

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 553**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2014** E 14161732 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** EP 2924438

54 Título: **IGFBP7 para el diagnóstico de la disfunción diastólica**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KARL, JOHANN;
WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE;
BLOCK, DIRK;
ZAUGG, CHRISTIAN;
BRUNNER, HANS-PETER;
JANUZZI, JAMES;
ZIEGLER, ANDRÉ;
BRAZ, JULIAN;
DIETERLE, THOMAS y
KAISER, EDELGARD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 676 553 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

IGFBP7 para el diagnóstico de la disfunción diastólica

5 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar y/o estadificar la disfunción diastólica o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a la disfunción diastólica. El método comprende medir el nivel de IGFBP7 (proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a insulina) y, opcionalmente, el nivel de por lo menos un marcador adicional en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, y comparar e nivel con un nivel de referencia. Se contempla además un método de monitorización de la función diastólica en un paciente que sufre de insuficiencia
10 cardíaca. Asimismo, se encuentran comprendidos en la presente invención, kits y dispositivos adaptados para llevar a cabo el método de la presente invención.

La utilización de biomarcadores para el cuidado de pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) se ha ampliado significativamente. Los péptidos natriuréticos (PN), incluyendo el péptido natriurético de tipo B (BNP, por sus siglas en inglés) y su equivalente de corte aminoterminal (NT-proBNP) actualmente se utilizan generalizadamente para el diagnóstico, pronóstico y control de los pacientes afectados (Yancy et al., ACCF/AHA Guidelines for the Management of Heart Failure: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, *Circulation* 128:e240-319, 2013). Después de BNP y NT-proBNP, se está investigando un amplio abanico de nuevos biomarcadores, cada uno de ellos con la potencial promesa de permitir la evaluación aditiva de pacientes que sufren de una fisiopatología compleja de IC. A este respecto se han realizado esfuerzos considerables para entender mejor la relación o relaciones de mecanismo entre las concentraciones de los biomarcadores cardíacos y los procesos fisiopatológicos cardiovasculares subyacentes por los que resultan liberados.

25 Se ha encontrado que los péptidos natriuréticos se encuentran asociados a una amplia diversidad de anomalías de la estructura y funcionamiento cardiovasculares, incluyendo tanto la función sistólica como diastólica del ventrículo izquierdo (VI) (Tschope et al., The role of NT-proBNP in the diagnostics of isolated diastolic dysfunction: Correlation with echocardiographic and invasive measurements, *Eur. Heart J.* 26:2277-2284, 2005, Weiner et al., Improvement in structural and functional echocardiographic parameters during chronic heart failure therapy guided by natriuretic peptides: Mechanistic insights from the proBNP outpatient tailored chronic heart failure (protect) study, *Eur. J Heart Fail.* 15:342-351, 2013, Yu et al., Diastolic dysfunction and natriuretic peptides in systolic heart failure. Higher ANP and BNP levels are associated with the restrictive filling pattern, *Eur. Heart J.* 17:1694-1702, 1996). Respecto a este último, la identificación y gradación de la gravedad de la función diastólica anormal es compleja; en ellas se evalúan varios parámetros ecocardiográficos (Nagueh et al., Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 22:107-133, 2009). Aunque los péptidos natriuréticos se encuentran elevados en la IC debido a la disfunción diastólica, no son completamente no específicos en esta asociación (Daniels et al., Natriuretic peptides, *J. Am. Coll. Cardiol.* 50:2357-2368, 2007), limitando de esta manera su aplicabilidad. Por lo tanto, uno o más biomarcadores predominantemente útiles en la ayuda al diagnóstico y gradación de la función diastólica anormal resultarían excepcionalmente valiosos en la
40 práctica clínica.

El eje del factor de crecimiento similar a la insulina se ha encontrado anteriormente que es un indicador predictivo de resultados de IC (Watanabe et al., Insulin-like growth factor axis (insulin-like growth factor-I/insulin-like growth factor-binding protein-3) as a prognostic predictor of heart failure: Association with adiponectin, *Eur. J. Heart Fail.* 12:1214-1222, 2010). La proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP7) en particular se ha identificado recientemente como potencial nuevo marcador de IC mediante búsquedas proteómicas e informáticas de modelos animales de hipertrofia cardíaca y tejidos humanos de insuficiencia cardíaca (Chugh et al., Pilot study identifying myosin heavy chain 7, desmin, insulin-like growth factor 7, and annexin a2 as circulating biomarkers of human heart failure, *Proteomics* 13:2324-2334, 2013). IGFBP7 se asocia principalmente a hipertrofia cardíaca y se expresa a niveles elevados en la IC pero no en el suero normal. IGFBP7 aparentemente también se expresa en la vasculatura, regulando potencialmente la angiogénesis (van Breevoort et al., Proteomic screen identifies IGFBP7 as a novel component of endothelial cell-specific weibel-palade bodies, *J. Proteome Res.* 11:2925-2936, 2012).

La disfunción diastólica miocárdica es un tipo de insuficiencia cardíaca diferente de la disfunción sistólica miocárdica. Los pacientes de insuficiencia cardíaca (IC) no necesitan estratificarse separada y específicamente para la terapia de la disfunción diastólica. Se están desarrollando varios nuevos fármacos para el tratamiento de la disfunción diastólica: LCZ696 (Novartis PhIII), sildenafilo, espironolactona, Anakinra e HISDN.

El diagnóstico de la disfunción diastólica es laborioso y costoso. Se requiere una clasificación funcional y estructural con medios de obtención de imágenes.

Algunas publicaciones recientes se refieren a la asociación de los niveles elevados de biomarcador y la disfunción diastólica (Circulating biomarkers in patients with heart failure and preserved ejection fraction. O'Meara et al., *Curr Heart Fail Rep* 10:350-358, 2013).

65

Dinh et al. analizaron IGFBP-7 en pacientes de IC con una fracción de eyección normal (resumen nº P1288: Serum insulin like growth factor-i and its binding protein-7: novel promising biomarker in heart failure with preserved ejection fraction. *Clinical Research in Cardiology* 101 (suplemento 1), 2012).

5 Motiwala et al. dan a conocer que la medición en serie de IGFBP7 podría utilizarse como indicador predictivo en pacientes con disfunción sistólica ventricular izquierda (*JACC* 61(10), E565, 2013; ver también Motiwala et al. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 7:250-261, 2014).

10 El documento nº US2010/0285491 da a conocer la utilización de IGFBP-7 en la evaluación de la insuficiencia cardíaca. Se da a conocer además que el marcador IGFBP-7 puede utilizarse para seleccionar un régimen de tratamiento para un paciente que sufre de IC.

15 El documento nº WO 2012/025355 da a conocer la determinación de IGFBP7 en pacientes con insuficiencia cardíaca temprana.

El documento nº WO 2014/040759 da a conocer que IGFBP7 puede utilizarse como indicador predictivo en pacientes con fracción de eyección ventricular izquierda normal.

20 El documento nº WO 2009/047283 describe un método de diagnóstico, en el que el tratamiento o combinación de tratamientos debe aplicarse en el proceso de remodelado de un sujeto tras el infarto de miocardio mediante la determinación de BNP, cTnT y por lo menos el marcador inflamatorio osteopontina (OPN), GDF- 15 CRP. Describe un nivel de osteopontina \geq 500 pg/ml indicativo de inhibidores de la ACE, antagonistas de receptor de angiotensina y antagonistas de aldosterona.

25 El documento nº WO 2010/124821 da a conocer que la endostatina puede medirse con el fin de evaluar la insuficiencia cardíaca.

30 El factor 15 de diferenciación del crecimiento (GDF-15, por sus siglas en inglés) es un elemento de la superfamilia de la citoquina factor de crecimiento transformante β . Se ha descrito GDF-15 como un indicador predictivo fuerte de sucesos cardiovasculares y un indicador de complicaciones cardiovasculares (Brown D.A. et al., *The Lancet* 359: 2159-2163, 2002; documento nº US2003/0232385; Kempf, *Circ.Res.* 98: 351-360, 2006). Kempf et al. han demostrado que los niveles circulantes de GDF-15 se relacionan con la gravedad de la insuficiencia cardíaca crónica (CHF, por sus siglas en inglés) y predicen el riesgo de muerte en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (*Clinical Chemistry* 53:2; 284-291 (2007); *Am Coll Cardiol*, 2007; 50:1054-1060).

35 El documento nº WO 2012/025355 da a conocer un método basado en la detección de troponina y GDF-15 para la monitorización de la terapia y la adaptación de la terapia en un paciente de insuficiencia cardíaca que recibe la administración de antagonistas de aldosterona tales como espironolactona.

40 El documento nº WO 2010/0070411 da a conocer un método basado en la detección de GDF-15, NT-proANP, NT-proBNP y troponina cardíaca, de monitorización de un sujeto aparentemente estable que sufre de insuficiencia cardíaca.

45 Kubo et al. (*Circulation J*, 75, 919-926, 2011) da a conocer una predicción de riesgo basada en la detección de BNP y troponina del deterioro clínico en pacientes que sufren de cardiomiopatía hipertrófica. Muchos de los pacientes evaluados sufrían de insuficiencia cardíaca.

50 Fonarow et al. (*Am. J. Cardiol.* 101:231-237, 2008) da a conocer una predicción de riesgo de mortalidad basada en la detección de BNP y troponina en pacientes que sufren de insuficiencia cardíaca.

El documento nº WO 2011/012268 da a conocer que la utilización de mímecán en una muestra de líquido corporal derivada de un individuo para evaluar la insuficiencia cardíaca. Se relaciona además a la utilización del marcador mímecán en la selección de un régimen de tratamiento para un paciente que sufre de IC.

55 Tal como se ha indicado anteriormente, la evaluación de la disfunción diastólica requiere instrumentación cara, técnicas especializadas de obtención de imágenes y habilidades expertas de grabación e interpretación de imágenes. La aplicación generalizada del cribado ecocardiográfico para la disfunción diastólica se ha visto limitada por consideraciones de coste-beneficio. Por lo tanto, son muy necesarios biomarcadores que puedan utilizarse para evaluar fiablemente la disfunción diastólica.

60 El problema técnico subyacente a la presente invención puede considerarse la provisión de medios y métodos para satisfacer las necesidades anteriormente indicadas.

65 El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y posteriormente en la presente memoria.

En el contexto de los estudios subyacentes a la presente invención, se ha encontrado que IGFBP7 es un biomarcador fiable para la evaluación de la disfunción diagnóstica.

5 De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico y/o gradación de la disfunción diastólica y/o de por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a la disfunción diastólica en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, comprendiendo dichos métodos las etapas de:

- 10 a) medir el nivel de IGFBP7 (proteína 7 de unión a factor de crecimiento similar a la insulina) en una muestra de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca y
- 15 b) comparar el nivel de IGFBP7 medido en la etapa a) con un nivel de referencia, en el que la anomalía estructural o funcional asociada a la disfunción diastólica se selecciona de entre el grupo que consiste en una proporción E'/A', tamaño incrementado de la aurícula izquierda, índice incrementado del volumen de la aurícula izquierda, velocidad del pico E incrementada, velocidad reducida del pico A, proporción transmitral E/A incrementada, proporción E/E' incrementada, velocidad reducida de pico sistólico de la vena pulmonar, proporción sistólica/diastólica reducida de la vena pulmonar, área ventricular derecha incrementada, presión sistólica ventricular derecha (RVSP, por sus siglas en inglés) incrementada, dilatación ventricular derecha incrementada, tamaño incrementado de la aurícula derecha, una regurgitación mitral más que leve y una regurgitación de la tricúspide más que leve.

20 El método de la presente invención, preferentemente es un método ex vivo o in vitro. Además, puede comprender etapas además de las anteriormente indicadas explícitamente. Por ejemplo, algunas etapas adicionales pueden estar relacionadas con pretratamientos de las muestras o la evaluación de los resultados obtenidos mediante el método. El método puede llevarse a cabo manualmente o asistido por automatización. Preferentemente, la etapa (a) y/o (b) puede estar asistida totalmente o en parte por automatización, p.ej. por equipos robóticos y sensoriales adecuados para la medición en la etapa (a) o una comparación implementada por ordenador y/o evaluación basada en dicha comparación en la etapa (b).

30 La disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional se diagnostica/gradando llevando a cabo la comparación en la etapa b) del método de la presente invención. De acuerdo con lo anterior, el método puede comprender además la etapa c) de diagnóstico y/o gradación de la disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional del corazón basada en los resultados de la etapa b). Alternativamente, el método puede comprender además la etapa c) de proporcionar un diagnóstico y/o una gradación de por lo menos una anomalía estructural o funcional del corazón asociada a disfunción diastólica basándose en los resultados de la etapa b).

35 En una realización de la presente invención, el biomarcador IGFBP7 (y, opcionalmente, por lo menos un biomarcador adicional tal como se indica posteriormente) e mide mediante la puesta en contacto de la muestra con un agente que se une específicamente a IGFBP7 (y, opcionalmente, con un agente adicional, o agentes adicionales que se unen específicamente a dicho biomarcador o biomarcadores adicionales), formando de esta manera un complejo entre el agente y IGFBP7 (y opcionalmente, un complejo entre el agente adicional y el biomarcador o biomarcadores adicionales), detectando la cantidad de complejo (complejos) formados, midiendo de esta manera el nivel de IGFBP7 (y opcionalmente el nivel de por lo menos un biomarcador adicional).

45 Según la presente invención, la disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional del corazón asociada a disfunción diastólica se gradando y/o se diagnostica.

50 La expresión "disfunción diastólica" es bien conocida de la técnica. Preferentemente, la expresión se refiere a una función de bombeo reducida del corazón debido a un llenado ventricular deteriorado. De esta manera, la expresión preferentemente se refiere a una caída del rendimiento de uno o ambos ventrículos del corazón durante la etapa temporal de diástole. Cómo diagnosticar la disfunción diastólica con medidas convencionales es bien conocido de la técnica (ver la sección de Ejemplos o p.ej. Shuai et al., Eur. J. Heart Fail. 13: 737-745, 2011; o Schäfer y Dieterle, Therapeutische Umschau 68 (2): 81 - 87, 2011, o Paulus et al., Eur. Heart J. 28(20): 2539-2555, 2007). De acuerdo con el patrón de llenado diastólico, la disfunción diastólica puede gradarse de la manera siguiente (ver también Nishimura et al., Journal of the American College of Cardiology, 30:8-18, 1997):

- 55
- Grado 1 = patrón de relajación alterado con presión de llenado normal.
 - 1A = patrón de relajación alterado con presión de llenado incrementada.
 - Grado 2 = patrón pseudonormalizado.
 - Grado 3 = patrón restrictivo reversible.
 - 60 • Grado 4 = patrón restrictivo irreversible.

