeto está exento de las afecciones o los síntomas según la invención o en donde los parámetros según la invención están normalizados, dando al paciente una indicación de su nivel de MCAM basal. El uso regular del dispositivo de ensayo en casa permitirá por lo tanto al sujeto observar un cambio repentino en los niveles de MCAM en comparación con el nivel basal, los que puede permitirle entrar en contacto con un practicante médico.

40 Como alternativa, el valor de referencia puede determinarse en el sujeto que padece las afecciones o los síntomas según la invención o en donde los parámetros según la invención son anómalos, es decir están elevados o reducidos, lo que indica entonces su "nivel de riesgo" de MCAM personal, es decir el nivel de MCAM que indica que está o estará pronto expuesto a una afección o un síntoma según el acontecimiento de la invención. Este nivel de riesgo es interesante para supervisar la progresión de enfermedad o para evaluar el efecto del tratamiento. La reducción del nivel de MCAM en comparación con el nivel de riesgo indica que la condición del paciente está mejorando.

45 Además, el valor o nivel de referencia puede establecerse mediante resultados de medición combinada en sujetos con patologías o fenotipos de enfermedad muy similares.

50 Son ejemplos no limitantes de dichos ensayos semicuantitativos conocidos en la técnica, cuyo principio podría usarse para el dispositivo de ensayo en casa según la presente divulgación son el ensayo de VIH/SIDA o ensayos de cáncer de próstata comercializados por Sanitoets. El ensayo de próstata de uso en casa es un ensayo rápido que se pretende que sea un ensayo semicuantitativo inicial para detectar niveles de PSA en sangre mayores de 4 ng/ml en sangre completa. El kit de autoensayo en casa típico comprende los siguientes componentes: un dispositivo de ensayo al que se va a administrar la muestra de sangre y que da como resultado una señal cuando el nivel de proteína está por encima de un determinado nivel umbral, una cantidad de diluyente por ejemplo en un pipeta cuentagotas para ayudar a la transferencia de los analitos (es decir la proteína de interés) de la zona de aplicación de muestras a la zona de detección de señal, opcionalmente una pipeta vacía para recogida de muestras de ensayo de sangre, un dispositivo de pinchazo en el dedo, opcionalmente un hisopo estéril para limpiar el área del pinchazo e instrucciones de uso del kit.

60 También se conocen ensayos similares para por ejemplo detección de cáncer de mama y detección del nivel de proteínas CRP a la vista de ensayos en casa de riesgo cardíaco. Este último ensayo abarca el envío del resultado de ensayo a un laboratorio, donde el resultado es interpretado por un experto técnico o médico. Dicho diagnóstico por teléfono o por internet de la condición del paciente es por supuesto posible y recomendable con la mayoría de los kits, ya que la interpretación de los resultados de ensayo es con frecuencia más importante que realizar el ensayo. Cuando se usa un dispositivo electrónico como se ha mencionado anteriormente que proporciona un valor numérico del nivel de proteína presente en la muestra, este valor puede por supuesto comunicarse fácilmente por teléfono,

teléfono móvil, teléfono por satélite, correo electrónico, internet u otro medio de comunicación, avisando a un hospital, un practicante médico o un equipo de primeros auxilios de que una persona está padeciendo una insuficiencia cardíaca aguda. Un ejemplo no limitante de dicho sistema se desvela en la patente de los Estados Unidos 6.482.156.

5 Se hace referencia en la descripción posterior a los dibujos que ejemplifican realizaciones particulares de la invención; no se pretende en absoluto que sean limitantes. El experto en la materia puede adaptar el dispositivo y componentes y elementos sustituyentes según las prácticas habituales de los expertos en la materia.

10 La Figura 3A y B muestra una realización preferida de una tira de ensayo como se desvela en la misma. La tira (1) incluye un extremo proximal (2) y un extremo distal (3). Se proporciona una zona de aplicación de muestras (4) en el extremo proximal (2), una zona de reacción (5) está adyacente a la misma y una zona de detección (6) está cerca del extremo distal (3). Una muestra puede depositarse en el soporte sólido (7) en la zona de aplicación (4) para transferir por acción capilar a la zona de detección (6). Puede proporcionarse una capa protectora (8) que abarca una o ambas de las superficies del soporte sólido (7), excepto por una región de la zona de aplicación de muestras (4). Dicha capa protectora protege la muestra y la constitución química de la tira de contaminación y evaporación. Una o más almohadillas absorbentes (9) en contacto capilar con la zona de aplicación de muestras (4) del soporte sólido (7) pueden absorber y liberar muestra según sea necesario; dicha almohadilla (9) se coloca típicamente en la superficie del soporte sólido (7) que es el mismo u opuesto a la zona de aplicación de muestras (4). En la Figura 5B, la almohadilla absorbente (9) es parte de la zona de aplicación de muestras (4). Una o más almohadillas absorbentes (9') en capilar pueden colocarse en contacto con la zona de detección (6) del soporte sólido (7), distal a cualquier banda de captura (11), (14). Estas almohadillas (9') pueden absorber líquido que ha pasado a través del soporte sólido; dicha almohadilla (9') se coloca típicamente en la superficie del soporte sólido (7) que es el mismo u opuesto a la zona de aplicación de muestras (4). El soporte sólido (7) puede estar hecho de cualquier material adecuado que tenga una propiedad de acción capilar, y puede tener las mismas propiedades que se han descrito anteriormente. También debería ser capaz de dar soporte a una sustancia (por ejemplo molécula de unión a MCAM no inmovilizada), que, cuando se hidrata, puede migrar a través del soporte sólido por un flujo de líquido de acción capilar.

30 El soporte sólido (7) también puede comprender una banda de conjugado de molécula de unión a MCAM (10), localizado en la zona de reacción (5), en posición distal a la misma zona de aplicación de muestras (4). Cualquier MCAM en la muestra es portada por acción capilar hacia esta banda (10), donde reacciona con el conjugado de molécula de unión a MCAM permanentemente inmovilizado.

35 El conjugado de molécula de unión a MCAM puede asociarse con o unirse a un agente de detección para facilitar la detección. Los ejemplos de agentes de detección de laboratorio incluyen, pero sin limitación, marcadores luminiscentes; marcadores colorimétricos, tales como colorantes; marcadores fluorescentes; o marcadores químicos, tales como agentes electroactivos (por ejemplo, ferrocianuro); enzimas; marcadores radiactivos; o marcadores de radiofrecuencia. Más habitualmente, el agente de detección es una partícula. Los ejemplos de partículas útiles en la práctica incluyen, pero sin limitación, partículas de oro coloidales; partículas de azufre coloidales; partículas de selenio coloidales; partículas de sulfato de bario coloidales; partículas de sulfato de hierro coloidales; partículas de yodato metálico; partículas de haluro de plata; partículas de sílice; partículas de óxido metálico (hidroso) coloidales; partículas de sulfuro metálico coloidales; partículas de selenio de plomo coloidales; partículas de seleniuro de cadmio coloidales; partículas de fosfato metálico coloidales; partículas de ferrita metálica coloidales; cualquiera de las partículas coloidales anteriormente mencionadas recubiertas con capas orgánicas o inorgánicas; moléculas proteicas o peptídicas; liposomas; o partículas de látex de polímeros orgánicos, tales como perlas de látex de poliestireno. Son partículas preferibles las partículas de oro coloidales. Puede prepararse oro coloidal por cualquier medio convencional, tal como los métodos perfilados en G. Frens, 1973 Nature Physical Science, 241:20 (1973). Pueden describirse métodos alternativos en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.578.577, 5.141.850; 4.775.636; 50 4.853.335; 4.859.612; 5.079.172; 5.202.267; 5.514.602; 5.616.467; 5.681.775.