65 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "disfunción diastólica" comprende la disfunción diastólica de grados 1, 1a, 2, 3 y 4, en particular la expresión comprende la disfunción diastólica de grado 3 y/o 4 (en particular tal como se define en Nishimura). Preferentemente, el patrón es irreversible. La expresión "anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica" es bien conocida por el experto en la materia. Debe entenderse que dicha

anormalidad es una anormalidad del corazón asociada a disfunción diastólica. Preferentemente, la anormalidad es un parámetro incrementado (en algunos casos, un parámetro reducido) que se encontraba incrementado (o en algunos casos, reducido) en pacientes con niveles elevados de IGFBP7 en la sección de Ejemplos (ver, en particular, los Ejemplos 1 y 2 o la Tabla 2 en el Ejemplo 1). Más preferentemente, la anormalidad o anormalidades estructurales o funcionales del corazón asociadas a disfunción diastólica es un parámetro incrementado (o, en algunos casos, reducido) tal como se lista en la Tabla 2 de la sección de Ejemplos (ver la primera columna), en particular en la parte C de dicha tabla ("Función diastólica y estimaciones de presión de llenado") o en la Tabla 4. Todavía más preferentemente, la anormalidad es un parámetro incrementado (o reducido) para el que el valor de p en la Tabla 2 es inferior a 0,01, en particular inferior a 0,005. Lo más preferentemente, la anormalidad estructural o funcional asociada a la disfunción diastólica es por lo menos una anormalidad seleccionada de entre el grupo que consiste en un tamaño incrementado de la aurícula izquierda (preferentemente un diámetro superior-inferior incrementado de la aurícula izquierda), un índice del volumen auricular izquierdo incrementado, una velocidad del pico E (es decir, una velocidad Doppler de la onda E transmitral) incrementada, una velocidad reducida del pico A (es decir, una velocidad Doppler de la onda A transmitral inferior), una proporción E/A transmitral incrementada, una proporción incrementada de velocidad del flujo de entrada mitral E a velocidad E' Doppler tisular (es decir, una proporción E/E' incrementada), una proporción E'/A' incrementada, una velocidad del pico sistólico de la vena pulmonar educida, una velocidad incrementada del pico diastólico de la vena pulmonar, una proporción sistólica/diastólica reducida de la vena pulmonar, una superficie incrementada del ventrículo derecho, una presión sistólica ventricular derecha (RVSP) incrementada, una dilatación ventricular derecha incrementada, un tamaño incrementado de la aurícula derecha (preferentemente un diámetro superior-inferior incrementado de la aurícula derecha), una regurgitación mitral más que leve y una regurgitación tricúspide más que leve. Para una explicación de los parámetros, así como para la determinación de los mismos, ver también la sección de Ejemplos (protocolo ecocardiográfico). Se dan a conocer anormalidades preferentes adicionales en McMurray et al. (European Heart Journal 33:1787-1847, 2012) o Spencer et al. (J. Am. Soc. Echocardiogr. 26:567-81, 2013). Los parámetros "tamaño auricular izquierdo" e "índice de volumen auricular izquierdo" son parámetros para el tamaño y volumen de la aurícula izquierda (AI), respectivamente.

Preferentemente, el tamaño de la aurícula izquierda, en particular el diámetro de la aurícula izquierda, se encuentra incrementado, en el caso de que el tamaño de la AI sea superior a aproximadamente 58 mm, en particular superior a aproximadamente 60 o aproximadamente 62 mm. En el Ejemplo 2, el tamaño de la aurícula izquierda se denomina diámetro de AI.

Preferentemente, el índice del volumen auricular izquierdo (iVAI), se encuentra incrementado en el caso de que el iVAI sea superior a aproximadamente 28 ml/m², en particular superior a aproximadamente 32 ml/m² o superior a aproximadamente 36 ml/ml². En el Ejemplo 2, el iVAI también se denomina AI cuadrado.

Los parámetros "velocidad del pico E", "velocidad del pico A", "proporción E/A transmitral", "proporción E/E'", "proporción E'/A'", "velocidad del pico sistólico de la vena pulmonar", "velocidad del pico diastólico de la vena pulmonar" y "proporción sistólica/diastólica de la vena pulmonar" son parámetros de la función diastólica y estimaciones de la presión de llenado. La proporción E'/A' es preferentemente la proporción de velocidades de llenado diastólico temprano/tardío.

Preferentemente, la velocidad del pico E se encuentra incrementada en el caso de que sea superior a aproximadamente 79 ms, en particular de que sea superior a aproximadamente 98 o aproximadamente 120 ms.

Preferentemente, una velocidad del pico A se encuentra reducida en el caso de que sea inferior a aproximadamente 54 ms, en particular inferior a aproximadamente 44 o aproximadamente 36 ms.

Preferentemente, la proporción E/A transmitral se encuentra incrementada en el caso de que sea superior a aproximadamente 1,8, en particular superior a aproximadamente 2,25 o aproximadamente 3,2. En el Ejemplo 2, la proporción E/A transmitral se denomina E/A.

Preferentemente, la proporción E/E' se encuentra incrementada en el caso de que sea superior a aproximadamente 10,8, en particular de que sea superior a aproximadamente 15 o aproximadamente 20,2.

Preferentemente, la proporción E'/A' se encuentra incrementada en el caso de que sea superior a aproximadamente 1,3, en particular de que sea superior a aproximadamente 1,45 o aproximadamente 2,54.

Preferentemente, una velocidad del pico sistólico de la vena pulmonar se encuentra reducida en el caso de que sea inferior a aproximadamente 36 ms, en particular inferior a aproximadamente 32 o aproximadamente 26 ms.

Preferentemente, una velocidad del pico diastólico de la vena pulmonar se encuentra incrementada en el caso de que sea superior a aproximadamente 54 ms, en particular de que sea superior a aproximadamente 60 o aproximadamente 76 ms.

Preferentemente, una proporción sistólica/diastólica de la vena pulmonar se encuentra reducida en el caso de que sea inferior a aproximadamente 1, en particular inferior a aproximadamente 0,49 o aproximadamente 0,38.

5 Preferentemente, RVSP se encuentra incrementado en el caso de que sea superior a aproximadamente 43 mm Hg, en particular superior a aproximadamente 53 o aproximadamente 60 mmHg.

10 El parámetro "tamaño de la aurícula derecha" es un parámetro de la aurícula derecha. El parámetro se encuentra incrementado en el caso de que sea superior a aproximadamente 48 mm, en particular superior a aproximadamente 54 o aproximadamente 60 mm.

15 Las anomalías/parámetros son bien conocidos de la técnica y pueden ser evaluados por el experto en la materia sin ningún otro procedimiento. Las anomalías/parámetros, p.ej., pueden determinarse tal como se indica en la sección de Ejemplos. La "disfunción diastólica", así como las anomalías/parámetros denominados anteriormente se revisan en Wan et al., JACC 63(5):407-16, 2014, que se incorpora como referencia en la presente memoria también con respecto al contenido completo de la exposición. Además, la disfunción diastólica, así como las anomalías tal como se indican en la presente memoria, se describen en McMurray et al. Y en Spencer et al. (ver las citas, anteriormente).

20 El término "diagnosticar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a evaluar si un paciente tal como se denomina en la presente memoria sufre de disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a la disfunción diastólica o no. El término se utiliza para indicar que el método según la presente invención clasificará un paciente como presentando disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica o, alternativamente, como no presentando dicha disfunción o anomalía. Se utiliza un nivel de IGFBP7 (y opcionalmente por lo menos un biomarcador adicional) superior al nivel de referencia para proporcionar un diagnóstico de disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica.

25 La expresión "gradación de la disfunción diastólica" y/o "gradación de por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica" tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente se refiere a evaluar la severidad de dicha disfunción y/o anomalía. En una realización, se diferencia entre una forma leve y una forma severa de dicha disfunción y/o anomalía.

30 Tal como entenderá el experto en la materia, las evaluaciones indicadas en la presente memoria, es decir, la gradación o el diagnóstico, habitualmente no pretenden ser correctas para la totalidad (es decir, 100%) de los pacientes que deben ser diagnosticados/gradados. Sin embargo, el término requiere que pueda identificarse una porción estadísticamente significativa de pacientes (p.ej. una cohorte en un estudio de cohorte). El experto en la materia podrá determinar si una porción es estadísticamente significativa sin más utilizando diversas herramientas bien conocidas de evaluación estadística, p.ej. la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se proporcionan datos en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes son por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99%. Los valores de p preferentemente son 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más preferentemente, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de los pacientes de una población puede ser diagnosticada/gradada apropiadamente mediante el método de la presente invención.

35 La expresión "indica que el paciente sufre de" una enfermedad y/o anomalía tal como se indica en la presente memoria, o de una forma leve o severa de dicha enfermedad y/o anomalía, se utiliza para ilustrar que un nivel del biomarcador resulta muy valioso pero no es diagnóstico sin error. Tal como apreciará el experto en la materia, en muchas enfermedades, ningún marcador bioquímico presenta una especificidad de 100% y simultáneamente una sensibilidad de 100%. En este caso, la evaluación, p.ej. con respecto al nivel de IGFBP7 (y opcionalmente por lo menos un biomarcador adicional) en la enfermedad/anomalía se lleva a cabo con una determinada probabilidad, p.ej. a un nivel dado de especificidad o a un nivel dado de sensibilidad. Al experto en la materia le resultarán totalmente familiares los métodos matemáticos/estadísticos utilizados para calcular la especificidad, la sensibilidad, el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo, el valor referencia o el error total.

40 La expresión "proporcionar un diagnóstico/evaluación/gradación/monitorización" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a utilizar la información o datos generados referidos al nivel de IGFBP7 (y opcionalmente por lo menos un marcador adicional tal como se indica posteriormente) en una muestra de un paciente para diagnosticar/evaluar/gradar/monitorizar la disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a la disfunción diastólica en un paciente tal como se indica en la presente memoria. La información o datos pueden encontrarse en cualquier formato, escrito, oral o electrónico. En algunas realizaciones, la utilización de la información o datos generados incluye comunicar, presentar, informar, almacenar, enviar, transferir, suministrar, transmitir, dispensar o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, comunicar, presentar, informar, almacenar, enviar, transferir, suministrar, transmitir, dispensar o combinaciones de los mismos se llevan a cabo con un dispositivo informático, unidad analizador o combinación de los mismos. En algunas realizaciones adicionales, comunicar, presentar, informar, almacenar, enviar, transferir, suministrar, transmitir,

dispensar o combinaciones de los mismos son llevadas a cabo por un profesional de laboratorio o médico. En algunas realizaciones, la información o datos incluye una comparación entre el nivel de IGFBP7 (y opcionalmente por lo menos un marcador adicional tal como se indica posteriormente) y un nivel de referencia. En algunas realizaciones, la información o datos incluye una indicación de que el paciente ha sido diagnosticado/evaluado/gradado con una enfermedad/anormalidad tal como se indica en la presente memoria.

El "sujeto" o "paciente" tal como se indica en la presente memoria es, preferentemente, un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo ratones y ratas). Preferentemente, el paciente es un paciente humano. Los términos "sujeto", "paciente" e "individuo" pueden utilizarse intercambiabilmente en la presente memoria.

Según la presente invención, el paciente que debe someterse a ensayo sufre de insuficiencia cardíaca. La expresión "insuficiencia cardíaca" es bien conocida de la técnica. Tal como se utiliza el término en la presente memoria, se refiere a una función alterada del corazón que está acompañada de síntomas de insuficiencia cardíaca tal como se conocida por el experto en la materia. De acuerdo con lo anterior, el paciente preferentemente sufre de insuficiencia cardíaca sintomática. De acuerdo con lo anterior, el paciente sufrirá de insuficiencia cardíaca avanzada. Se encuentra particularmente contemplado que la expresión "insuficiencia cardíaca" tal como se utiliza en la presente memoria se refiera al estadio C y/o D de la clasificación ACC/AHA o a la clase III y/o IV de la clasificación NYHA. En dichos estadios, el paciente muestra síntomas típicos de insuficiencia cardíaca, es decir, el paciente aparentemente no es sano. El paciente que presenta insuficiencia cardíaca y que se clasifica en el estadio C o D ha experimentado cambios estructurales y/o funcionales no reversibles permanentes en el miocardio y, como consecuencia de estos cambios, una restauración completa de la salud no resulta posible.

La clasificación ACC/AHA es una clasificación de la insuficiencia cardíaca desarrollada por la American College of Cardiology y la American Heart Association (ver J. Am. Coll. Cardiol. 38:2101-2113, 2001, actualizada en 2005, ver J. Am. Coll. Cardiol. 46:e1-e82, 2005). Se han definido cuatro estadios: A, B, C y D. Los estadios A y B no son de insuficiencia cardíaca (IC) sino que se considera que ayudan a identificar los pacientes precozmente, antes de desarrollar "verdaderamente" la IC. Los pacientes de estadios A y B se definen mejor como aquellos pacientes con factores de riesgo de desarrollo de IC. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad arterial coronaria, hipertensión o diabetes mellitus que no muestran función ventricular izquierda (VI) deteriorada o una distorsión geométrica de la cámara se considerarían de estadio A, mientras que los pacientes que son asintomáticos pero demuestran hipertrofia del VI (HVI, un fenómeno en el que las paredes de los ventrículos se engrosan) y/o la función del VI deteriorada se denominarían de estadio B. El estadio C se refiere a pacientes con síntomas actuales o pasados de IC asociada a enfermedad cardíaca estructural subyacente (la mayor parte de los pacientes con IC) y el estadio D se refiere a pacientes con IC verdaderamente refractaria.

Tal como se ha indicado anteriormente, el paciente que debe someterse a ensayo preferentemente sufre de insuficiencia cardíaca de estadio C o D según la clasificación ACC/AHA (ver la cita, anteriormente) y/o de insuficiencia cardíaca NYHA de clase III o IV según la clasificación de NYHA. De esta manera, el paciente sufrirá de una forma más avanzada de insuficiencia cardíaca. También preferentemente, el paciente que debe someterse a ensayo según la presente invención presenta un nivel sérico o plasmático de NT-proBNP superior a aproximadamente 800 pg/ml, más preferentemente superior a aproximadamente 1.000 pg/ml y todavía más preferentemente, superior a aproximadamente 1.200 pg/ml.

La insuficiencia cardíaca tal como se denomina en la presente memoria puede ser insuficiencia cardíaca de cualquier causa. En una realización, la insuficiencia cardíaca se debe a una disfunción sistólica ventricular izquierda (en particular causada por disfunción sistólica ventricular izquierda) De acuerdo con lo anterior, un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca también sufre de disfunción sistólica, en particular disfunción sistólica ventricular izquierda. La expresión "disfunción sistólica" es bien conocida de la técnica. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión preferentemente se refiere a una función de bombeo disminuida del corazón debido a una menor contractilidad del ventrículo.

El paciente que sufre de insuficiencia cardíaca tal como se indica en la presente memoria, en particular, presentará una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) reducida. La expresión "fracción de eyección del ventrículo izquierdo" es bien conocida de la técnica. Un paciente que presenta una FEVI reducida, preferentemente presenta una FEVI inferior a 50%, más preferentemente inferior a 45% y todavía más preferentemente inferior a 40%. Además, se encuentra contemplado que el paciente presenta una FEV inferior a 30%.