El soporte sólido (7) comprende además una o más bandas de captura (11) en la zona de detección (6). Una banda de captura comprende una población de molécula de unión a MCAM inmovilizada permanentemente en la misma. El complejo de MCAM: conjugado de molécula de unión a MCAM formado en la zona de reacción (5) migra hacia la zona de detección (6) donde dicha banda (11) captura el complejo de migración y lo concentra, permitiendo que sea visualizado por el ojo, o usando una máquina lectora. La molécula de unión a MCAM presente en la zona de reacción (5) y en la zona de detección (6) puede reaccionar con la misma parte de MCAM o puede reaccionar con diferentes partes de MCAM.

60 Una o más bandas de control (12) pueden estar presentes en el soporte sólido (7). Por ejemplo, un péptido no inmovilizado (12) podría estar presente en la zona de aplicación de muestras (4), no reaccionando dicho péptido con ninguna de las bandas de molécula de unión a MCAM (13) o (14). Al aplicarse la muestra, esta migra hacia la zona de reacción (5), donde se dispone un conjugado de anticuerpo antipeptídico (13), y donde se forma un complejo de péptido-anticuerpo complejo. Dicho complejo migra hacia la zona de detección (6), donde se inmoviliza una banda de captura (14) de anticuerpo antipeptídico en el soporte sólido y que concentra dicho complejo permitiendo la visualización. La banda de captura de control (14) se localiza separada de la banda de captura de MCAM (11), por lo

tanto, puede verse una reacción positiva distinta de la reacción de detección si el ensayo está funcionando correctamente.

5 Una ventaja particular de un control como se describe es que son controles internos, es decir, el control frente al que pueden compararse los resultados de medición de MCAM está presente en el soporte sólido individual. Por lo tanto, los controles pueden usarse para corregir con respecto a la variabilidad en el soporte sólido, por ejemplo. Dicha corrección sería poco práctica con controles externos que se basan, por ejemplo, en un muestreo estadístico de soportes. Adicionalmente, las variaciones de un lote a otro y de una ejecución a otra entre diferentes soportes pueden minimizarse mediante el uso de agentes de unión de control y agentes de control. Además, los efectos de la
10 unión no específica pueden reducirse. Todas estas correcciones serían difíciles de conseguir usando controles externos, fuera del soporte.

15 Durante el ensayo, MCAM de la muestra y el conjugado de molécula de unión a MCAM se combinan y concentran en el soporte sólido (7). Esta combinación da como resultado una concentración de compuestos que puede visualizarse por encima del color de fondo del soporte sólido (7). Los compuestos pueden formarse a partir de una combinación de compuestos anteriormente mencionados, incluyendo anticuerpos, agentes de detección y otras partículas asociadas con las zonas de reacción y detección. Basándose en el ensayo particular que se realice, las zonas de reacción y detección pueden implementarse selectivamente para conseguir un intervalo dinámico apropiado que puede ser lineal o no lineal.

20 Un soporte sólido (7) para realizar el ensayo puede alojarse en el cartucho (20) como se muestra, por ejemplo, en la Figura 6. El cartucho es preferentemente estanco al agua frente a la orina, excepto por una o más aperturas. El soporte sólido (7) puede exponerse a través de una apertura (21) en el cartucho para proporcionar una zona de aplicación (4) en el extremo proximal (2), y otra apertura (22) para permitir la lectura de la zona de detección (6)
25 cerca del extremo distal (3). El cartucho (20) puede incluir un código sensor (23) para comunicarse con un dispositivo de lectura.

30 La presencia y/o concentración de MCAM es una muestra puede medirse por resonancia de plasmón superficial (RPS) usando un chip que tiene una molécula de unión a MCAM inmovilizada en el mismo, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TERF), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (TERB), interrupción de la fluorescencia, medición de polarización de fluorescencia u otros medios conocidos en la técnica. Puede usarse cualquiera de los ensayos de unión descritos para determinar la presencia y/o concentración de MCAM en una muestra. Para hacer esto, la molécula de unión a MCAM se hace reaccionar con una muestra y la
35 concentración de MCAM se mide según sea apropiado para el ensayo de unión que se use. Para validar y calibrar un ensayo, pueden realizarse reacciones de control usando diferentes concentraciones de MCAM convencional y/o molécula de unión a MCAM. Cuando se empleen ensayos de fase sólida, después de la incubación, se realiza una etapa de lavado para retirar MCAM no unida. Se mide MCAM unida según sea apropiado para el marcador dado (por ejemplo, contador de centelleo, fluorescencia, anticuerpo-colorante, etc.). Si se desea un resultado cualitativo, pueden no ser necesarios controles y concentraciones diferentes. Por supuesto, los papeles de MCAM y la molécula
40 de unión a MCAM pueden intercambiarse; el experto en la materia puede adaptar el método de modo que se aplique molécula de unión a MCAM a la muestra, a diversas concentraciones de muestra.

45 Una molécula de unión a MCAM es cualquier sustancia que se una específicamente a MCAM. Los ejemplos de una molécula de unión a MCAM útil incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo, un polipéptido, un péptido, un lípido, un hidrato de carbono, un ácido nucleico, ácido nucleico peptídico, molécula pequeña, molécula orgánica pequeña u otro candidato farmacológico. Una molécula de unión a MCAM puede ser un compuesto natural o sintético, incluyendo, por ejemplo, molécula pequeña sintética, compuesto contenido en extractos de células animales, vegetales, bacterianas o fúngicas, así como medio acondicionado de dichas células. Como alternativa, la molécula de unión a MCAM puede ser una proteína modificada técnicamente que tiene sitios de unión para MCAM. Según un
50 aspecto de la divulgación, una molécula de unión a MCAM se une específicamente con MCAM con una afinidad mejor que 10^{-6} M. Una molécula de unión a MCAM adecuada e puede determinarse a partir de su unión con una muestra patrón de MCAM. Se conocen en la técnica métodos para determinar la unión entre la molécula de unión a MCAM y MCAM. Como se usa en el presente documento, El término anticuerpo incluye, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos
55 modificados técnicamente y fragmentos de anticuerpo biológicamente funcionales (por ejemplo scFv, nanocuerpos, Fv, etc.) suficientes para unión del fragmento de anticuerpo con la proteína. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo disponible en el mercado contra MCAM, tal como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón, de rata, humano o humanizado.

60 En una realización preferida, la molécula o el agente de unión es capaz de unirse con la proteína o el fragmento de MCAM unida a membrana o a célula madura. En una realización más preferida, el agente o la molécula de unión se une a o detecta específicamente la forma soluble, preferentemente la forma en circulación en plasma de MCAM, como se define en el presente documento.

65 Según una realización, la molécula de unión a MCAM se marca con un marcador que permite la detección con otro agente (por ejemplo con un compañero de unión a sonda). Dichos marcadores pueden ser, por ejemplo, biotina,

estreptavidina, marcador de his, marcador de myc, maltosa, proteína de unión a maltosa o cualquier otro tipo de marcador conocido en la técnica que tenga un compañero de unión. Un ejemplo de asociaciones que puede utilizarse en la disposición de sonda:compañero de unión puede ser cualquiera, e incluye, por ejemplo biotina:estreptavidina, marcador de his:ion metálico (por ejemplo Ni²⁺), maltosa:proteína de unión a maltosa.