Sin embargo, en una realización de la presente invención, el paciente puede presentar una FEVI conservada (p.ej. superior a 50%). En el caso de que el paciente presente una FEVI conservada, el paciente preferentemente por insuficiencia cardíaca estadio A, B o C según la clasificación ACC/AHA y/o por insuficiencia cardíaca NYHA clase I, II o III según la clasificación de NYHA. Un paciente que presenta una FEVI conservada, preferentemente presenta una FEVI superior a 50%, más preferentemente superior a 55% y todavía más preferentemente superior a 60%. En el caso de que presente una FEVI conservada, se encuentra, p.ej., contemplado que se diagnostique o grade un parámetro tal como se indica en el Ejemplo 2.

Cómo evaluar la FEVI es bien conocido de la técnica. En una realización, la FEVI puede determinarse tal como se indica en las Directrices, ver la cita anteriormente (McMurray, ver, p.ej., la página 1.800 y siguientes).

En una realización, el paciente presenta un cardioversor-desfibrilador implantado.

En el caso de que se grade la disfunción diastólica, o en el caso de que se grade por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica, el paciente que debe someterse a ensayo sufrirá de dicha disfunción diastólica o de dicha o dichas anomalías estructurales o funcionales asociadas a disfunción diastólica.

Preferentemente, el paciente según los métodos, usos, kits y dispositivos de la presente invención presentará (es decir, sufrirá de) hipertrofia del ventrículo izquierdo. De esta manera, el paciente presentará una masa incrementada del ventrículo izquierdo.

La expresión "hipertrofia ventricular izquierda" es bien conocida de la técnica. Puede encontrarse una visión general detallada sobre la hipertrofia ventricular izquierda en, p.ej., libros de texto estándares (ver Swamy Curr. Cardiol. Rep. 12:277-281, 2010). La HVI puede detectarse mediante electrocardiografía, ecocardiografía o imágenes de resonancia magnética (IRM) cardíaca. Preferentemente, la HVI se detecta mediante ecocardiografía. Además, los criterios de diagnóstico de la HVI son bien conocidos de la técnica (Mancia et al., European Heart J. 28: 1462, 2007; Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt - Wolfgang Gerok - 2007, página 293., Swamy Curr. Cardiol. Rep. 12:277-282, 2010).

El diagnóstico de HVI preferentemente incluye mediciones del diámetro del septo, grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo y diámetro diastólico final con cálculo de la masa del ventrículo izquierdo según fórmulas conocidas de la técnica. Los criterios particularmente preferentes para el diagnóstico de la HVI y para la determinación del índice de masa ventricular izquierda se dan a conocer, p.ej., en las directrices (Mancia et al., European Heart J. 28: 1462, 2007).

Preferentemente, se utilizan los criterios de voltaje de Cornell, los criterios de producto de Cornell, los criterios de voltaje de Sokolow-Lyon o el sistema de puntuación por puntos de Romhilt-Estes (Mancia et al., European Heart J. 28: 1462, 2007).

La expresión "hipertrofia ventricular izquierda" (abreviadamente "HVI") tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente se refiere a un engrosamiento de las paredes de los ventrículos. La HVI preferentemente es una respuesta a una carga de trabajo crónicamente incrementada sobre el corazón. La HVI se observa en pacientes que sufren de hipertensión arterial y es una enfermedad que requiere tratamiento.

Preferentemente, un paciente masculino sufre de HVI en el caso de que la proporción de masa del ventrículo izquierdo a superficie corporal sea superior a 112 g/m^2 , o más preferentemente, en el caso de que la proporción sea superior a 125 g/m^2 . Preferentemente, un paciente femenino sufre de HVI en el caso de que la proporción de masa del ventrículo izquierdo a superficie corporal sea superior a 89 g/m^2 , o más preferentemente, en el caso de que la proporción sea superior a 110 g/m^2 (ver, p.ej., Drazner M.H., Dries D.L., Peshock R.M., Cooper R.S., Klassen C., Kazi F., Willett D., Victor R.G., Left ventricular hypertrophy is more prevalent in blacks than whites in the general population: the Dallas Heart Study. Hypertension 46:124-129, 2005).

En una realización de la presente invención, el paciente que sufre de HVI presenta un índice de masa del ventrículo izquierdo superior a 126 g/m^2 . En otra realización de la presente invención, el paciente presenta un índice de masa del ventrículo izquierdo superior a 150 g/m^2 .

En una realización, el paciente en el contexto de la presente invención no presenta una función renal alterada. Preferentemente, el paciente no sufre de insuficiencia renal, en particular el paciente no sufre de insuficiencia renal aguda, crónica y/o de estadio terminal. Además, el paciente, preferentemente, no sufre de hipertensión renal. Cómo evaluar si un paciente muestra una función renal alterada es bien conocido de la técnica. Los trastornos renales pueden diagnosticarse mediante cualesquiera medios conocidos y que se consideren apropiados. Particularmente, la función renal puede evaluarse mediante la tasa de filtración glomerular (TFG). Por ejemplo, la TFG puede calcularse utilizando la fórmula de Cockcroft-Gault o la fórmula MDRD (Levey, Annals of Internal Medicine, 461-470, 1999). La TFG es el volumen de líquido filtrado por los capilares glomerulares renales en su paso a la cápsula de Bowman por unidad de tiempo. Clínicamente lo anterior es utilizado con frecuencia para determinar la función renal. La TFG fue estimada originalmente (la TFG no puede determinarse nunca; todos los cálculos derivados de fórmulas tales como la fórmula de Cockcroft-Gault de la fórmula MDRD proporcionan únicamente estimaciones y no la TFG "real") mediante la inyección de inulina en el plasma. Debido a que la inulina no es reabsorbida por el riñón tras la filtración glomerular, su tasa de excreción es directamente proporcional a la tasa de filtración del agua y los solutos a través del filtro glomerular. Sin embargo, en la práctica clínica para medir la TFG se utiliza la eliminación de la creatinina. La creatinina es una molécula endógena, sintetizada en el cuerpo, que es libremente filtrada por el glomérulo (aunque también es secretada por los túbulos renales en cantidades muy reducidas). Por lo tanto, la eliminación de la creatinina (ECr) es una aproximación ajustada de la TFG. La TFG típicamente se expresa en

mililitros por minuto (ml/min). El intervalo normal de la TFG para hombres es de 97 a 137 ml/min; el intervalo normal de TFG para mujeres es de 88 a 128 ml/min. De esta manera, se encuentra particularmente contemplado que la TFG de un paciente que no muestra una función renal alterada se encuentre comprendida dentro de dicho intervalo. Además, dicho sujeto preferentemente presenta un nivel de creatinina en sangre (en particular un nivel de creatinina en el suero) inferior a 0,9 mg/dl, más preferentemente inferior a 1,1 mg/dl y todavía más preferentemente inferior a 1,3 mg/dl.

El término "muestra" se refiere a una muestra de un líquido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o de un órgano. Las muestras de líquidos corporales pueden obtenerse mediante técnicas bien conocidas y entre ellas se incluyen muestras de sangre, plasma, suero, orina, líquido linfático, esputo, ascites, o cualquier otra secreción corporal o derivado de la misma. Las muestras de tejidos u órganos pueden obtenerse de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. Las células separadas pueden obtenerse de líquidos corporales o de los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como la centrifugación o la separación celular. P.ej., las muestras de células, tejidos u órganos pueden obtenerse de aquellas células, tejidos u órganos que expresan o producen el biomarcador. La muestra puede estar congelada, ser fresca, fijada (p.ej. fijada con formalina), centrifugada y/o incluida (p.ej. incluida en parafina), etc. La muestra celular puede, evidentemente, someterse a una diversidad de técnicas post-recolección bien conocidas de preparación y almacenamiento (p.ej. la extracción de ácidos nucleicos y/o proteínas, la fijación, el almacenamiento, la congelación, la ultrafiltración, la concentración, la evaporación, la centrifugación, etc.) antes de evaluar el nivel del marcador en la muestra. De manera similar, también pueden someterse biopsias a técnicas post-recolección de preparación y almacenamiento, p.ej. la fijación.

En una realización preferente, la muestra es de sangre, plasma o suero.

El biomarcador proteína 7 de unión a factor de crecimiento (IGFBP7) es bien conocido de la técnica. El biomarcador pertenece al sistema de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP), que desempeña un papel importante en el crecimiento y diferenciación celulares. El sistema comprende dos ligandos: IGF-I e IGF-II, dos receptores, los receptores de IGF de tipo 1 y de tipo 2, y desde 1995, seis proteínas de unión a IGF (IGFBP): IGFBP-1 a -6 (Jones J.I. et al., *Endocr. Rev.* 16:3-34, 1995). Recientemente se ha expandido la familia de IGFBP para incluir las proteínas relacionadas con IGFBP (IGFBP-rP), que presentan similitudes estructurales significativas con las IGFBP (Hwa V. et al., *Endocr. Rev.* 20:761-787, 1999). De esta manera, la superfamilia de las IGFBP incluye seis IGFBP convencionales, que presentan una afinidad elevada para las IGF y por lo menos 10 IGFBP-rP, que no sólo comparten el dominio aminoterminal conservado de las IGFBP sino que también muestran cierto grado de afinidad para las IGF y la insulina. Las IGFBP-rP son un grupo de proteínas ricas en cisteína que controlan diversas funciones celulares, tales como el crecimiento celular, y la adhesión y migración celulares, y la síntesis de la matriz extracelular. Además, dichas proteínas podrían participar en procesos biológicos como la proliferación y diferenciación de los tejidos, la reproducción, la angiogénesis, la reparación de heridas, la inflamación, la fibrosis y la tumorigénesis (Hwa V. et al., *Endocr. Rev.* 20:761-787, 1999).

La proteína 7 de unión a IGF (=IGFBP7) es una glucoproteína modular de 30 kDa que es conocido que es secretada por las células endoteliales, las células de músculo liso vasculares, los fibroblastos y las células epiteliales (Ono Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 202:1490-1496, 1994). En la literatura dicha molécula también se ha denominado FSTL2; IBP 7; proteína I relacionada con la proteína de unión a IGF; IGFBP 7v; IGFBP rPI; IGFBP7; IGFBPRP1; proteína 7 de unión a factor de crecimiento similar a la insulina; precursor de la proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; MAC25; proteína MAC25; factor estimulante de PGI2 y PSF o factor estimulante de la prostaciclina. Los estudios con transferencia northern revelan una amplia expresión de dicho gen en tejidos humanos, incluyendo el corazón, cerebro, placenta, hígado, músculo esquelético y páncreas (Oh Y. et al., *J. Biol. Chem.* 271:30322-30325, 1996).

IGFBP7 ha sido identificado inicialmente con un gen expresado diferencialmente en las células epiteliales leptomeníngicas y mamas normales, en comparación con sus células tumorales correspondientes y ADNc asociado a meningioma nombrado (MAC25) (Burger A.M. et al., *Oncogene* 16:2459-2467, 1998). La proteína expresada se purificó independientemente como factor de adhesión derivado de tumor (posteriormente renombrado como angiomodulina) (Sprenger C.C. et al., *Cancer Res.* 59:2370-2375, 1999) y como factor estimulante de prostaciclina (Akaogi K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8384-8389, 1996). Se ha informado adicionalmente como T1A12, un gen regulado negativamente en los carcinomas de mama (StCroix B. et al., *Science* 289:1197-1202, 2000).

Preferentemente, el término "IGFBP7" se refiere a IGFBP7 humana. La secuencia de la proteína es bien conocida de la técnica y es accesible mediante, p.ej., GenBank (NP_001240764.1). IGFBP7, tal como se utiliza en la presente memoria, preferentemente comprende también variantes de los polipéptidos IGFBP7 específicos.

El término "medir" el nivel de los biomarcadores, en particular un polipéptido, tal como se indica en la presente memoria se refiere a la cuantificación del biomarcador, p.ej. para determinar el nivel del biomarcador en la muestra, utilizando métodos apropiados de detección descritos en otro sitio en la presente memoria. Los términos "medir" y

"determinar" pueden utilizarse intercambiamente en la presente memoria. Lo mismo resulta de aplicación a los términos "nivel" y "cantidad".

5 En una realización, el nivel del biomarcador se mide mediante la puesta en contacto de la muestra con un agente de detección que se une específicamente al marcador respectivo, formando de esta manera un complejo entre el agente y dicho marcador, la detección del nivel de complejo formado y, de esta manera, la medición del nivel de dicho marcador.

10 Los biomarcadores tal como se denominan en la presente memoria pueden detectarse utilizando métodos generalmente conocidos de la técnica. Los métodos de detección generalmente comprenden métodos para cuantificar el nivel de un biomarcador en la muestra (método cuantitativo). Preferentemente, el biomarcador es un polipéptido. Es generalmente conocido por el experto en la materia cuáles de los métodos siguientes resultan adecuados para la detección cualitativa y/o cuantitativa de un biomarcador. Las muestras pueden someterse a
 15 ensayo convenientemente para, p.ej., proteínas utilizando transferencias western e inmunoensayos, tales como ELISA, RIA, inmunoensayos basados en fluorescencia, que se encuentran disponibles comercialmente. Entre los métodos adecuados adicionales para detectar el biomarcador se incluyen medir una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido, tal como su masa molecular precisa o el espectro de RMN. Dichos métodos comprenden, p.ej., biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos, tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos cromatográficos. Además, entre los
 20 métodos se incluyen los métodos basados en ELISA de microplacas, inmunoensayos totalmente automatizados o robotizados (disponibles, por ejemplo, de analizadores ElecsysTM), CBA (un ensayo enzimático de unión del cobalto, disponible en, por ejemplo, los analizadores Roche-HitachiTM) y ensayos de aglutinación de látex (disponibles en, por ejemplo, los analizadores Roche-HitachiTM).

25 Para la detección de proteínas biomarcadoras tal como se indica en la presente memoria, se encuentra disponible un amplio abanico de técnicas de inmunoensayo que utilizan dicho formato de ensayo; ver, p.ej., las patentes US nº 4.016.043, nº 4.424.279 y nº 4.018.653. Entre ellas se incluyen los ensayos de tipo 'sandwich' tanto de un solo sitio como de dos sitios de los tipos no competitivos, así como en los ensayos de unión competitiva tradicionales. Entre dichos ensayos se incluyen además la unión directa de un anticuerpo marcado a un marcador diana.

30 Los ensayos de tipo sándwich son de entre los inmunoensayos más útiles y más comúnmente utilizados.

35 Los métodos para medir los fenómenos de electroquimioluminiscencia son bien conocidos. Dichos métodos utilizan la capacidad de algunos complejos metálicos especiales de alcanzar, mediante oxidación, un estado excitado del que se degradan al estado fundamental emitiendo electroquimioluminiscencia. Para una revisión, ver Richter M.M., Chem. Rev. 104:3003-3036, 2004.