5 En otra realización, se desvela una tira reactiva colorimétrica sencilla y precisa y un método para medir la presencia de MCAM en una muestra. Más en particular, la presente divulgación también se refiere a un dispositivo que comprende una tira reactiva. La presente tira reactiva comprende un soporte sólido que se proporciona con al menos una almohadilla de ensayo para medir la presencia de MCAM en una muestra. Dicha almohadilla de ensayo
10 comprende preferentemente una matriz transportadora que incorpora una composición de reactivo capaz de interactuar con MCAM para producir una respuesta medible, preferentemente una respuesta medible visual o instrumentalmente. La tira reactiva puede fabricarse en cualquier tamaño y forma, pero en general la tira reactiva es más larga que ancha. El soporte sólido puede estar compuesto de cualquier material adecuado y está hecho preferentemente de material firme o rígido tal como acetato de celulosa, tereftalato de polietileno, polipropileno,
15 policarbonato o poliestireno. En general, la matriz transportadora es un material absorbente que permite que la muestra de orina se mueva, en respuesta a fuerzas capilares, a través de la matriz transportadora para entrar en contacto con la composición de reactivo y producir una transición de color detectable o medible. La matriz transportadora puede ser cualquier sustancia capaz de incorporar los reactivos químicos requeridos para realizar el ensayo de interés, siempre que la matriz transportadora sea sustancialmente inerte con respecto a los reactivos
20 químicos, y es porosa o absorbente en relación con los componentes solubles de la muestra de ensayo líquida. La expresión "matriz transportadora" se refiere a matrices absorbentes o no absorbentes que son insolubles en agua y otros líquidos fisiológicos y mantienen su integridad estructural cuando se exponen al agua y otros líquidos fisiológicos. Las matrices absorbentes adecuadas incluyen papel de filtro, materiales de esponja, celulosa, madera, telas tejidas y no tejidas y similares. Las matrices no absorbentes incluyen fibra de vidrio, películas poliméricas y membranas preformadas o microporosas. Otras matrices transportadoras adecuadas incluyen polvos inorgánicos
25 hidrófilos, tales como gel de sílice, alúmina, tierras diatomeas y similares; sustancias arcillosas; paño; materiales poliméricos naturales hidrófilos, particularmente material de celulosa, como perlas celulósicas y especialmente papeles que contienen fibra tales como papel de filtro o papel cromatográfico; polímeros sintéticos o de origen natural modificados, tales como gelatina reticulada, acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, poliácridamida, celulosa,
30 alcohol polivinílico, polisulfonas, poliésteres, poliácridatos, poliuretanos, dextrano reticulado, agarosa y otros de tales polímeros hidrófilos insolubles en agua reticulados y no reticulados. Las sustancias hidrófobas y no absorbentes no son adecuadas para su uso como la matriz transportadora de la presente divulgación. La matriz transportadora puede ser de diferentes composiciones químicas o una mezcla de composiciones químicas. La matriz también puede variar con respecto a suavidad y rugosidad combinadas con dureza y blandura. Sin embargo, en todos los casos, la matriz transportadora comprende un material hidrófilo o absorbente. La matriz transportadora se construye
35 más provechosamente a partir de papel de filtro absorbente o películas poliméricas no absorbentes. Una matriz transportadora preferida es una matriz hidrófila, absorbente, incluyendo materiales celulósicos, tales como papel, y preferentemente papel de filtro o una matriz no absorbente, incluyendo películas poliméricas, tales como un poliuretano o una gelatina reticulada. Una composición de reactivo que produce un cambio colorimétrico cuando se hace reaccionar con MCAM en una muestra puede incorporarse de forma homogénea en la matriz transportadora, y la matriz transportadora contienen entonces la composición de reactivo de forma homogénea a lo largo de la matriz
40 transportadora manteniendo al mismo tiempo la penetrabilidad de la matriz transportadora por el componente predeterminado de la muestra de ensayo. Los ejemplos de composiciones de reactivo adecuadas pueden incluir por ejemplo una molécula de unión a MCAM en el caso de una técnica basada en anticuerpo o tampón de pH en el caso de detección enzimática. La composición de reactivo preferentemente se seca y estabiliza en una almohadilla de ensayo adherida a al menos un extremo de un soporte sólido. La almohadilla de ensayo en la que la composición de reactivo se absorbe y se seca, está hecha preferentemente de un material de membrana que muestra color de fondo mínimo. Preferentemente, la almohadilla de ensayo puede construirse de materiales lavados con ácido o base para
45 minimizar el color de fondo. En otra realización la composición de reactivo que se seca en la tira reactiva comprende además agentes humectantes para reducir la fragilidad de la almohadilla de ensayo. Los ejemplos no limitantes de agentes humectantes preferidos incluyen TritonX- 100, Bioterg, glicerol, Tween 0 y similares. La composición de reactivo puede aplicarse a la tira reactiva por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la matriz transportadora de la que se hacen las almohadillas de ensayo puede sumergirse en una solución de la composición de reactivo y secarse según técnicas conocidas en la materia. Una tira reactiva puede estar provista de múltiples
50 almohadillas de ensayo para ensayar con respecto a más de un analito en una muestra de orina. Puede proporcionarse una tira reactiva que comprende un soporte sólido provisto de una o más almohadillas de ensayo incluyendo almohadillas de ensayo para medir la presencia de uno o más analitos seleccionados del grupo que comprende proteínas tales como marcadores de insuficiencia cardíaca (aguda), marcadores de disfunción sistólica BNP, NT-pro-BNP o fragmentos de los mismos, marcadores de disfunción renal Cistatina C, NGAL, U-albúmina, γ -GT, NAG, Al M, B1M, creatinina, vasopresina, aldosterona, angiotensina, ACE o fragmentos de los mismos, sangre, leucocitos, urea, nitrito, glucosa, cetonas, bilirrubina, urobilinógeno, proteínas en general y/o una almohadilla de ensayo de pH y/o una almohadilla de ensayo para medir gravedad específica. Como alternativa o además de lo mismo, pueden incluirse analitos representativos del desequilibrio homeostático de líquidos, acumulación de líquidos o reducción de líquidos, presión y/o volumen de llenado vascular aumentado o reducido, aumento o pérdida de peso,
65 edema o deshidratación, disfunción sistólica, insuficiencia cardíaca (aguda), FEVI, PTDVI, presión de llenado cardíaco en la almohadilla de ensayo.

Una posible realización de una tira reactiva 101 se representa en forma de diagrama en la Figura 5 A-B. La tira 101 incluye un extremo proximal 102 y un extremo distal 103. Se proporcionan diversas almohadillas de ensayo 109, 109', 109" en las que las composiciones de reactivo se proporcionan en el extremo proximal 102 en un soporte sólido 107 de la tira reactiva. La tira debe diseñarse de tal manera que pueda humectarse con una cantidad suficientemente grande de muestra, opcionalmente diluida por un líquido fisiológico que mejora el flujo capilar de una muestra viscosa tal como sangre o saliva y similares.

Una tira reactiva como se define en el presente documento se usa de la siguiente manera. Brevemente, una o más áreas de almohadillas de ensayo de la tira reactiva se sumergen en una muestra o se aplica una cantidad pequeña de muestra a la tira reactiva en el área o las áreas de almohadillas de ensayo. Se produce un desarrollo de color que puede analizarse visualmente o por reflectometría en la tira reactiva en un periodo de tiempo corto, habitualmente en un periodo de 0,5 a 10 minutos. El cambio de color del área reactiva en la almohadilla de ensayo tras reaccionar con MCAM es preferentemente directamente proporcional a la concentración de MCAM en la muestra del paciente. La intensidad del color que se desarrolla en la almohadilla de ensayo puede determinarse visualmente o por un lector basado en reflectancia, por ejemplo. El desarrollo de color en el área o las áreas de almohadillas de ensayo se compara con un color o colores de referencia para determinar una estimación de la cantidad de MCAM presente en la muestra. La intensidad del color que se desarrolla en la almohadilla de ensayo se compara con al menos uno y preferentemente al menos dos tonos de color patrón que corresponden a un intervalo de concentración de MCAM determinado por aplicación de un factor de corrección.

La tira reactiva puede comprender además un colorante fluorescente o infrarrojo, aplicado a la tira de soporte o incorporado en una almohadilla de ensayo, que asegura el alineamiento apropiado de la tira reactiva en un aparato que tiene un sistema de detección para la respuesta detectable o medible.

En otra realización, se desvela una almohadilla de ensayo para medir la presencia de MCAM en una muestra. Preferentemente dicha almohadilla de ensayo comprende una matriz transportadora que incorpora una composición de reactivo capaz de interactuar con MCAM para producir una respuesta medible, preferentemente una respuesta medible visual o instrumentalmente. También se desvela una almohadilla de ensayo como se define en el presente documento para su uso en una tira reactiva, preferentemente en una tira reactiva como se define en el presente documento.

Los agentes de unión específica, péptidos, polipéptidos, proteínas, biomarcadores, etc. en los presentes kits pueden estar en diversas formas, por ejemplo, liofilizados, libres en solución o inmovilizados en una fase sólida. Pueden proporcionarse, por ejemplo, en una placa multipocillo o como una matriz o micromatriz o pueden envasarse por separado y/o individualmente. Pueden marcarse convenientemente como se enseña en el presente documento. Dichos kits pueden ser particularmente adecuados para realizar los métodos de ensayo de la invención, tales como, por ejemplo, inmunoensayos, ensayos de ELISA, ensayos de espectrometría de masas, y similares.

Los aspectos y las realizaciones anteriores están apoyados adicionalmente por los siguiente ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cuantificación de proteínas diana por MASSterclass para validación temprana de marcadores candidatos obtenidos del descubrimiento

Preparación experimental de MASSterclass

Los ensayos de MASSterclass usan espectrometría de masas en tándem dirigida con dilución de isótopos estable como un sistema de cuantificación de péptidos de estadio final (también denominado supervisión de reacciones múltiples (MRM) y supervisión de reacción individual (SRM)). El péptido diana es específico (es decir, proteotípico) para la proteína específica de interés, es decir, la cantidad de péptido medida está directamente relacionada con la cantidad de proteína en la muestra original. Para alcanzar la especificidad y sensibilidad necesaria para cuantificación de biomarcadores en muestras complejas, fraccionamientos de péptidos preceden a la etapa de cuantificación de estadio final.

Un ensayo MASSterclass adecuado puede incluir las siguientes etapas:

- Muestra de plasma/suero

- Agotamiento de albúmina humana e IgG (reducción de la complejidad en las proteínas) usando captura por afinidad con anticuerpos anti-albúmina y anti IgG usando columnas de centrifugación ProteoPrep (Sigma Aldrich)

- Adición de cantidades conocidas de péptidos marcados con isótopos. Este péptido tiene la misma secuencia de aminoácidos que el péptido proteotípico de interés, típicamente con un aminoácido marcado con isótopos incluido para generar una diferencia de masa. Durante el proceso completo, el péptido marcado tiene un comportamiento químico y cromatográfico idéntico al péptido endógeno, excepto durante la etapa de

cuantificación de estadio final que se basa en la masa molecular.

- Digestión trípica. Las proteínas en la muestra de suero/plasma empobrecida se digieren en péptidos usando tripsina. Esta enzima escinde las proteínas en dirección C terminal desde lisina y arginina, excepto cuando esté presente una prolina en dirección C terminal de la lisina o la arginina. Antes de la digestión, las proteínas se desnaturalizan hirviendo, lo que hace la molécula proteica más accesible para la actividad de tripsina durante la incubación de 16 h a 37 °C.

- Primer fraccionamiento basado en péptidos: Electroforesis de flujo libre (FFE; BD Diagnostic) es una técnica de separación de líquidos, sin gel, en la que se separan moléculas con carga que se mueven en un flujo laminar continuo a través de un campo eléctrico perpendicular al flujo. El campo eléctrico provoca que las moléculas con carga se separen en el gradiente de pH según su punto isoeléctrico (pI). Solamente se seleccionan las fracciones que contienen los péptidos supervisados para fraccionamiento adicional y análisis por LC-MS/MS. Cada péptido de interés se eluye de la cámara de FFE en un número de fracción específico, que se determina durante el desarrollo del ensayo de proteínas usando el homólogo peptídico sintético. Fracciones o grupos de fracciones específicos (multiplexación) continúan al siguiente nivel de fraccionamiento.

- Segundo fraccionamiento basado en péptidos: HPLC de fenilo (Fenilo XBridge; Waters) separa péptidos según la hidrofobicidad y la naturaleza aromática de aminoácidos presentes en la secuencia peptídica. Se consigue ortogonalidad con la separación de C18 del extremo posterior operando la columna a un valor de pH aumentado (pH 10). Como se demuestra en Gilar *et al.* 2005, *J Sep Sci* 28(14): 1694-1703, el pH es con mucho el parámetro más drástico para alterar la selectividad en RP-HPLC. Cada péptido de interés se eluye de la columna de fenilo en un tiempo de retención específico, que se determina durante el desarrollo del ensayo de proteínas usando el homólogo peptídico sintético. El uso de un sistema de control externo, en el que se separa una mezcla de 9 péptidos convencionales antes de un lote de preparaciones de muestras, permite ajustar la recogida de fracciones para corregir con respecto a desplazamientos de tiempos de retención. El alcance del fraccionamiento depende de la concentración de la proteína en la muestra y la complejidad de esa muestra.

- Cuantificación basada en LC-MS/MS, incluyendo separación adicional en nanoLC de fase inversa (C18) (PepMap C18; Dionex) y MS/MS: espectrometría de masas en tándem usando modo MRM (4000 QTRAP; ABI)/SRM (Vantage TSQ; Thermo Scientific). La columna de LC está conectada con una aguja de electronebulización conectada con el cabezal fuente del espectrómetro de masas. A medida que el material se eluye de la columna, las moléculas se ionizan y entran en el espectrómetro de masas en fase gaseosa. El péptido que se supervisa se selecciona específicamente para pasar el primer cuadrupolo (Q1), basándose en su relación de masa con respecto a carga (m/z). El péptido seleccionado se fragmenta después en un segundo cuadrupolo (Q2) que se usa como una celda de colisión. Los fragmentos resultantes entran después en el tercer cuadrupolo (Q3). Dependiendo de los ajustes del instrumento (determinados durante la fase de desarrollo del ensayo) solamente un fragmento peptídico específico o fragmentos peptídicos específicos (o las denominadas transiciones) se seleccionan para detección.

- La combinación de la m/z del péptido supervisado y la m/z del fragmento supervisado de este péptido se denomina una transición. Este proceso puede realizarse para múltiples transiciones durante un experimento. Tanto el péptido endógeno (analito) como su péptido sintético marcado con isótopos correspondiente (patrón interno) se eluyen en el mismo tiempo de retención y se miden en el mismo experimento de LC-MS/MS.

- La lectura de MASSterclass se define por la relación entre el área bajo el pico específico para el analito y el área bajo el pico específico para el análogo marcado con isótopos sintético (patrón interno). Las lecturas de MASSterclass están directamente relacionadas con la concentración original de la proteína en la muestra. Las lecturas de MASSterclass pueden por lo tanto compararse entre diferentes muestras y grupos de muestras.

Un protocolo de MASSterclass típico seguido en el presente estudio se proporciona a continuación:

- Se someten 25 µl de plasma a un agotamiento de albúmina humana e IgG (columnas de centrifugación ProteoPrep; Sigma Aldrich) según el protocolo del fabricante, excepto que se usó NH₄HCO₃ 20 mM como el tampón de unión/equilibrio.