40 Los biomarcadores también pueden detectarse mediante métodos generalmente conocidos, entre ellos la espectroscopía de resonancia magnética (espectroscopía de RMN), la cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), la cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM), la cromatografía líquida de alto y ultra-alto rendimiento, HPLC tales como la HPLC de fase inversa, por ejemplo la HPLC de apareamiento de iones con detección dual de longitudes de onda de UV, la electroforesis capilar con detección de la fluorescencia inducida por láser, la cromatografía de intercambio aniónico y detección de fluorescencia y la cromatografía de capa fina.

45 Preferentemente, medir el nivel de un biomarcador tal como se indica en la presente memoria comprende las etapas de (a) poner en contacto una célula capaz de inducir una respuesta celular, la intensidad de la cual es indicativa del nivel del péptido o polipéptido con dicho péptido o polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular. Para medir respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade, preferentemente, a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión medible de un gen informador o la secreción de una sustancia, por ejemplo un péptido, polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia genera una señal de intensidad que se correlaciona con el nivel del péptido o polipéptido.

55 También preferentemente, medir el nivel de un péptido o polipéptido comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica obtenible del péptido o polipéptido en la muestra. Tal como se ha indicado anteriormente, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada a una m/z variable específica para el péptido o polipéptido observada en los espectros de masas o un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

60 La medición del nivel de un péptido o polipéptido puede, preferentemente, comprender las etapas de: (a) poner en contacto el péptido con un agente de unión específico, (b) (opcionalmente) eliminar el agente de unión no unido, (c) medir el nivel de agente de unión unido, es decir, el complejo del agente de unión formado en la etapa (a). Según una realización preferente, dichas etapas de puesta en contacto, eliminación y medición pueden llevarse a cabo con una unidad analizadora del sistema dado a conocer en la presente memoria. Según algunas realizaciones, dichas etapas pueden llevarse a cabo con una única unidad analizadora de dicho sistema o con más de una unidad
 65 analizadora en comunicación operable entre sí. Por ejemplo, según una realización específica, dicho sistema dado a conocer en la presente memoria puede incluir una primera unidad analizadora para llevar a cabo dichas etapas de

puesta en contacto y eliminación y una segunda unidad analizadora, operablemente conectada con dicha primera unidad analizadora mediante una unidad transportadora (por ejemplo, un brazo robótico), que lleva a cabo dicha etapa de medición.

5 El agente de unión unido, es decir, el agente de unión o el complejo de agente de unión/péptido, generará una señal con una intensidad. La unión según la presente invención incluye la unión tanto covalente como no covalente. Un agente de unión según la presente invención puede ser cualquier compuesto, p.ej. un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña que se une al péptido o polipéptido indicado en la presente memoria. Entre los agentes de unión eferentes se incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos, tales como receptores o
10 parejas de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos del mismo que comprenden los dominios de unión para los péptidos, y aptámeros, por ejemplo ácidos nucleicos o aptámeros peptídicos. Los métodos para preparar dichos agentes de unión son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también es ofrecida por proveedores comerciales. Al experto en la materia le resultarán familiares los métodos para desarrollar derivados de dichos agentes de unión de afinidad o especificidad más elevada. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. A
15 continuación, dichos derivados pueden someterse a ensayo para la unión según los procedimientos de cribado conocidos de la técnica, por ejemplo la expresión fágica. Entre los anticuerpos a los que se hace referencia en la presente memoria se incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como los fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unirse a antígenos o haptenos. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos híbridos humanizados, en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que muestre una especificidad de antígeno deseado se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donantes habitualmente incluyen por lo menos los residuos aminoácidos de unión a antígeno del donante aunque también pueden comprender otros residuos aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos
20 híbridos pueden prepararse mediante varios métodos bien conocidos de la técnica. Preferentemente, el agente de unión se une específicamente al péptido o polipéptido. La unión específica según la presente invención se refiere a que el ligando o agente no debe unirse sustancialmente ("reaccionar cruzadamente") con otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra que debe analizarse. Preferentemente, el péptido o polipéptido unido específicamente debe unirse con una afinidad por lo menos 3 veces más alta, más preferentemente por lo menos 10
30 veces más alta y todavía más preferentemente por lo menos 50 veces más alta, que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, en caso de que todavía pueda distinguirse y medirse inequívocamente, por ejemplo según su tamaño en una transferencia western, o por su abundancia relativamente más alta en la muestra. La unión del agente de unión puede medirse mediante cualquier método conocido de la técnica. Preferentemente, dicho método es semicuantitativo o cuantitativo. A continuación, se describen técnicas adecuadas adicionales para la determinación de un polipéptido o péptido.

La unión de un agente de unión puede medirse directamente, p.ej. mediante RMN o resonancia del plasmón superficial. La medición de la unión de un agente de unión, según realizaciones preferentes, se lleva a cabo con una
40 unidad analizadora de un sistema dado a conocer en la presente memoria. Después, puede calcularse un nivel de la unión medida utilizando un dispositivo informático de un sistema dado a conocer en la presente memoria. En el caso de que el agente de unión también sirva de sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse un producto de la reacción enzimática (por ejemplo, puede medirse el nivel de una proteasa mediante la medición e la cantidad de sustrato cortado, por ejemplo en una transferencia western). Alternativamente, el agente de unión puede mostrar propiedades enzimáticas él mismo y el complejo de agente de unión/péptido o polipéptido o el agente de unión que se une al péptido o polipéptido, respectivamente, pueden ponerse en contacto con un sustrato adecuado, permitiendo la detección mediante la generación de una señal con una intensidad. Para la medición de productos de reacción enzimática, preferentemente el nivel de sustrato es saturante. El sustrato también puede marcarse con un marcaje detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca un nivel de producto detectable, preferentemente medible. En lugar de medir el nivel del producto, puede medirse el tiempo necesario para la aparición de un nivel dado (p.ej. detectable) de producto. En tercer lugar, el agente de unión puede acoplarse covalentemente o no covalentemente con un marcaje, permitiendo la detección y la medición del agente de unión. El marcaje puede llevarse a cabo mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcaje directamente (covalente o no covalentemente) con el agente de unión. El marcaje indirecto implica la unión (covalente o no covalente) de un agente de unión secundario al primer agente de unión. El agente de unión secundario debería unirse específicamente al primer agente de unión. Dicho agente de unión secundario puede acoplarse con un marcaje adecuado y/o ser la diana (receptor) del agente de unión terciario de unión al agente de unión secundaria. La utilización de agentes de unión secundarios, terciarios o incluso de orden superior con frecuencia se lleva a cabo
60 para incrementar la señal. Entre los agentes de unión secundarios y de orden más alto adecuados pueden incluirse anticuerpos, anticuerpos secundarios y el bien conocido sistema de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El agente de unión o sustrato también puede "etiquetarse" con una o más etiquetas tal como es conocido de la técnica. Dichas etiquetas en este caso pueden ser dianas de agentes de unión de orden más alto. Entre las etiquetas adecuadas se incluyen biotina, digoxigenina, etiqueta de His, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, etiqueta myc, hemaglutinina de virus de la influenza A (HA), proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta preferentemente se encuentra en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Son marcajes

adecuados cualesquiera marcajes detectables mediante un método de detección apropiado. Entre los marcajes típicos se incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridán, luminol, rutenio, marcajes enzimáticamente activos, marcajes radioactivos, marcajes magnéticos (por ejemplo "perlas magnéticas", incluyendo marcajes paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcajes fluorescentes. Entre los marcajes enzimáticamente activos se incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de los mismos. Entre los sustratos adecuados para la detección se incluyen diaminobencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP, (cloruro de nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como solución madre lista para utilizar, de Roche Diagnostics), CDP-StarTM (Amersham Biosciences), ECFTM (Amersham Biosciences). Una combinación de enzima-sustrato adecuada puede resultar en un producto de reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que puede medirse según métodos conocidos de la técnica (por ejemplo, utilizando una película fotosensible o un sistema de cámaras adecuado). Respecto a la medición de la reacción enzimática, los criterios proporcionados anteriormente se aplican análogamente. Entre los marcajes fluorescentes típicos se incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo Texas, fluoresceína y los pigmentos Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Se encuentran disponibles marcajes fluorescentes adicionales, por ejemplo de Molecular Probes (Oregon). También se encuentra contemplada la utilización de puntos cuánticos a modo de marcajes fluorescentes. Puede detectarse un marcaje radioactivo mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo una película fotosensible o una placa de fósforo fotoestimulable ("Phosphorimager").

El nivel de un péptido o polipéptido puede determinarse, también preferentemente, de la manera siguiente: (a) puesta en contacto de un soporte sólido que comprende un agente de unión para el péptido o polipéptido tal como se ha especificado anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) medición del nivel de péptido o polipéptido que se une al soporte. El agente de unión, preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, preferentemente se encuentra presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para preparar soportes sólidos son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, entre otros, materiales de columna disponibles comercialmente, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, hojas, duracitos, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El agente de unión o agente puede unirse a muchos portadores diferentes. Entre los ejemplos de portadores bien conocidos se incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nilón, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita.

La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, interacciones iónicas, hidrofóbicas, covalentes y similares. También se encuentra contemplada la utilización de "matrices en suspensión" como matrices según la presente invención (Nolan, Trends Biotechnol. 20(1):9-12, 2002). En dichas matrices en suspensión, el portador, por ejemplo una microperla o microesfera, se encuentra presente en suspensión. La matriz consiste en diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que portan diferentes agentes de unión. Los métodos para producir dichas matrices, por ejemplo basadas en la química de fase sólida y los grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.744.305).

En una realización de la presente invención, los niveles de los biomarcadores tal como se denominan en la presente memoria se miden mediante la utilización de los ensayos descritos en la sección de Ejemplos.

En otra realización del método de la presente invención, la medición en las etapas a) y b) puede llevarse a cabo mediante una unidad analizadora, en particular mediante una unidad analizadora tal como se define en otro sitio de la presente memoria.

La expresión "agente de unión" o "agente de detección" se refiere a una molécula que comprende una fracción de unión que se une específicamente al biomarcador respectivo correspondiente. Son ejemplos de "agente de unión" o "agente de detección", un aptámero, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido péptido-nucleico (APN) o un compuesto químico.

La expresión "unión específica" o "de unión específica" se refiere a una reacción de unión en la que moléculas de pareja de unión muestran unión entre sí bajo condiciones en las que no se unen significativamente a otras moléculas.

La expresión "unión específica" o "se une específicamente", en referencia a una proteína o péptido como agente de unión, se refiere a una reacción de unión en la que un agente de unión se une a la molécula diana correspondiente con una afinidad de por lo menos 10^{-7} M. La expresión "unión específica" o "se une específicamente" preferentemente se refiere a una afinidad de por lo menos 10^{-8} M o incluso más preferentemente de por lo menos 10^{-9} M para su molécula diana. El término "específico" o "específicamente" se utiliza para indicar que otras moléculas presentes en las muestras no se unen significativamente al agente de unión específico para la molécula diana. Preferentemente, el nivel de unión a una molécula diferente de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que es sólo 10% o inferior, más preferentemente sólo 5% o inferior de la afinidad para la molécula diana.

La expresión "unión específica" o "se une específicamente", en referencia a un ácido nucleico como agente de unión, se refiere a una reacción de hibridación en la que un agente de unión o una sonda contiene una región hibridante exacta o sustancialmente complementaria a la secuencia diana de interés. Un ensayo de hibridación que se lleve a cabo utilizando el agente de unión o sonda bajo condiciones de hibridación suficientemente restrictivas permite la detección selectiva de una secuencia diana específica. La región hibridante preferentemente presenta una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 35 nucleótidos, más preferentemente de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos. La utilización de bases modificadas o análogos de base que afectan a la estabilidad de hibridación, que son bien conocidos de la técnica, pueden permitir la utilización de sondas más cortas o más largas con una estabilidad comparable. Un agente de unión o una sonda puede consistir enteramente de la región hibridante o puede contener características adicionales que permiten la detección o inmovilización de la sonda pero que no alteran significativamente las características de hibridación de la región hibridante.

La expresión "unión específica" o "se une específicamente", en referencia a un aptámero de ácidos nucleicos como agente de unión, se refiere a una reacción de unión en la que un aptámero de ácidos nucleicos se une a la molécula diana correspondiente con una afinidad en el intervalo de pocos nM a pM.

Son ejemplos de "agentes de unión", "agentes de detección" o "agentes", una sonda de ácidos nucleicos, un cebador de ácidos nucleicos, una molécula de ADN, una molécula de ARN, un aptámero, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido, un ácido péptido-nucleico (APN) o un compuesto químico. Un agente preferente es un anticuerpo que se une específicamente al biomarcador que debe medirse. El término "anticuerpo" en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, con la condición de que muestren la actividad de unión a antígeno deseada. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Otro agente de unión que puede aplicarse, en un aspecto, puede ser un aptámero que se une específicamente a por lo menos un marcador en la muestra. La expresión "unión específica" o "se une específicamente", en referencia a un aptámero de ácidos nucleicos como agente de unión, se refiere a una reacción de unión en la que un aptámero de ácidos nucleicos se une a la molécula diana correspondiente con una afinidad en el intervalo de pocos nM a pM.

En todavía otro aspecto, la muestra se extrae del complejo formado entre el agente de unión y por lo menos un marcador antes de la medición del nivel de complejo formado. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, el agente de unión puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. En todavía otro aspecto, la muestra puede extraerse del complejo formado sobre el soporte sólido mediante la aplicación de una solución de lavado. El complejo formado será proporcional al nivel de por lo menos un marcador presente en la muestra. Se entenderá que la especificidad y/o sensibilidad del agente de unión que debe aplicarse define el grado de proporción de por lo menos un marcador comprendido en la muestra que es capaz de unirse específicamente. También se encuentran en otros sitios de la presente invención información adicional sobre cómo puede llevarse a cabo la determinación. El nivel de complejo formado se transforma en un nivel de por lo menos un marcador que refleja el nivel presente efectivamente en la muestra. Dicho nivel, en un aspecto, puede ser esencialmente el nivel presente en la muestra o puede ser, en otro aspecto, un nivel que es una determinada proporción de la misma debido a la relación entre el complejo formado y el nivel presente en la muestra original.

El término "nivel" tal como se utiliza en la presente memoria comprende la cantidad absoluta de un biomarcador tal como se indica en la presente memoria, la cantidad o concentración relativa de los biomarcadores tal como se indica en la presente memoria, así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona con los mismos o que puede derivarse de los mismos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de señal de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas a partir de dichos péptidos mediante mediciones directas, p.ej. valores de intensidad en los espectros de masas o espectros de RMN. Además, se encuentran comprendidos todos los valores o parámetros que se obtienen mediante mediciones indirectas especificadas en otros sitios de la presente descripción, por ejemplo niveles de respuesta medidos en sistemas biológicos de lectura en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidos de agentes de unión unidos específicamente. Debe entenderse que los valores correlacionados con los niveles o parámetros anteriormente indicados también pueden obtenerse mediante todas las operaciones matemáticas estándares.

El término "comparar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a comparar el nivel de biomarcador o biomarcadores en la muestra del individuo o paciente con el nivel de referencia del biomarcador o biomarcadores especificados en otros sitios en la presente descripción. Debe entenderse que comparar tal como se utiliza en la presente memoria habitualmente se refiere a una comparación de los parámetros o valores correspondientes, p.ej., con una cantidad absoluta con una cantidad de referencia absoluta, mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia o se compara una señal de intensidad obtenida del biomarcador en una muestra con el mismo tipo de señal de una intensidad obtenida de una muestra de referencia. La comparación puede llevarse a cabo manualmente o asistida por ordenador. De esta manera, la comparación puede llevarse a cabo con un dispositivo informático (p.ej. de un sistema dado a conocer en la presente memoria). El valor del nivel medido o

detectado del biomarcador en la muestra del individuo o paciente y el nivel de referencia pueden, p.ej., compararse entre sí y dicha comparación puede llevarse a cabo automáticamente con un programa informático que ejecuta un algoritmo para la comparación. El programa informático que lleva a cabo dicha evaluación proporcionará la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad medida puede compararse con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos con un programa informático. El programa informático puede evaluar adicionalmente el resultado de la comparación, es decir, proporcionar automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado.

El nivel de biomarcador o biomarcadores tal como se indica en la presente memoria se compara con un nivel de referencia (o niveles de referencia). El nivel de referencia tal como se utiliza en la presente memoria permite el diagnóstico, o la gradación de una disfunción o anomalía tal como se indica en la presente memoria (es decir, disfunción diastólica y/o anomalía estructural o funcional asociada a la disfunción diastólica) y, de esta manera, para diferenciar si un paciente sufre de dicha disfunción o anomalía o no (o de una forma leve o severa del mismo).

La cantidad de referencia puede utilizarse para definir y establecer un nivel umbral. El nivel umbral, preferentemente, permite gradar/diagnosticar un paciente tal como se indica en la presente memoria. Dicho diagnóstico o gradación puede ser proporcionado por un dispositivo informático de un sistema dado a conocer en la presente memoria basándose en dicha comparación del "nivel" calculado con una referencia o un umbral. Por ejemplo, un dispositivo informático de un sistema puede proporcionar un indicador en forma de una palabra, símbolo o valor numérico que es indicativo del diagnóstico o gradación. El nivel de referencia aplicable a un paciente individual puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos, tales como la edad, el género o la subpoblación, así como de los medios utilizados para la determinación del polipéptido o péptido indicado en la presente memoria. Puede determinarse un nivel de referencia adecuada a partir de una muestra de referencia que debe analizarse conjuntamente, es decir simultáneamente o seguidamente, con la muestra de ensayo.

Los niveles de referencia pueden, en principio, calcularse para una cohorte de pacientes que sufre de una disfunción o de por lo menos una anomalía (tal como se indica en la presente memoria) o que no sufren de dicha disfunción o de por lo menos una anomalía tal como se ha especificado anteriormente, basándose en la media o valores medios de un biomarcador dado mediante la aplicación de métodos estadísticos estándares. En particular, la exactitud de un método tal como un método destinado a diagnosticar un suceso, o no, se describe mejor a partir de sus características operativas del receptor (COR) (ver especialmente Zweig, Clin. Chem. 39:561-577, 1993). El gráfico de ROC es un gráfico de todas las parejas de sensibilidad/especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión a lo largo del intervalo completo de datos observados. El rendimiento clínico de un método diagnóstico depende de su precisión, es decir, de su capacidad de asignar correctamente los sujetos a una determinada evaluación, pronóstico o diagnóstico. El gráfico de COR ilustra el solapamiento entre las dos distribuciones a partir de un gráfico de la sensibilidad frente a 1-especificidad para el intervalo completo de umbrales de decisión. En el eje y se encuentra la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos, que se define como la proporción entre el número de resultados de ensayo positivos verdaderos y el número de positivos verdaderos más el número de resultados de ensayo falsos negativos. Lo anterior también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x se encuentra la fracción de falsos positivos, o 1-especificidad, que se define como la proporción entre el número de resultados falsos positivos y el número de negativos verdaderos más el número de resultados falsos positivos. Es un índice de la especificidad y se calcula por completo a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones positivas verdaderas y falsas positivas se calculan completamente por separado, mediante la utilización de los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, el gráfico de COR es independiente de la prevalencia del suceso en la cohorte.

Cada punto del gráfico de COR representa una pareja de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento de las dos distribuciones de los resultados) presenta un gráfico de ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, mientras que la fracción positiva verdadera es 1,0 ó 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados de los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda y la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se encuentra entre ambos extremos. En el caso de que el gráfico de COR se encuentre completamente debajo de la diagonal a 45°, se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor que" a "menor que", o viceversa. Cualitativamente, cuanto más próximo se encuentre el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor será la exactitud global del ensayo. Dependiendo del intervalo de confianza deseado, puede derivarse un umbral a partir de la curva de COR, permitiendo el diagnóstico o predicción de un suceso dado con un correcto equilibrio entre sensibilidad y especificidad, respectivamente. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la referencia que debe utilizarse para el método anteriormente indicado de la presente invención puede ser, preferentemente, un umbral o cantidad de corte y puede generarse, preferentemente, mediante el establecimiento de un COR para dicha cohorte

tal como se ha indicado anteriormente y derivando una cantidad umbral a partir del mismo. Según la sensibilidad y especificidad deseadas para un método diagnóstico, el gráfico de COR permite derivar umbrales adecuados.

Los niveles de referencia son bien conocidos de la técnica y pueden ser determinados por el experto en la materia sin ningún otro procedimiento. En una realización, la expresión "nivel de referencia" se refiere a un valor predeterminado. Tal como apreciará el experto en la materia, el nivel de referencia está predeterminado y se ha fijado para satisfacer requisitos rutinarios en términos de, p.ej. especificidad y/o sensibilidad. Estos requisitos pueden variar, p.ej. según el organismo regulador. Puede ocurrir, por ejemplo, que la sensibilidad o la especificidad del ensayo, respectivamente, deban fijarse en determinados límites, p.ej. 80%, 90%, 95% o 98%, respectivamente. Dichos requisitos también pueden definirse en términos de valores predictivos positivos o negativos. Sin embargo, basándose en las enseñanzas proporcionadas en la presente invención, en todo caso será posible para el experto en la materia alcanzar un nivel de referencia que satisfaga dichos requisitos. Preferentemente, el nivel de referencia se deriva de pacientes que sufren de una enfermedad o anomalía tal como se indica en la presente memoria (es decir, disfunción diastólica y/o anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica) o de una forma severa o leve de la misma (en el caso de que se realice la gradación). Además, preferentemente, el nivel de referencia se deriva de pacientes que no sufren de una enfermedad o anomalía tal como se indica en la presente memoria (es decir, disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica) o de una forma severa o leve de la misma (en el caso de que se realice la gradación).

El nivel de referencia en una realización ha sido predeterminado en muestras de referencia de la entidad de enfermedad a la que pertenece el paciente. En determinadas realizaciones, el nivel de referencia puede, p.ej., fijarse en cualquier porcentaje entre 25% y 75% de la distribución global de los valores en una entidad de enfermedad investigada. En otras realizaciones, el nivel de referencia puede, p.ej., fijarse en la mediana, terciles o cuartiles determinados de la distribución global de los valores en muestras de referencia de una entidad de enfermedad investigada. En una realización, el nivel de referencia se fija en el valor de la mediana según se determina a partir de la distribución global de los valores en una entidad de enfermedad investigada. El nivel de referencia puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos, tales como la edad, el género o la subpoblación, así como de los medios utilizados para la determinación del IGFBP7 indicado en la presente memoria. En una realización, la muestra de referencia es de esencialmente el mismo tipo de fuente de células, tejidos, órganos o líquido corporal que la muestra del individuo o paciente sometido al método de la invención, p.ej. en el caso de que según la invención se utilice sangre como muestra para determinar el nivel de IGFBP7 en el individuo, también se determina el nivel de referencia en sangre o una parte de la misma.

Debe entenderse que el nivel de referencia que debe aplicarse en relación al diagnóstico tal como se indica en la presente memoria puede ser diferente del nivel de referencia que debe aplicarse para la gradación. P.ej., el nivel de referencia para el diagnóstico puede ser inferior que para la gradación. Sin embargo, lo anterior será tenido en cuenta por el experto en la materia. De esta manera, para diagnosticar una disfunción diastólica o por lo menos una anomalía tal como se indica en la presente memoria, se aplica un nivel de referencia que permite diagnosticar dicha disfunción diastólica o dicha anomalía o anomalías, mientras que, para gradar una disfunción diastólica o por lo menos una anomalía, se aplica un nivel de referencia que permite la gradación de dicha disfunción diastólica o dicha por lo menos una anomalía.

Los niveles de referencia preferentes para IGFBP7 que deben aplicarse según la presente invención se encuentran comprendidos en un intervalo de entre aproximadamente 100 y 140 ng/ml, en particular entre aproximadamente 110 y aproximadamente 130 ng/ml, o entre aproximadamente 115 y aproximadamente 120 ng/ml. Dependiendo del ensayo aplicado para la determinación de IGFBP7, los niveles de referencia pueden ser diferentes. Lo anterior será tenido en cuenta por el experto en la materia.

Preferentemente, el término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria comprende un intervalo de + y -20%, más preferentemente un intervalo de + y -10%, todavía más preferentemente un intervalo de + y -5%, y lo más preferentemente, un intervalo de + y -2% respecto a la cantidad específica, p.ej. la indicación de una cantidad de "aproximadamente 100" pretende comprender una cantidad en un intervalo de 80 a 120. Además, el término "aproximadamente" se refiere a la cantidad exacta. Preferentemente, los niveles se miden tal como se indica en los Ejemplos.

Lo siguiente se aplica como algoritmo diagnóstico, en el caso de que se realice un diagnóstico. Preferentemente,

- a) un nivel de IGFBP7 superior al nivel de referencia indica que el paciente sufre de disfunción diastólica y/o dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica, y/o
- b) un nivel de IGFBP7 inferior al nivel de referencia indica que el paciente no sufre de disfunción diastólica y/o dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica.

Lo siguiente se aplica como algoritmo diagnóstico, en el caso de que se realice una gradación. Preferentemente,

a) un nivel de IGFBP7 superior al nivel de referencia indica que el paciente sufre de una forma severa de disfunción diastólica y/o de una forma severa de dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica, y/o

b) un nivel de IGFBP7 inferior al nivel de referencia indica que el paciente sufre de una forma leve de disfunción diastólica y/o de una forma leve de dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica.

En determinadas realizaciones, la expresión "superior al nivel de referencia" se refiere a un nivel del biomarcador en la muestra del individuo o paciente superior al nivel de referencia o a un incremento global de 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o superior, determinado mediante los métodos descritos en la presente memoria, en comparación con el nivel de referencia. En determinadas realizaciones, el término incremento se refiere al incremento del nivel de biomarcador en la muestra del individuo o paciente, en el que el incremento es por lo menos aproximadamente 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 o 100 veces superior al nivel de referencia, p.ej. predeterminado a partir de una muestra de referencia.

En determinadas realizaciones, el término "reducción" o "inferior" en la presente memoria se refiere a un nivel del biomarcador en la muestra del individuo o paciente inferior al nivel de referencia o a una reducción global de 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior, determinado mediante los métodos descritos en la presente memoria, en comparación con el nivel de referencia. En determinadas realizaciones, el término reducción del nivel de biomarcador en la muestra del individuo o paciente, en el que el nivel reducido es como máximo aproximadamente 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 o 0,01 veces el nivel de referencia, p.ej. predeterminado a partir de una muestra de referencia, o inferior.

En una realización de la presente invención, el nivel de por lo menos un biomarcador adicional se mide en la muestra del paciente y se compara con un nivel de referencia (adecuado) (para dicho por lo menos un biomarcador adicional). En una realización, el por lo menos un marcador adicional se selecciona de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mímecán, ácido úrico y GDF15 (factor 15 de diferenciación del crecimiento). La determinación de por lo menos un biomarcador adicional permite una evaluación más fiable de la disfunción diastólica y/o de por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico y/o gradación de la disfunción diastólica y/o de por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a la disfunción diastólica en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, comprendiendo dichos métodos las etapas de:

a) medir el nivel de IGFBP7 (proteína 7 de unión a factor de crecimiento similar a la insulina) y el nivel o niveles de por lo menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mímecán, ácido úrico y GDF15 en una muestra de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, y

b) comparar el nivel de IGFBP7 y el nivel o niveles de por lo menos un biomarcador adicional medido en a) con un nivel de referencia.

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en un organismo sujeto. El nombre de IUPAC es 7,9-dihidro-3H-purín-2,6,8-triona. El compuesto frecuentemente también se denomina urato, ácido lítico, 2,6,8-trioxipurina, 2,6,8-trihidroxipurina, 2,6,8-trioxopurina, 1H-purina-2,6,8-triol (compuesto de fórmula $C_5H_4N_4O_3$, PubChem CID 1175, número CAS 69-93-2).

Las mediciones del ácido úrico se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de numerosos trastornos renales y metabólico, incluyendo la insuficiencia renal, la gota, la leucemia, la soriasis, la inanición o otras condiciones de caquexia, y de pacientes que reciben fármacos citotóxicos. La oxidación del ácido úrico proporciona la base para dos enfoques a la determinación cuantitativa de este metabolito purina. Un enfoque es la reducción del ácido fosfotúngstico en una solución alcalina en azul de tungsteno, que se mide fotométricamente. Un segundo enfoque, descrito por Praetorius y Poulson, utiliza el enzima uricasa para oxidar el ácido úrico; este método elimina las interferencias intrínsecas a la oxidación química (Praetorius E., Poulsen H., *Enzymatic Determination of Uric Acid with Detailed Directions*, Scandinv. J. Clin. Lab. Investigation 3:273-280, 1953). La uricasa puede utilizarse en métodos que implican la medición de UV del consumo de ácido úrico o, en combinación con otros enzimas, para proporcionar un ensayo colorimétrico. Otro método es el método colorimétrico desarrollado por Town et al. (Town M.H., Gehm S., Hammer B., Ziegenhorn J., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23:591, 1985). La muestra se incuba inicialmente con una mezcla de reactivos que contiene ascorbato oxidasa y un sistema de lavado. En dicho sistema de ensayo es importante que el ácido ascórbico presente en la muestra resulte eliminado en la reacción preliminar; lo anterior bloquear cualquier interferencia del ácido ascórbico con la reacción posterior del indicador POD. Tras la adición del reactivo iniciador, se inicia la oxidación del ácido úrico por la uricasa. En el caso de que se mida el marcador ácido úrico, el agente de detección que permite medir el marcador puede ser un enzima tal como se ha indicado anteriormente. En este caso, la muestra se pone en contacto con dicho enzima.

En el contexto de la presente invención, el ácido úrico puede determinarse mediante cualquier método que se considere apropiado. Preferentemente, el biomarcador se determina mediante los métodos anteriormente indicados. Más preferentemente, el ácido úrico se determina mediante la aplicación de una ligera modificación del método colorimétrico indicado anteriormente. En la presente reacción, el peróxido reacciona en presencia de peroxidasa (POD), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina (TOOS) y 4-aminofenazona para formar un pigmento quinona-diimina. La intensidad del color rojo formado es proporcional a la concentración del ácido úrico y se determina fotométricamente.