- La muestra empobrecida (225 pl) se desnaturaliza durante 15 min a 95 °C y se enfría inmediatamente en hielo

- Se añaden 500 fmol del péptido marcado con isótopos (péptido 'Heavy AQUA' hecho a medida; Thermo Scientific) a la muestra

- Se añaden 20 µg de tripsina a la muestra y se permite la digestión durante 16 h a 37 °C

- La muestra digerida se diluyó en primer lugar 1/8 en el disolvente A (ácido fórmico 0,1 %) y después 1/20 en el mismo disolvente que contiene 250 amol/µl de todos los péptidos marcados con isótopos (péptido 'Heavy AQUA' hecho a medida; Thermo Scientific) de interés.

- Se separaron 20 µl de la dilución final usando NanoLC de fase inversa con MS/MS en línea en modo MRM/SRM:

- 5 - Columna: PepMap C18, 75 µm I.D. x 25 cm L, diámetro de poro de 100 Å, tamaño de partícula de 5 µm
- Disolvente A: ácido fórmico al 0,1 %
- Disolvente B: acetonitrilo al 80 %, ácido fórmico al 0,1 %
- 10 - Gradiente: 30 min; Disolvente B 2 %-55 %
- MS/MS en modo MRM: el método contiene las transiciones para el analito así como para el péptido marcado, sintético.
- 15 - Las transiciones usadas se determinaron experimentalmente y se seleccionaron durante el desarrollo del ensayo de proteínas
- Cada una de las transiciones de interés se midió durante un periodo que comenzó 3 minutos antes y que terminó 3 minutos después del tiempo de retención determinado del péptido de interés, asegurando que cada pico tuviera al menos 15 puntos de datos.
- 20 - Los datos sin procesar se analizaron y cuantificaron usando el software LCQuan (Thermo Scientific): el área bajo el pico del analito (= el péptido de MCAM) y bajo el pico del patrón interno (el péptido de MCAM sintético, marcado) en el mismo tiempo de retención de C18 se determinó mediante detección de picos automática. Estos se comprobaron manualmente.
- 25 - La lectura de MASsterclass se definió por la relación del área de pico del analito y el área de pico del patrón interno

30 *Análisis estadístico de MASsterclass*

Las relaciones medidas son cuantificaciones diferenciales de péptidos. En otras palabras una relación es la concentración normalizada de un péptido. La concentración de un péptido es proporcional a la relación medida con espectrometría de masas.

35 Ejemplo 2: Verificación de MCAM usando MASsterclass

Se recogieron muestras clínicas de forma prospectiva entre 3 centros médicos diferentes de pacientes que se presentaron en el servicio de urgencias (SU) con disnea aguda (n=100) relacionada con insuficiencia cardíaca aguda o relacionada con otras causas (= disnea sin ICA).

40 Para todos los paciente incluidos se rellenó un archivo de informe de caso (AIC) exhaustivo con detalles sobre el trasfondo médico, el diagnóstico de ingreso y las medicaciones. Se proporciona una visión de conjunto de las características basales de los pacientes en la Tabla 1.

45 Tabla 1:

		ICA	Disnea sin ICA
Edad (pr)		72±12	62±19
Sexo	% de hombres	67	64
Historial médico	% de historial de IC	70	8,5
	% de EPOC/asma	14,5	20
	% de arteriopatía coronaria	30	4
Examen físico	Frecuencia cardíaca (lpm)	84 (68-107)	92 (75-114)
	Tc sistólica (mmHg)	135 (107-161)	130 (106-145)
	Tc diastólica (mmHg)	74 (61-87)	70 (61-80)
ECG	FEVI - mediana (intervalos entre cuartiles)	35 (25-51)	65 (59-65)
Análisis de ingreso	BNP (pg/ml)	1006 (470-2027)	119,4 (57-297)
	NT-proBNP (pg/ml)	5591 (2453-1500)	670 (289-1939)
	Creatinina (umol/l)	123,2 (89,5-161,5)	79 (65-107,5)
Diagnóstico de	ICA	52 %	

		ICA	Disnea sin ICA
ingreso	<i>neumonía</i>	20 %	
	<i>EPOC/asma</i>	6 %	
	<i>embolia pulmonar</i>	3,50 %	
	<i>bronquitis aguda</i>	2 %	
	<i>otras (fibrilación auricular, SDRA, intoxicación, ...)</i>	13 %	
	<i>desconocida</i>	3,50 %	

El análisis de características operativas del receptor (ROC) demostró que MCAM era altamente sensible y específica para el diagnóstico de ICA en pacientes disneicos que se presentan en el SU, como se indica por una mediana de la ABC promedio de 0,91 con IC al 95 % de 0,85-0,96 (consúltese la Figura 4). Este rendimiento de diagnóstico es equivalente a BNP y NT-proBNP, los biomarcadores de referencia para diagnosticar ICA en una población con disnea aguda. La tabla 2 enumera los resultados.

Tabla 2:

	BNP	NT-proBNP	MCAM
Mediana de la ABC	0,88	385	0,91
IC al 95 %	0,82-0,95	0,77-0,92	0,85-0,96

La población con ICA que se estudia está enriquecida con respecto a pacientes con disfunción sistólica como se indica por la baja mediana de FEVI, es decir 35 %. Estos pacientes son típicamente más resistentes a la acumulación de líquidos y por lo tanto se presentan en el SU con disnea provocada por sobrecarga de volumen.

Ejemplo 3: Verificación de MCAM como un marcador de la progresión de la enfermedad y el estado de llenado: comparación de los niveles en el momento del ingreso frente al alta.

Se tomaron muestras de pacientes a los que se había diagnosticado insuficiencia cardíaca aguda en el momento del ingreso en el SU así como en el momento del alta del hospital, es decir cuando se consideró que los pacientes se había recuperado y estaban estables. En promedio la muestra de descarga se tomó 9-11 días después de la muestra del ingreso. Los niveles de MCAM se midieron usando MASsterclass y los niveles se compararon en el mismo paciente. Para la mayoría de los pacientes hubo una reducción significativa de MCAM cuando se compararon los niveles de admisión y alta (Figura 2). Se obtiene un resultado muy similar cuando se comparan los niveles de BNP en el momento del ingreso frente al alta. Estos datos apoyan la idea de que los niveles de MCAM son un reflejo del estado de la enfermedad y por lo tanto podría usarse para supervisar y/o predecir un acontecimiento agudo.

Además el principal tratamiento proporcionado a estos enfermos de ICA son diuréticos y como consecuencia los pacientes pierden líquidos. Por lo tanto un descenso de los niveles de MCAM refleja un cambio en el estado de llenado de los pacientes.

Ejemplo 4: Los niveles de MCAM se asocian con el aumento de peso y la pérdida de peso en enfermos de disnea aguda.

Se exploraron muestras clínicas de enfermos de disnea aguda (cohorte BASEL V como se describe en Potocki *et al.*, Journal of Internal Medicine ene 2010;267(1):119-29), a los que se ha diagnosticado insuficiencia cardíaca descompensada aguda o disnea debida a otras causas con respecto a MCAM usando MASsterclass. Todos los datos clínicos referidos a las muestras se obtuvieron a través del colaborador clínico y se añadieron al proceso de análisis de datos de MASsterclass.

Las asociaciones de los niveles de MCAM con todos los parámetros clínicos disponibles se calcularon usando ensayos estadísticos univariantes. Se usó el ensayo de rangos de Spearman para calcular los coeficientes de correlación y el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon para evaluar si dos muestras independientes de observación se originan de la misma población.

Este análisis mostró una clara asociación de MCAM con el aumento de peso antes del ingreso en el hospital y pérdida de peso después del uso de diuréticos terapéuticos como se indica por los valores de p de Wilcoxon bajos (resumidos en la tabla 3).