La expresión "troponina cardíaca" comprende además variantes de las troponinas específicas anteriormente indicadas, es decir, preferentemente de troponina I, y más preferentemente, de troponina T. Dichas variantes presentan por lo menos las propiedades biológicas e inmunológicas esenciales de las troponinas cardíacas específicas. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales en el caso de que sean detectables mediante los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en la presente memoria, p.ej. mediante ensayos ELISA utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichas troponinas cardíacas. Además, debe entenderse que una variante a la que se hace referencia según la presente invención presentará una secuencia de aminoácidos que difiere por como mínimo una sustitución, delección y/o adición de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante es todavía, preferentemente, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 92%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98% o por lo menos aproximadamente 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la troponina específica. Las variantes pueden ser variantes alélicas o cualesquiera otros homólogos, parálogos u ortólogos específicos de especie. Además, entre las variantes a las que se hace referencia en la presente memoria se incluyen fragmentos de las troponinas cardíacas específicas o los tipos anteriormente indicados de variantes, con la condición de que dichos fragmentos presenten las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales indicadas anteriormente. Preferentemente, las variantes de troponina cardíaca presentan propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítomos) comparables a las de la troponina T o troponina I humana. De esta manera, las variantes serán reconocibles mediante los medios o ligandos anteriormente indicados que se utilizan para la determinación de la concentración de las troponinas cardíacas. De esta manera, las variantes pueden reconocerse mediante los medios o ligandos anteriormente mencionados utilizados para la determinación de la concentración de las troponinas cardíacas. Dichos fragmentos pueden ser, p.ej., productos de degradación de las troponinas. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones post-traduccionales, tales como la fosforilación o la miristilación. Preferentemente, la propiedad biológica de la troponina I y su variante es la capacidad de inhibir la actomiosina ATPasa o de inhibir la angiogénesis in vivo e in vitro, que puede, p.ej., detectarse basándose en el ensayo descrito por Moses et al., PNAS USA 96(6): 2645-2650, 1999). Preferentemente, la propiedad biológica de la troponina T y su variante es la capacidad de formar un complejo con las troponinas C e I, de unirse a iones calcio o de unirse a la tropomiosina, preferentemente en caso de hallarse presente en forma de un complejo de troponina C, I y T o de un complejo formado por troponina C, troponina I y una variante de troponina T. Es conocido que las concentraciones bajas de troponina cardíaca circulante pueden detectarse en los pacientes bajo diversas condiciones, aunque se requieren estudios adicionales para comprender su función y cambios respectivos (Masson et al., Curr. Heart Fail Rep. 7:15-21, 2010).

El marcador endostatina es bien conocido de la técnica. La endostatina fue originalmente aislada a partir de un hemangioendotelioma murino en forma de fragmento proteolítico de 20 kDa del colágeno de tipo XVIII (O'Reilly M.S. et al., Cell 88:277-285, 1997). Los colágenos representan una familia de proteínas de la matriz extracelular con una característica conformación de triple hélice que forma agregados supramoleculares que desempeñan una función básica en el mantenimiento de la integridad estructural de los tejidos. El depósito excesivo de colágeno conduce a fibrosis, alterando el funcionamiento normal de los tejidos circundantes. El colágeno XVIII es un elemento de la familia multiplexina de colágenos con múltiples interrupciones en el dominio de triple hélice central y un dominio único no de triple hélice en el extremo C-terminal principalmente en las membranas basales. La secuencia de la isoforma corta de la cadena alfa1 de tipo humano del colágeno XVIII (SwissProt: P39060) se da a conocer, p.ej., en el documento nº WO2010/124821. La endostatina es liberada de la cadena alfa1 del colágeno XVIII por la acción de diversos enzimas proteolíticos (para más información ver Ortega N. y Web Z., Journal of Cell Science 115:4201-4214, 2002). La endostatina tal como se utiliza en la presente memoria está representada por el fragmento de colágeno XVIII comprendido entre la posición aminoácida 1.337 y la posición aminoácida 1.519 del colágeno XVIII tal como se da a conocer en el documento nº WO2010/124821. La región bisagra en el extremo C-terminal de la cadena alfa del colágeno XVIII contiene varios sitios sensibles a proteasa y varios enzimas, incluyendo la neutrófilo-elastasa, las catepsinas y las metaloproteinasas de matriz, que es conocido que genera endostatina mediante el corte de la cadena de colágeno en dicha región. Dichas proteasas no liberan exclusivamente endostatina sino que también pueden liberar otros fragmentos más grandes que contienen la secuencia de endostatina. Tal como resultará evidente para el experto en la materia, dichos fragmentos más grandes también se miden con un inmunoensayo para la endostatina.

La endostatina es un potente inhibidor de la angiogénesis y el crecimiento de los vasos sanguíneos. La relación entre las redes de la endostatina y de las citoquinas no ha sido definida pero es conocido que la endostatina es capaz de alterar la expresión de un amplio abanico de genes (Abdollahi A. et al., Mol. Cell 13:649-663, 2004).

La endostatina, tal como se utiliza en la presente memoria, preferentemente comprende también variantes de los polipéptidos endostatina específicos. Para una explicación del término "variantes", ver anteriormente.

El mimecán es un pequeño proteoglicano con repeticiones ricas en leucina y un precursor que comprende 298 aminoácidos. Otros nombres del mimecán son OGN, osteoglicina, OG, OIF y SLRR3A.

El mimecán es un elemento de la familia de los proteoglicanos ricos en leucina pequeños secretados (SLRP, por sus siglas en inglés) con proteínas nucleares estructuralmente relacionadas. La característica común compartida por todos los SLRP son las unidades repetidas en tándem ricas en leucina (LRR, por sus siglas en inglés) en la mitad C-terminal de la proteína nuclear. Sin embargo, en la región N-terminal, cada clase de SLRP presenta un dominio único que contiene una agrupación de cisteínas con espaciado conservado denominado dominio N de LRR. Los SLRP de clase III contienen seis carboxil LRR y entre ellos se incluyen el mimecán, el epificán y la opticina.

Algunos estudios funcionales de deficiencias génicas en ratones para elementos de clase I y II, tales como decorina, biglicano, lumecán y fibromodulina, muestran que los ratones deficientes en SLRP muestran un amplio abanico de defectos atribuibles a la fibrilógenesis de colágeno anormal, que sugiere que dichos SLRP desempeñan funciones importantes en el establecimiento y mantenimiento de la matriz de colágeno (Ameye L. y Young M.F., *Glycobiology* 12:107R-116R, 2002). La deficiencia de mimecán de clase III también causa anormalidades en las fibrillas de colágeno (Tasheva E.S. et al., *Mol. Vis.* 8:407-415, 2002).

El miecán es un componente multifuncional de la matriz extracelular. Se une a una diversidad de otras proteínas (IGF2, IKBKG, IFNB1, INSR, CHUK, IKBKB, NFKBIA, IL1 5, Cd3, ácido retinoico, APP, TNF, lipopolisacárido, c-abl oncogén 1, receptor tirosina quinasa, v-src oncogén vírico del sarcoma). Dichas diversas actividades de unión podrían explicar la capacidad del mimecán de ejercer diversas funciones en muchos tejidos.

Se ha encontrado mimecán en córnea, hueso, piel y en otros tejidos. Su patrón de expresión se encuentra alterado en diferentes condiciones patológicas. A pesar de la creciente cantidad de datos sobre la función biológica del mimecán, su función todavía no está clara. Se ha demostrado que el mimecán participa en la regulación de la fibrilógenesis del colágeno, un proceso esencial en el desarrollo, la reparación de tejidos y la metástasis (Tasheva et al., *Mol. Vis.* 8:407-415, 2002). Desempeña una función en la formación de hueso junto con TGF-beta-1 o TGF-beta-2.

La secuencia del polipéptido mimecán humano es bien conocido de la técnica y puede evaluarse, p.ej., mediante el número de acceso de GenBank NP_054776.1 GI:7661704. Además, la secuencia se da a conocer en el documento nº WO2011/012268. El mimecán, tal como se utiliza en la presente memoria, preferentemente comprende también variantes de los polipéptidos mimecán específicos. Para una explicación del término "variantes", ver anteriormente. En el contexto de la presente invención, el mimecán preferentemente se determina tal como se indica en el documento nº WO2011/012268.

La osteopontina (en la presente memoria también denominada "OPN"), también conocida como sialoproteína ósea I (BSP-1 o BNSP), activación temprana de linfocitos T (ETA-1), fosfoproteína secretada 1 (SPP1, 2ar y resistencia a Rickettsia (Ric), es un polipéptido que es una proteína de la matriz extracelular de carga altamente negativa que no presenta una estructura secundaria extensiva. Está compuesto de aproximadamente 300 aminoácidos (297 en el ratón; 314 en el ser humano) y se expresa en forma de una proteína naciente de 33 kDa; también presenta sitios de corte funcionalmente importantes. OPN puede pasar por modificaciones post-traduccionales que incrementan su peso molecular aparente hasta aproximadamente 44 kDa. La secuencia de la osteopontina es bien conocida de la técnica (osteopontina humana: UniProt P10451, GenBank NP_000573.1). La osteopontina se encuentra en el plasma normal, orina, leche y bilis (patente nº US 6.414.219; y nº US 5.695.761; Denhardt, D.T. y Guo, X., *FASEB J.* 7 (1993) 1475-1482; Oldberg A., et al., *PNAS* 83:8819-8823, 1986; Oldberg A., et al., *J. Biol. Chem.* 263:19433-19436, 1988; Giachelli CM., et al., *Trends Cardiovasc. Med.* 5:88-95, 1995). La proteína y ADNc de la OPN humana han sido aislados y secuenciados (Kiefer M.C. et al., *Nucl. Acids Res.* 17:3306, 1989). La OPN funciona en la adhesión celular, la quimiotaxis, e interleuquina-10 dirigida por macrófagos. Es conocido que OPN interactúa con varios receptores de integrina. Se ha informado de la expresión de OPN incrementada en varios cánceres humanos y se han identificado sus receptores afines (integrinas av-b3, av-b5 y av-b1 y CD44). Los estudios in vitro por Irby R.B. Et al., *Clin. Exp., Metastasis* 21:515-523, 2004, indican que tanto la expresión endógena de OPN (mediante transfección estable) como la OPN exógena (añadida al medio de cultivo) potencian la motilidad y capacidad invasiva de las células de cáncer de colon humano in vitro.

La expresión "factor 15 de diferenciación del crecimiento" o "GDF-15" se refiere a un polipéptido que es un elemento de la superfamilia de citoquinas del factor de crecimiento transformante (FCT). Los términos polipéptido, péptido y proteína se utilizan intercambiamente en toda la presente memoria. GDF-15 se clonó originalmente como citoquina 1 inhibidora de macrófagos y después también se identificó como factor 15 de crecimiento transformante placentario, proteína morfogenética ósea placentaria, gen 1 activado por fármaco antiinflamatorio no esteroideo y factor derivado de la próstata (Bootcov loc. Cit.; Hromas, *Biochim. Biophys. Acta* 1354:40-44, 1997; Lawton *Gene* 203:17-26, 1997; Yokoyama-Kobayashi, *J. Biochem.(Tokyo)* 122:622-626, 1997; Paralkar, *J. Biol. Chem.* 273:13760-13767, 1998). De manera similar a otras citoquinas relacionadas con FCT, GDF-15 se sintetiza en forma de una

proteína precursora inactiva que experimenta homodimerización unida mediante disulfuros. Tras el corte proteolítico del propéptido N-terminal, se secreta GDF-15 en forma de una proteína dimérica ~28 kDa (Bauskin, Embo J. 19:2212-2220, 2000). Las secuencias de aminoácidos de GDF-15 se dan a conocer en los documentos nº WO99/06445, nº WO00/70051 y nº WO2005/113585, Bottner, Gene 237: 105-111, 1999, Bootcov, *loc. cit.*, Tan. *loc. cit.*, Baek, Mol. Pharmacol. 59: 901-908, 2001, Hromas *loc. cit.*, Paralkar *loc. cit.*, Morrish 1996, Placenta 17:431-441 or Yokoyama-Kobayashi *loc. cit.*, GDF-15 tal como se utiliza en la presente memoria comprende además variantes de los polipéptidos GDF-15 específicos anteriormente indicados.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "péptidos de tipo BNP" comprende pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP y BNP. El pre-propéptido (134 aminoácidos en el caso de pre-proBNP) comprende un péptido de señal corto que es escindido enzimáticamente para liberar el propéptido (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El propéptido se corta adicionalmente en un propéptido N-terminal (NT-propéptido, 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de BNP). Preferentemente, los péptidos de tipo BNP según la presente invención son NT-proBNP, BNP y variantes de los mismos. BNP es la hormona activa y presenta una semivida más corta que la contrapartida inactiva respectiva, NT-proBNP. El BNP es metabolizado en la sangre, mientras que NT-proBNP circula en la sangre en forma de una molécula intacta y sin modificación es eliminada renalmente. La semivida in vivo de NT-proBNP es 120 min más larga que la de la PNC, que es de 20 min (Smith, J. Endocrinol. 167: 239-46, 2000). La preanalítica es más robusta con NT-proBNP, permitiendo un fácil transporte de la muestra a un laboratorio central (Mueller, Clin. Chem. Lab. Med. 42: 942-4, 2004). Pueden almacenarse las muestras de sangre a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o embarcarse sin pérdidas. En contraste, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C conduce a una pérdida de concentración de por lo menos 20% (Mueller *loc. cit.*; Wu, Clin. Chem. 50: 867-73, 2004). Por lo tanto, dependiendo del curso temporal o propiedades de interés, la medición de las formas activas o inactivas del péptido natriurético puede resultar ventajosa. Los péptidos natriuréticos más preferentes según la presente invención son NT-proBNP o variantes del mismo. Tal como se ha comentado brevemente antes, el NT-proBNP humano, al que se hace referencia según la presente invención, es un polipéptido que comprende, preferentemente, 76 aminoácidos de longitud correspondiente a la parte N-terminal de la molécula de NT-proBNP humana. La estructura de BNP y NT-proBNP humanas ya ha sido descrita en detalle en la técnica anterior, p.ej. en los documentos nº WO 02/089657 y nº WO 02/083913, o Bonow, *loc. cit.* Preferentemente, NT-proBNP humano tal como se utiliza en la presente memoria es NT-proBNP humano tal como se da a conocer en la patente nº EP 0 648 228 B1. Dichos documentos de la técnica anterior se incorporan como referencia en la presente memoria con respecto a las secuencias específicas de NT-proBNP y variantes de la misma dadas a conocer en ellos. El NT-proBNP al que se hace referencia según la presente invención comprende además variantes alélicas y otras variantes de dicha secuencia específica para el NT-proBNP humano comentado anteriormente. Específicamente, se encuentran contemplados polipéptidos variantes que al nivel de los aminoácidos preferentemente son 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticos a NT-proBNP humano, preferentemente a lo largo de la longitud completa de NT-proBNP humano. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse tal como se ha indicado anteriormente.