Tabla 3:

	población	valores de p de MCAM
pérdida de peso de ingreso a alta	ICA	0,00383
aumento de peso antes del ingreso	ICA	0,00058

La Figura 6 ilustra el efecto del aumento de peso en los niveles de IVIC:AM. Los enfermos de ICA que aumentan de peso antes del ingreso en el hospital (acumulación de líquidos) tienen niveles claramente aumentados de MCAM.

5 Ejemplo 5: Los niveles de MCAM están aumentados en enfermos de ICA con disfunción sistólica.

10 El efecto de la disfunción sistólica frente a la diastólica en enfermos de insuficiencia cardíaca en los niveles de MCAM se investigó basándose en los resultados de exploración de MASterclass de la cohorte BASEL V. Esta cohorte contiene un número suficiente de enfermos de ICA con fracción de eyección ventricular izquierda reducida (FEVI < 55) o FEVI conservada (FEVI > 55). Los niveles de MCAM son significativamente mayores en enfermos de ICA con fracciones de eyección reducidas ($p < 0,001$). La Figura 7 muestra diagramas de caja y bigotes para MCAM en estas dos subpoblaciones de ICA.

15 Los pacientes con una disfunción sistólica (FE reducida) son más resistentes a la acumulación de líquidos y acumularán más volumen en comparación con pacientes con disfunción diastólica antes de que aparezcan síntomas de disnea.

20 Ejemplo 6: Correlación de los niveles de MCAM con el valor de PTDVI en cohortes de enfermos de insuficiencia cardíaca adicionales

25 Se estudia una cohorte de pacientes adicional que comprende un total de 223 pacientes con diversos tipos y grados de trastornos cardiovasculares, de los que se seleccionarán pacientes con diferentes valores de presión telediastólica ventricular izquierda (PTDVI). Se determinará una correlación del nivel de PTDVI con los niveles en sangre de MCAM en dichos pacientes.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Pronota N.V.
- <120> MCAM COMO UN BIOMARCADOR PARA HOMEOSTASIS DE LÍQUIDOS Y FUNCIÓN SISTÓLICA
- <130> PRNO-031-PCT
- 35 <150> 09173601.7
- <151> 21-10-2009
- <150> 61/253.658
- <151> 21-10-2009
- 40 <150> 61/254.537
- <151> 23-10-2009
- 45 <150> 10156705.5
- <151> 17-03-2010
- <150> 61/314.789
- <151> 17-03-2010
- 50 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 55 <211> 646
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 60

ES 2 674 570 T3

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

Cys Cys Pro Arg Val Ala Gly Val Pro Gly Glu Ala Glu Gln Pro Ala
 20 25 30

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

Gly Leu Ser Gln Ser Gln Gly Asn Leu Ser His Val Asp Trp Phe Ser
 50 55 60

Val His Lys Glu Lys Arg Thr Leu Ile Phe Arg Val Arg Gln Gly Gln
 65 70 75 80

Gly Gln Ser Glu Pro Gly Glu Tyr Glu Gln Arg Leu Ser Leu Gln Asp
 85 90 95

Arg Gly Ala Thr Leu Ala Leu Thr Gln Val Thr Pro Gln Asp Glu Arg
 100 105 110

Ile Phe Leu Cys Gln Gly Lys Arg Pro Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile
 115 120 125

Gln Leu Arg Val Tyr Lys Ala Pro Glu Glu Pro Asn Ile Gln Val Asn
 130 135 140

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

Cys Val Gly Arg Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Gln Val Ile Trp Tyr Lys
 165 170 175

ES 2 674 570 T3

Asn Glu Arg Pro Leu Lys Glu Glu Lys Asn Arg Val His Ile Glu Ser
 180 185 190
 Ser Glu Thr Val Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Glu Ser Ile Leu
 195 200 205
 Lys Ala Glu Leu Val Lys Glu Asp Lys Asp Ala Glu Phe Tyr Cys Glu
 210 215 220
 Leu Asn Tyr Arg Leu Pro Ser Gly Asn His Met Lys Glu Ser Arg Glu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Pro Val Phe Tyr Pro Thr Glu Lys Val Trp Leu Glu Val
 245 250 255
 Glu Pro Val Gly Met Leu Lys Glu Gly Asp Arg Val Glu Ile Arg Cys
 260 265 270
 Leu Ala Asp Gly Asn Pro Pro Pro His Phe Ser Ile Ser Lys Glu Asn
 275 280 285
 Pro Ser Thr Arg Glu Ala Glu Glu Glu Thr Thr Asn Asp Asn Gly Val
 290 295 300
 Leu Val Leu Glu Pro Ala Arg Lys Glu His Ser Gly Arg Tyr Glu Cys
 305 310 315 320
 Glu Gly Leu Asp Leu Asp Thr Met Ile Ser Leu Leu Ser Glu Pro Glu
 325 330 335
 Glu Leu Leu Val Asn Tyr Val Ser Asp Val Arg Val Ser Pro Ala Ala
 340 345 350
 Pro Glu Arg Glu Glu Gly Ser Ser Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala Glu
 355 360 365
 Ser Ser Glu Asp Leu Glu Phe Glu Trp Leu Arg Glu Glu Thr Gly Glu
 370 375 380
 Val Leu Glu Arg Gly Pro Val Leu Glu Leu His Asp Leu Lys Arg Glu
 385 390 395 400
 Ala Gly Gly Gly Tyr Arg Cys Val Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Gly
 405 410 415
 Leu Asn Arg Thr Glu Leu Val Asn Val Ala Ile Phe Gly Pro Pro Trp
 420 425
 Met Ala Phe Lys Glu Arg Lys Val Trp Val Lys Glu Asn Met Val Leu
 435 440 445
 Asn Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly His Pro Arg Pro Thr Ile Ser Trp
 450 455 460
 Asn Val Asn Gly Thr Ala Ser Glu Glu Asp Glu Asp Pro Glu Arg Val
 465 470 475 480

ES 2 674 570 T3

Leu Ser Thr Leu Asn Val Leu Val Thr Pro Glu Leu Leu Glu Thr Gly
 485 490 495

Val Glu Cys Thr Ala Ser Asn Asp Leu Gly Lys Asn Thr Ser Ile Leu
 500 505 510

Phe Leu Glu Leu Val Asn Leu Thr Thr Leu Thr Pro Asp Ser Asn Thr
 515 520 525

Thr Thr Gly Leu Ser Thr Ser Thr Ala Ser Pro His Thr Arg Ala Asn
 530 535 540

Ser Thr Ser Thr Glu Arg Lys Leu Pro Glu Pro Glu Ser Arg Gly Val
 545 550 555 560

Val Ile Val Ala Val Ile Val Cys Ile Leu Val Leu Ala Val Leu Gly
 565 570 575

Ala Val Leu Tyr Phe Leu Tyr Lys Lys Gly Lys Leu Pro Cys Arg Arg
 580 585 590

Ser Gly Lys Gln Glu Ile Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Ser Glu Leu
 595 600 605