Se dan a conocer combinaciones preferentes de dos biomarcadores (es decir, de IGFBP7 y un biomarcador adicional) en el Ejemplo 2, posteriormente.

Además, las combinaciones siguientes resultan útiles:

IGFBP7 + una troponina cardíaca
 IGFBP7 + un péptido de tipo BNP
 IGFBP7 + mimecán u osteopontina
 IGFBP7 + endostatina.

Tal como se muestra en el Ejemplo 2, los marcadores anteriormente indicados mostraban una correlación particularmente fuerte con E/E' aunque también con otros parámetros.

Una combinación de IGFBP-7 y una troponina cardíaca (tal como troponina T) y/o GDF15 y/o ácido úrico puede utilizarse para la gradación/diagnóstico de la disfunción diastólica y varias anormalidades tal como se indica en la presente memoria.

Además, resulta ventajoso combinar IGFBP7 y ácido úrico para las anormalidades tamaño incrementado de VI, iVAI incrementado y/o proporción E/A transmitral incrementada.

Además, resulta ventajoso combinar IGFBP7 y GDF15 para las anormalidades tamaño incrementado de VI y/o velocidad incrementada del pico E.

Se dan a conocer combinaciones preferentes adicionales de marcadores con IGFBP7, en particular para determinadas anormalidades (para pacientes con FEVI reducida o conservada) en el Ejemplo 2 (ver 2.1 y 2.2).

Lo siguiente se aplica como algoritmo diagnóstico, en el caso de que se realice un diagnóstico. Preferentemente,

a) un nivel de IGFBP7 superior al nivel de referencia y un nivel (o niveles) de por lo menos un biomarcador adicional superior al nivel o niveles de referencia para dicho por lo menos un biomarcador indican que el paciente sufre de disfunción diastólica y/o de dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica, y/o

b) un nivel de IGFBP7 inferior al nivel de referencia y un nivel (o niveles) de por lo menos un biomarcador adicional superior al nivel o niveles de referencia para dicho por lo menos un biomarcador indican que el paciente no sufre de disfunción diastólica y/o de dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica.

Lo siguiente se aplica como algoritmo diagnóstico, en el caso de que se realice una gradación. Preferentemente,

a) un nivel de IGFBP7 superior al nivel de referencia y un nivel (o niveles) de por lo menos un biomarcador adicional superior al nivel o niveles de referencia para dicho por lo menos un biomarcador indican que el paciente sufre de una forma severa de disfunción diastólica y/o de una forma severa de dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica, y/o

b) un nivel de IGFBP7 inferior al nivel de referencia y un nivel (o niveles) de por lo menos un biomarcador adicional inferior al nivel o niveles de referencia para dicho por lo menos un biomarcador indican que el paciente sufre de una forma leve de disfunción diastólica y/o de una forma leve de dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica.

Pueden determinarse niveles de referencia adecuados tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria (para IGFBP7).

La Tabla A a continuación proporciona intervalos preferentes para niveles de referencia (tercera columna) para los diversos marcadores, así como niveles de referencia específicos preferentes (cuarta columna). El experto en la materia puede determinar niveles de referencia adicionales sin operaciones adicionales.

Tabla A

Marcador / Parámetro	Unidad	nivel de referencia dentro del intervalo de entre	nivel de referencia
Ácido úrico	mg/dl	aproximadamente 9 a 10	aproximadamente 9,1
GFD-15	pg/ml	aproximadamente 2.500 a 5.000	aproximadamente 3.210
Endostatina	ng/ml	aproximadamente 230 a 277	aproximadamente 243
Mimecan	ng/ml	aproximadamente 39 a 50	aproximadamente 45,2
Osteopontina	ng/ml	aproximadamente 110 a 120	aproximadamente 113,5

En una realización preferente de los métodos de la presente invención, dichos métodos comprenden además la etapa de recomendar, seleccionar, continuar y/o iniciar una terapia adecuada en el caso de que según el método de la presente invención el paciente sufre de disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica (o de una forma severa de la misma).

La expresión "recomendar una terapia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a utilizar la información o datos generados relativos a los niveles de los marcadores como referidos según la presente invención en una muestra de un paciente para recomendar una terapia adecuada. La terapia adecuada puede ser cualquier terapia que permita el tratamiento de una disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica (o una forma severa de la misma). Dichas terapias se describen en, p.ej., Zouein et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. volumen 62, número 1, julio de 2013, páginas 13 a 16. En una realización, la terapia es la administración de por lo menos una espirolactona. En otra realización, la terapia es la administración de sildenafil o de Anakinra.

En el caso de que se diagnostique que el paciente sufre de disfunción diastólica y/o de por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica (o que la gradación sea que sufre de una forma severa de la misma), el paciente es elegible para dicha terapia. En el presente caso, dicha terapia se selecciona, se inicia, se recomienda y/o se continúa.

De esta manera, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, que comprende:

a) medir el nivel de IGFBP7 y opcionalmente el nivel o niveles de por lo menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mimecán, ácido úrico y GDF15 en una muestra de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca (tal como se ha definido anteriormente en la presente memoria).

- b) comparar el nivel o niveles medidos en la etapa a) con un nivel de referencia adecuado (o con niveles de referencia adecuados) y
 c) identificar o seleccionar un paciente como elegible para una terapia que permite tratar la disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica (o una forma severa de la misma), en particular basándose en los resultados de la etapa de comparación b), y
 5 d) seleccionar, iniciar, recomendar y/o continuar dicha terapia.

La expresión "seleccionar un paciente" o "identificar un paciente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a utilizar la información o datos generados relativos al nivel de IGFBP7 (y opcionalmente del marcador adicional) en una muestra de un paciente con el fin de identificar o seleccionar el paciente como más probablemente beneficiado o menos probablemente beneficiado de una terapia que permite el tratamiento de la disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica. La información o datos utilizados o generados pueden encontrarse en cualquier formato, escrito, oral o electrónico. En algunas realizaciones, la utilización de la información o datos generados incluye comunicar, presentar, informar, almacenar, 10 enviar, transferir, suministrar, transmitir, dispensar o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, comunicar, presentar, informar, almacenar, enviar, transferir, suministrar, transmitir, dispensar o combinaciones de los mismos se llevan a cabo con un dispositivo informático, unidad analizador o combinación de los mismos. En algunas realizaciones adicionales, comunicar, presentar, informar, almacenar, enviar, transferir, suministrar, transmitir, dispensar o combinaciones de los mismos son llevadas a cabo por un profesional de laboratorio o médico. 15 En algunas realizaciones, la información o datos incluyen una comparación entre el nivel de IGFBP7 (y opcionalmente por lo menos un marcador adicional) y un nivel de referencia.

La expresión "seleccionar una terapia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a utilizar la información o datos generados relativos al nivel de IGFBP7 (y opcionalmente del marcador adicional) en una muestra de un paciente con el fin de identificar o seleccionar una terapia tal como se ha indicado anteriormente para un paciente. En algunas realizaciones, la expresión "identificar/seleccionar una terapia" incluye la identificación de un paciente que requiere la adaptación de una cantidad eficaz de fármaco que se administra. 25

Todas las definiciones y explicaciones proporcionados en la presente memoria y en las reivindicaciones se aplican por analogía a los métodos, usos, kits y dispositivos siguientes (excepto donde se indique lo contrario). 30

Además, la presente invención se refiere a un método, en particular a un método in vitro, para la monitorización de: (i) la función diastólica y/o ii) por lo menos un parámetro de la función diastólica, o iii) la terapia de la insuficiencia cardíaca en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas de: 35

- a) medir el nivel del biomarcador IGFBP7 (proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina) y, opcionalmente, por lo menos un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mímecán, ácido úrico y GDF15 (factor 15 de diferenciación del crecimiento) en una primera y en una segunda muestras de 40 un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, en particular en un paciente con fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) reducida, y
 b) comparar el nivel del biomarcador IGFBP7 y opcionalmente el nivel de dicho por lo menos un biomarcador adicional medido en la segunda muestra, con el nivel en la primera muestra.

En una realización, el método comprende además la etapa c) de monitorización o proporcionar una monitorización de i) la función diastólica y/o ii) por lo menos un parámetro de la función diastólica o iii) terapia de la insuficiencia cardíaca, en particular basándose en los resultados de la etapa de comparación b). 45

La expresión "insuficiencia cardíaca" se ha definido anteriormente en la presente memoria. La definición se aplica de acuerdo con lo anterior. 50

En una realización del método anteriormente indicado, el paciente de insuficiencia cardíaca sufrirá de disfunción diastólica y/o de por lo menos una anomalía funcional o estructural del corazón asociada a disfunción diastólica. En una realización, se monitoriza el parámetro subyacente a dicha anomalía. Además, tal como se ha indicado de manera general anteriormente, el paciente preferentemente presenta una FEVI reducida. 55

La expresión "monitorización de la función diastólica" o monitorización de por lo menos un parámetro de la función diastólica, se refiere a realizar un seguimiento de la función diastólica o de por lo menos un parámetro de la función diastólica. En particular, la expresión se refiere a evaluar si la función diastólica o un parámetro de la misma mejora o se deteriora. La expresión "monitorizar la terapia de la insuficiencia cardíaca" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a evaluar si un paciente que recibe terapia para insuficiencia cardíaca responde a dicha terapia o no. Un paciente que responde a dicha terapia es un paciente cuya condición mejora como consecuencia de dicha terapia, mientras que un paciente que no responde a dicha terapia es un paciente cuya condición no mejora como consecuencia de dicha terapia. En el caso de que el paciente responda a dicha terapia, la terapia puede continuarse, 60 mientras que la terapia se interrumpirá o adaptará en el caso de que el paciente no responda a dicha terapia. 65

Tal como entenderá el experto en la materia, habitualmente no se pretende que dichas evaluaciones sean correctas para el 100% de los pacientes que deben ser monitorizados. Sin embargo, el término requiere que la evaluación sea correcta para una porción estadísticamente significativa de los pacientes (p.ej. una cohorte en un estudio de cohorte). Si una parte es estadísticamente significativa puede determinarse sin hacer ninguna otra referencia por el experto en la materia utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentra más información en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes son por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99%. Los valores de p preferentemente son 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

La expresión "disfunción diastólica" es bien conocida de la técnica. En una realización, la expresión se refiere a la capacidad del corazón de llenarse durante la diástole. Los parámetros preferentes de función diastólica son los parámetros determinados en la sección de Ejemplos (ver, p.ej., el Ejemplo 1 y/o la Tabla 2 de la sección de Ejemplos, en particular en la sección 1, aunque también en las secciones B, D y E). De los parámetros mostrados en la Tabla 2, resultan particularmente preferentes los parámetros con un valor de p bajo.

Preferentemente, el parámetro de la función diastólica se selecciona de entre el grupo que consiste en tamaño de aurícula izquierda (preferentemente diámetro superior-inferior de aurícula izquierda), índice del volumen auricular izquierdo, velocidad del pico E (es decir, velocidad Doppler transmitral de la onda E), velocidad del pico A (es decir, la velocidad Doppler transmitral de la onda A inferior), proporción E/A transmitral, proporción de velocidad de flujo de entrada E mitral a velocidad Doppler E' tisular (es decir, una proporción E/E' incrementada), velocidad sistólica pico de la vena pulmonar, velocidad diastólica pico de la vena pulmonar, proporción sistólica/diastólica de la vena pulmonar, velocidad diastólica pico de la vena pulmonar, proporción sistólica/diastólica de la vena pulmonar, superficie incrementada del ventrículo derecho, presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD), dilatación del ventrículo derecho y tamaño de la aurícula derecha (preferentemente el diámetro superior-inferior de la aurícula derecha). También preferentemente, el parámetro es la regurgitación mitral o la regurgitación tricúspide.

La terapia de la insuficiencia cardíaca que debe monitorizarse puede ser cualquier terapia que permita el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. En particular, dicha terapia puede ser cualquier terapia que permita el tratamiento de la disfunción diastólica y/o re por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica tal como se indica de manera general en relación al método de tratamiento en otros sitios de la presente memoria. El paciente de insuficiencia cardíaca que debe monitorizarse preferentemente sufre de disfunción diastólica.

Alternativamente, la terapia de la insuficiencia cardíaca puede ser una terapia que se somete a ensayo como terapia para la insuficiencia cardíaca (en particular una terapia para la disfunción diastólica). De acuerdo con lo anterior, el biomarcador IGFBP7 (y opcionalmente por lo menos un biomarcador adicional tal como se indica en la presente memoria) puede utilizarse en un paciente de insuficiencia cardíaca (en particular un paciente con disfunción diastólica) con el fin de identificar un compuesto capaz de tratar la insuficiencia cardíaca y/o la disfunción diastólica. Una reducción del nivel de IGFBP7 (y opcionalmente del nivel de por lo menos un biomarcador adicional) en una muestra del paciente tratado con dicho compuesto es indicativa de que el compuesto es capaz de tratar la insuficiencia cardíaca y/o la disfunción diastólica.

La "primera muestra" puede obtenerse en cualquier tiempo del paciente que sufre de insuficiencia cardíaca. En el caso de que se monitoree el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, la primera muestra puede obtenerse antes del inicio del tratamiento de la insuficiencia cardíaca (tal como dentro de la semana anterior al inicio del tratamiento de la insuficiencia cardíaca) o durante el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

La "segunda muestra" se entiende, preferentemente, como una muestra que se obtiene con el fin de reflejar un cambio del nivel del marcador respectivo respecto al nivel del marcador respectivo en la primera muestra. La segunda muestra se obtiene después de la primera muestra. Preferentemente, la segunda muestra se obtiene en aproximadamente un mes a aproximadamente doce meses, más preferentemente en aproximadamente dos a ocho meses, y lo más preferentemente en aproximadamente tres a seis meses después de dicha primera muestra. También preferentemente, la segunda muestra se obtiene por lo menos tres meses o por lo menos seis meses después de dicha primera muestra.

Preferentemente, se obtiene por lo menos una muestra adicional (es decir, una tercera muestra, una cuarta muestra, etc.) con el fin de monitorizar adicionalmente el cambio del nivel de un biomarcador al que se hace referencia en la presente memoria. Dicha muestra adicional puede obtenerse, preferentemente, en aproximadamente un mes a aproximadamente doce meses, más preferentemente en aproximadamente dos meses a ocho meses, y lo más preferentemente en aproximadamente tres meses a seis meses después de la muestra anterior (p.ej. la segunda muestra).

Un incremento del nivel de IGFBP7 (y de por lo menos un biomarcador adicional, en caso de medirse) en la segunda muestra (o en muestras adicionales) del paciente en comparación con la primera muestra es indicativo de deterioro de la función diastólica y/o de deterioro de dicho parámetro o parámetros de la función diastólica.

También preferentemente, un incremento del nivel de IGFBP7 (y de por lo menos un biomarcador adicional, en caso de medirse) en la segunda muestra (o en muestras adicionales) del paciente en comparación con la primera muestra es indicativo de un paciente que no responde a la terapia para insuficiencia cardíaca.