Val Val Glu Val Lys Ser Asp Lys Leu Pro Glu Glu Met Gly Leu Leu
 610 615 620

Gln Gly Ser Ser Gly Asp Lys Arg Ala Pro Gly Asp Gln Gly Glu Lys
 625 630 635 640

Tyr Ile Asp Leu Arg His
 645

<210> 2
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

10 Gly Ala Thr Leu Ala Leu Thr Gln Val Thr Pro Gln Asp Glu Arg
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar, predecir, pronosticar y/o supervisar la hipervolemia en un sujeto que comprende:
 - 5 (i) medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto, en donde la muestra es sangre, suero o plasma;
 - (ii) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un valor euvolémico, en donde una cantidad aumentada de MCAM indica que el sujeto está sobrellenado o indica un mal pronóstico para dicho sobrellenado en el sujeto.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, preferentemente en el transcurso de un tratamiento médico del sujeto, que comprende:
 - 15 (i) medir la cantidad de MCAM en muestras del sujeto de dos o más puntos temporales sucesivos;
 - (ii) comparar la cantidad de MCAM entre las muestras medidas en (i);
 - (iii) encontrar una desviación o ausencia de desviación en la cantidad de MCAM entre las muestras comparadas en (ii);
 - 20 (iv) atribuir dicho hallazgo de desviación o ausencia de desviación a un cambio en la hipervolemia en el sujeto entre los dos o más puntos temporales sucesivos.
- 25 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicha hipervolemia se caracteriza por uno cualquiera o más o todos de un aumento de la presión o el volumen de llenado vascular en dicho sujeto y/o un aumento de peso debido a la acumulación de líquidos en dicho sujeto.
4. Un método para determinar si un sujeto necesita o no una terapia para tratar la hipervolemia, que comprende:
 - 30 (i) medir la cantidad de MCAM en la muestra del sujeto en donde la muestra es sangre, suero o plasma;
 - (ii) comparar la cantidad de MCAM medida en (i) con un valor de referencia de la cantidad de MCAM, representando dicho valor de referencia un valor euvolémico, en donde una cantidad aumentada de MCAM indica que el sujeto necesita una terapia para tratar la hipervolemia.
- 35 5. El método según la reivindicación 4, en donde dicha terapia comprende administrar agentes diuréticos exógenos y/o endógenos y/o ultrafiltración para retirar sales y líquido correspondiente de la circulación.
- 40 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el sujeto recibe o ha recibido un tratamiento antidiabético, preferentemente uno o más sensibilizadores de insulina, más preferentemente uno o más agonistas de receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR-gamma), aún más preferentemente una o más tizolidinedionas (glitazonas), tales como rosiglitazona y/o pioglitazona.
- 45 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha hipervolemia está provocada por disfunción sistólica.
- 50 8. El método según la reivindicación 7, en donde dicha disfunción sistólica se caracteriza por una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) reducida, preferentemente en donde dicha FEVI es menor de 55 % o menor de 50 % o menor de 45 % y/o por presión de llenado cardíaco aumentada.
- 55 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende medir la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores útiles para diagnosticar, predecir, pronosticar y/o supervisar la hipervolemia en la muestra del sujeto.
- 60 10. El método según la reivindicación 9, en donde dicho otro biomarcador se elige del grupo que consiste en péptido natriurético auricular (ANP), proANP, parte de región media de pro-ANP (MR-proANP), péptido natriurético de tipo B (BNP), péptido natriurético de tipo pro-B (proBNP), péptido natriurético de tipo pro-B amino terminal (NTproBNP), cistatina C, NGAL, albúmina, γ -GT, NAG, A1M, B1M, creatinina, urea, vasopresina, copeptina, aldosterona, angiotensina, ACE y fragmentos o precursores de cualquiera de los mismos.
- 65 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o cantidad de los uno o más biomarcadores adicionales se miden usando, respectivamente, un agente de unión capaz de unirse específicamente con MCAM y/o fragmentos del mismo, y un agente de unión capaz de unirse específicamente con dichos uno o más biomarcadores adicionales.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la cantidad de MCAM y/o la presencia o ausencia y/o cantidad de los uno o más biomarcadores adicionales se miden usando una tecnología de inmunoensayo, o usando un método de análisis de espectrometría de masas o usando un método de cromatografía, o usando una combinación de dichos métodos.

5

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha muestra es plasma y en donde se detecta la forma en circulación en plasma de MCAM.

FIG 1

MCAM, de NP_006491

mgIprlvcaflIlaaccccprvagvPGEAEQPAPELVEVEVGSTALLKCGLSQSQGNLSHV
 DWFSVHKEKRTLIFRVRQGGQSEPEGEYEQRLSLQDRGATLALTQVTPQDERIFLCQGKR
 PRSQEYRIQLRVYKAPEEPNIQVNPLGIPVNSKEPEEVATCVGRNGYPI PQVIWYKNGRP
 LKEEKNRVHIQSSQTVESSGLYTLQSILKAQLVKEDKDAQFYCELNYRLPSGNHMKESRE
 VTPVVFYFTEKVVLEVEPVGMLKEGDRVEIRCLADGNPPPHFSISKQNPSTREAAEETN
 DNGVLVLEPARKEHSGRYECQGLDLDTMISLLSEPQELLVNYVSDVRVSPAAPERQEGSS
 LTLTCEAESSQDLEFQWLREETGQVLERGPVLQLHDLKREAGGGYRCVASVPSIPGLNRT
 QLVNVAIFGPPWMAFKERKVVWKENMVLNLSCEASGHPRTISWNVNGTASEQDQDPQRV
 LSTLNLVLTPELLETGVECTASNDLGKNTSILFLELVNLTTLTPDSNTTGLSTSTASPH
 TRANSTSTERKLPEPESRGvvivavivcilvIavlgavlyflykkgklpcrrsrgkqeitl
 Ppsrkselvvvksdklpeemgllqgssgdkrapgdqgekyidlrh (SEQ ID NO: 1)

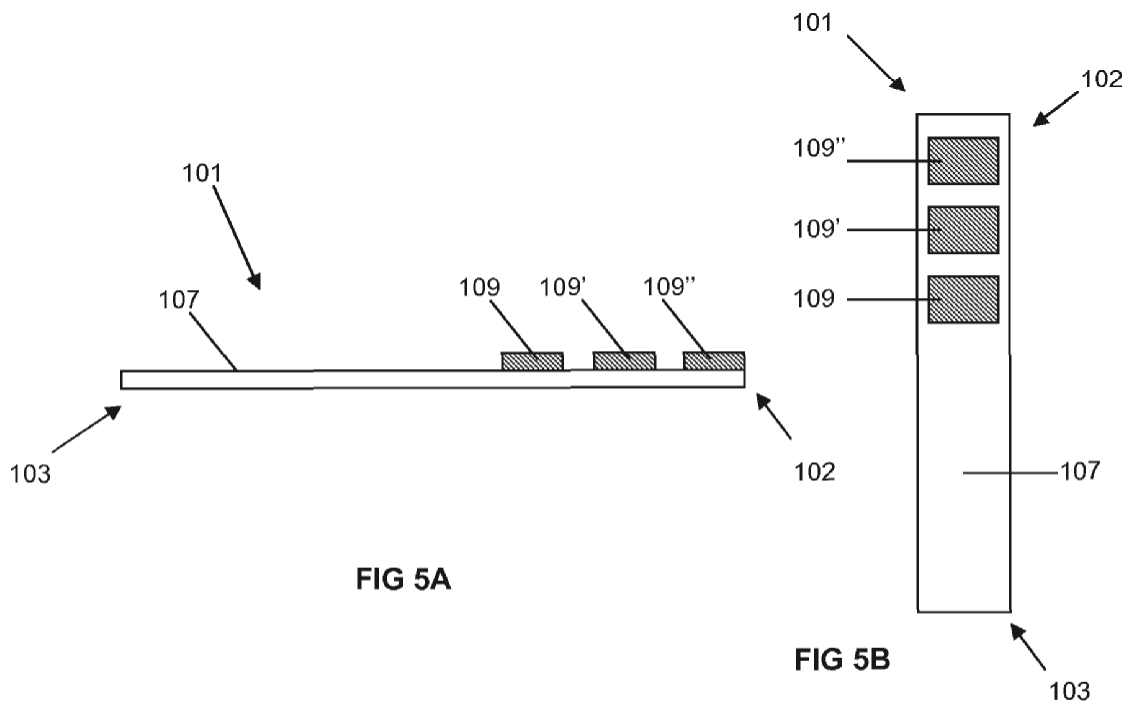


FIG 2

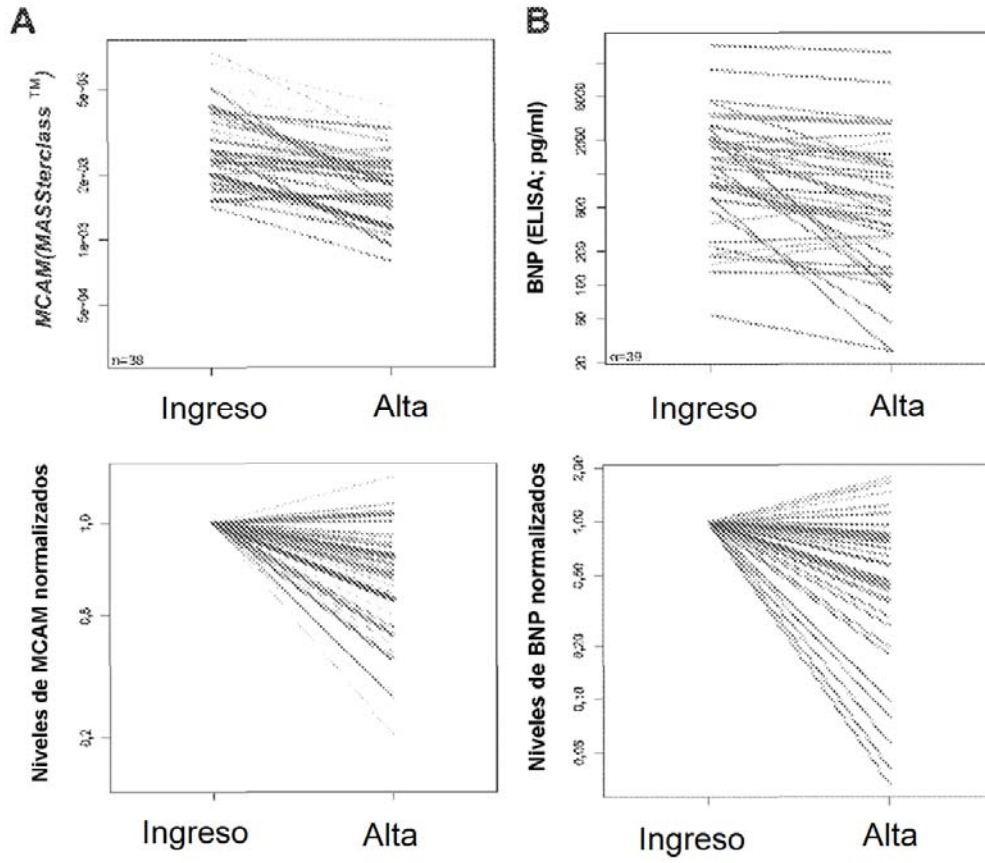


FIG 3

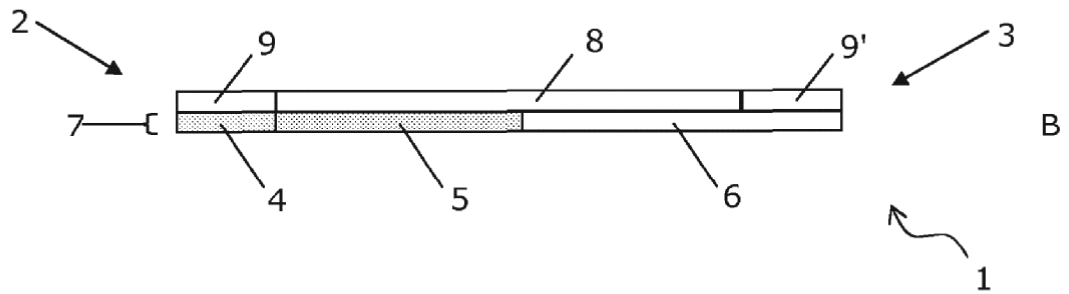
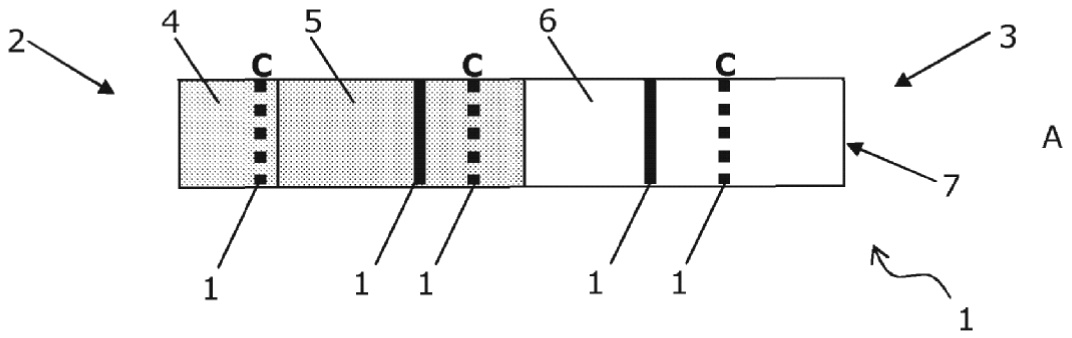


FIG 4

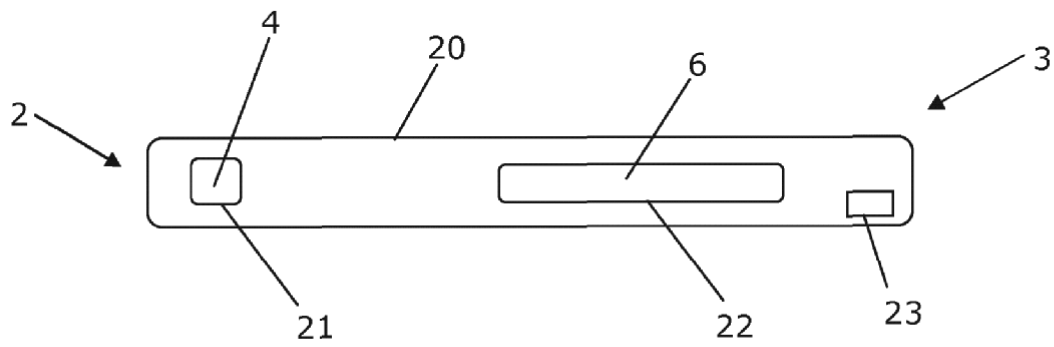


FIG 6

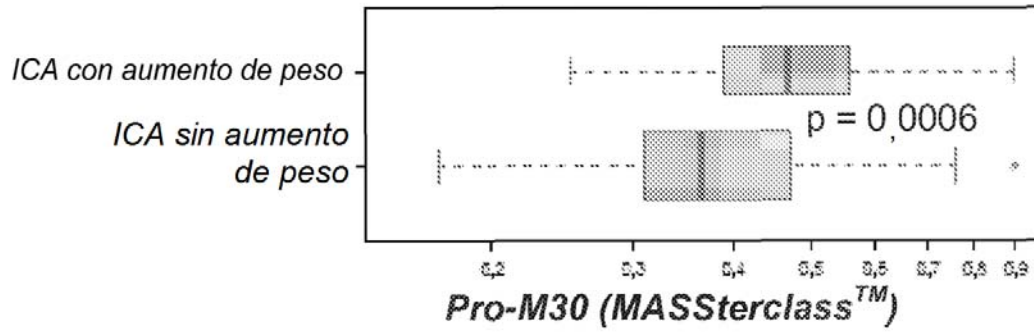


FIG 7