5 Un incremento del nivel de IGFBP7 (y de por lo menos un biomarcador adicional, en caso de medirse) en la segunda muestra (o en muestras adicionales) del paciente en comparación con la primera muestra es indicativo de mejora de la función diastólica y/o de dicho parámetro o parámetros de la función diastólica.

10 También preferentemente, una reducción del nivel de IGFBP7 (y de por lo menos un biomarcador adicional, en caso de medirse) en la segunda muestra (o en muestras adicionales) del paciente en comparación con la primera muestra es indicativo de un paciente que no responde a la terapia para insuficiencia cardíaca.

15 En particular, un incremento (o reducción) significativa es un incremento (o reducción) de un tamaño que se considera significativo para la monitorización, en particular, estadísticamente significativo. Los términos "significativo" y "estadísticamente significativo" son conocidos por el experto en la materia. El experto en la materia podrá determinar si un incremento (o una reducción) es estadísticamente significativo sin operaciones adicionales utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, incluyendo las indicadas en la presente memoria.

20 Los incrementos preferentes del nivel de IGFBP7 (y de por lo menos un biomarcador adicional) que se han observado durante el curso de la invención que son indicativos de: i) deterioro de la función diastólica y/o de por lo menos un parámetro de la función diastólica, o ii) un paciente que no responde a la terapia de insuficiencia cardíaca, se listan posteriormente en la presente memoria.

25 Preferentemente, un incremento del nivel de IGFBP7 (y de por lo menos un biomarcador adicional, en caso de medirlo) en la segunda muestra respecto al nivel en la primera muestra, preferentemente de por lo menos 3%, más preferentemente de por lo menos 5% y todavía más preferentemente de por lo menos 7% y lo más preferentemente de por lo menos 10%, o incluso 20%, se considera significativo y, de esta manera, indicativo de: i) deterioro de la función diastólica y/o de por lo menos un parámetro de la función diastólica, o ii) un paciente que no responde a la
30 terapia de insuficiencia cardíaca.

Con respecto al nivel absoluto, se aplica lo siguiente: preferentemente, un incremento del nivel de IGFBP7 en la segunda muestra respecto al nivel en la primera muestra, preferentemente de por lo menos 4 ng/ml, más preferentemente de por lo menos 7 ng/ml y todavía más preferentemente de por lo menos 10 ng/ml, o lo más
35 preferentemente de por lo menos 15 ng/ml se considera que resulta significativo y, de esta manera, indicativo de: i) deterioro de la función diastólica y/o de por lo menos un parámetro de la función diastólica, o ii) un paciente que no responde a la terapia de insuficiencia cardíaca.

40 Las reducciones preferentes del nivel de IGFBP7 (y de por lo menos un biomarcador adicional) que se han observado durante el curso de la invención que son indicativos de: i) mejora de la función diastólica y/o de por lo menos un parámetro de la función diastólica, o ii) un paciente que responde a la terapia de insuficiencia cardíaca, se listan posteriormente en la presente memoria.

45 Preferentemente, una reducción del nivel de IGFBP7 (y de por lo menos un biomarcador adicional, en caso de medirlo) en la segunda muestra respecto al nivel en la primera muestra, preferentemente de por lo menos 3%, o más preferentemente de por lo menos 5%, más preferentemente de por lo menos 10% o lo más preferentemente de por lo menos 20%, se considera significativo y, de esta manera, indicativo de: i) mejora de la función diastólica y/o de por lo menos un parámetro de la función diastólica, o ii) un paciente que responde a la terapia de insuficiencia
50 cardíaca.

Con respecto al nivel absoluto, se aplica lo siguiente: preferentemente, una reducción del nivel de IGFBP7 en la segunda muestra respecto al nivel en la primera muestra, preferentemente de por lo menos 4 ng/ml, más preferentemente de por lo menos 5 ng/ml y todavía más preferentemente de por lo menos 10 ng/ml, o lo más preferentemente de por lo menos 15 ng/ml se considera que resulta significativo y, de esta manera, indicativo de: i)
55 mejora de la función diastólica y/o de por lo menos un parámetro de la función diastólica, o ii) un paciente que responde a la terapia de insuficiencia cardíaca.

60 En una realización del método anteriormente indicado, el nivel del biomarcador IGFBP7 (y opcionalmente por lo menos un biomarcador adicional) se mide en una serie de muestras obtenida a intervalos a partir del paciente. En el presente caso, el nivel del biomarcador o biomarcadores medidos se compara con un nivel (o niveles) de referencia en la etapa b). Además, se calcula para el biomarcador o biomarcadores el porcentaje de tiempo que se mantiene sobre el nivel de referencia.

65 De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a un método, en particular a un método in vitro, para la monitorización de: i) la función diastólica y/o ii) por lo menos un parámetro de la función diastólica, o iii) la terapia de

la insuficiencia cardíaca en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5 a) medir el nivel del biomarcador IGFBP7 (proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina) y, opcionalmente, por lo menos un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mimecán, ácido úrico y GDF15 (factor 15 de diferenciación del crecimiento) en una serie de muestras obtenidas a intervalos de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, en particular en un paciente con fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) reducida,
- 10 b) comparar el nivel del biomarcador IGFBP7 y opcionalmente el nivel de dicho por lo menos un biomarcador adicional medido en dichas muestras con un nivel de referencia, y
- c) calcular el porcentaje de tiempo sobre el nivel de referencia para el biomarcador IGFBP7 y opcionalmente para dicho por lo menos un biomarcador adicional, basado en los resultados de la etapa b).

15 El término "paciente" se ha definido en otros sitios en la presente memoria. Tal como se ha indicado anteriormente, el paciente sufre de insuficiencia cardíaca. Preferentemente, el paciente presenta una FEVI reducida. Sin embargo, se encuentra adicionalmente contemplado que el paciente presente una FEVI conservada (ver en otros sitios en la presente memoria).

20 Según el método anteriormente indicado, el nivel de biomarcador IGFBP7 se determina en una serie de muestras, preferentemente en una serie del mismo tipo de muestras, tal como en una serie de muestras de sangre, una serie de muestras de suero o una serie de muestras de plasma. Una serie de muestras, preferentemente, comprende entre por lo menos cuatro muestras y por lo menos 20 muestras, o incluso más. Más preferentemente, la serie de muestras comprende por lo menos cuatro, incluso más preferentemente, por lo menos seis, o lo más preferentemente, por lo menos ocho muestras.

Las muestras comprendidas en las series se obtienen de dicho paciente a intervalos. Preferentemente, dichas muestras no se obtienen excesivamente pronto después de cada una. De acuerdo con lo anterior, los intervalos son, preferentemente, intervalos de aproximadamente por lo menos un mes, más preferentemente, de aproximadamente por lo menos dos meses, o lo más preferentemente, de aproximadamente por lo menos tres meses. También preferentemente, dichos intervalos son de entre aproximadamente un mes y aproximadamente seis meses, más preferentemente dichos intervalos son de entre aproximadamente un mes y aproximadamente meses, lo más preferentemente dichos intervalos son de aproximadamente dos meses a cuatro meses. En una realización, los intervalos son intervalos de aproximadamente tres meses (p.ej. +/- tres semanas).

35 Preferentemente, lo siguiente se aplica en forma de algoritmo diagnóstico. Preferentemente,

- un porcentaje elevado de tiempo sobre el nivel de referencia (para el biomarcador o biomarcadores medidos) es indicativo de: i) deterioro de la función diastólica y/o ii) deterioro de dicho parámetro o parámetros de la función diastólica, o iii) un paciente que no responde a la terapia, y/o
- un porcentaje reducido de tiempo sobre el nivel de referencia (para el biomarcador o biomarcadores medidos) es indicativo de: i) mejora de la función diastólica y/o ii) mejora de dicho parámetro o parámetros de la función diastólica, o iii) un paciente que no responde a la terapia.

45 El porcentaje de tiempo sobre la referencia es el porcentaje de tiempo sobre la referencia con respecto al tiempo (total) entre la primera medición y la última medición del biomarcador o biomarcadores.

El porcentaje se considera elevado/incrementado en el caso de que sea un porcentaje, preferentemente, superior a 60%, más preferentemente superior 70%, o todavía más preferentemente, superior a 80% (en particular del periodo de ensayo completo). El porcentaje se considera reducido en el caso de que un porcentaje, preferentemente, inferior a 55%, más preferentemente inferior a 50%, o todavía más preferentemente inferior a 40% (en particular del periodo de ensayo completo).

55 Las explicaciones proporcionadas en la presente memoria se aplican por analogía a la siguiente materia objeto según la presente invención.

Además, la presente invención se refiere a un método, en particular a un método in vivo que predice el riesgo de mortalidad y/o de un suceso cardiovasculares en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 60 a) medición del nivel de IGFBP7 (proteína 7 de unión a factor de crecimiento similar a insulina) en una serie de muestras obtenidas a intervalos de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, en particular en el que dicho paciente presenta una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) reducida,
- b) comparación del nivel de IGFBP7 medido en dichas muestras con un nivel de referencia, y
- 65 c) cálculo del porcentaje de tiempo sobre el nivel de referencia basándose en los resultados de la etapa b).

El método anteriormente indicado puede comprender la etapa adicional d) de predicción o provisión de una predicción de si el paciente se encuentra en riesgo de mortalidad y/o de un suceso cardiovascular.

El término "predecir" utilizado en la presente memoria se refiere a evaluar la probabilidad de que un paciente muera (p.ej. la mortalidad causada por la insuficiencia cardíaca) y/o de que desarrolle un suceso cardiovascular, preferentemente un suceso cardiovascular agudo, tal como un síndrome coronario agudo (SCA) dentro de una ventana temporal definida (ventana de predicción) en el futuro. La ventana de predicción es un intervalo en el que el paciente desarrollará un suceso cardiovascular o morirá según la probabilidad predicha. La ventana de predicción puede ser el periodo de vida remanente completo del paciente con el análisis mediante el método de la presente invención. Sin embargo, preferentemente la ventana de predicción es un intervalo de uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, quince o 20 años después de llevar a cabo el método de la presente invención (más preferentemente y precisamente, después de obtener la muestra que debe analizarse mediante el método de la presente invención). Más preferentemente, dicha ventana de predicción es un intervalo de un año o de cinco años. La ventana de predicción puede ser un año para pacientes con FEVI reducida y de cinco años para pacientes con FEVI conservada. Tal como entenderá el experto en la materia, dicha evaluación habitualmente no se pretende que sea correcta para 100% de los sujetos que deben ser analizados. Sin embargo, el término requiere que la evaluación sea válida durante una parte estadísticamente significativa de los pacientes que deben analizarse. Si una parte es estadísticamente significativa puede determinarse sin hacer ninguna otra referencia por el experto en la materia utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentra más información en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes son por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99%. Los valores de p preferentemente son 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferentemente, la probabilidad contemplada por la presente invención permite que la predicción sea correcta para por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de los pacientes de una cohorte dada.

El término "mortalidad" tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente se refiere a la mortalidad por cualquier causa, y más preferentemente, por un suceso cardiovascular. La expresión "suceso cardiovascular" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier trastorno del sistema cardiovascular, incluyendo preferentemente cualquier suceso cardiovascular agudo. Los sucesos cardiovasculares agudos son, preferentemente, la angina de pecho aguda (APA) o el síndrome coronario agudo (SCA). Los pacientes de SCA muestran mostrar una angina de pecho inestable (API) o infarto de miocardio (IM). El IM puede ser un IM con elevación de ST (STEMI, por sus siglas en inglés) o un IM sin elevación de ST (NSTEMI). NSTEMI-ACS tal como se utiliza en la presente memoria comprende UAP y NSTEMI. A la incidencia de un IM puede seguir una disfunción del ventrículo izquierdo (DVI), el desarrollo de insuficiencia cardíaca o incluso la muerte. Algunos sucesos cardiovasculares preferentes adicionales comprenden bradicardias o taquiarritmias cardíacas, incluyendo la muerte cardíaca súbita y el ictus (sucesos o accidentes cerebrovasculares). Además, la mortalidad también puede referirse a la tasa de muerte o a la proporción del número de muertes en una población dada de pacientes.

La expresión "predecir el riesgo de mortalidad y/o de un suceso cardiovascular" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que el paciente que debe analizarse mediante el método de la presente invención se asigna al grupo de pacientes de una población con un riesgo o elevado, o al grupo con riesgo reducido. Un riesgo elevado tal como se indica en la presente invención preferentemente se refiere a que el riesgo de desarrollar un suceso cardiovascular o el riesgo de mortalidad dentro de una ventana de predicción predeterminada se encuentra elevado significativamente (es decir, incrementado significativamente) para un paciente con respecto al riesgo medio para un suceso cardiovascular o mortalidad cardíaca en una población de pacientes. Un riesgo reducido tal como se indica en la presente invención preferentemente se refiere a que el riesgo de desarrollar un suceso cardiovascular o el riesgo de mortalidad dentro de una ventana de predicción predeterminada es significativamente reducido para un paciente con respecto al riesgo medio de un suceso cardiovascular o la mortalidad cardíaca en una población de pacientes. En particular, un incremento o reducción significativa de un riesgo es un incremento o reducción o un riesgo de un tamaño que se considera que es significativo para el pronóstico, en particular dicho incremento o reducción se considera estadísticamente significativo. Los términos "significativo" y "estadísticamente significativo" son conocidos por el experto en la materia. De esta manera, si un incremento o reducción de un riesgo es significativo o estadísticamente significativo puede ser determinado sin operación adicional por el experto en la materia utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas.

Preferentemente, para una ventana de predicción de cinco años, un riesgo elevado de mortalidad (o de un suceso cardiovascular) se encuentra comprendido en el intervalo de 8,0% a 19,0%, más preferentemente se encuentra comprendido en el intervalo de 12,0% a 17,0%, todavía más preferentemente se encuentra comprendido en el intervalo de 8,0% a 16,0%. Un riesgo incrementado y, de esta manera, incrementado de mortalidad tal como se utiliza en la presente memoria, preferentemente se refiere a un riesgo superior a 8,0%, preferentemente superior a 12,0%, más preferentemente superior a 17%, todavía más preferentemente superior a 20%, preferentemente con respecto a una ventana de predicción de uno o cinco años. Un riesgo reducido de mortalidad (o de un suceso cardiovascular) tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente se refiere a un riesgo inferior a 8,0%, preferentemente inferior a 6%, todavía más preferentemente inferior a 4% y más preferentemente se encuentra

comprendido en el intervalo de 3,0% a 8,0%, preferentemente con respecto a una ventana de predicción de uno o cinco años.

Preferentemente, lo siguiente se aplica en forma de algoritmo diagnóstico. Preferentemente,

1. i) un porcentaje elevado del tiempo sobre el nivel de referencia es indicativo de que un paciente presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un suceso cardiovascular y/o
2. ii) un porcentaje reducido del tiempo sobre el nivel de referencia es indicativo de que un paciente presenta un riesgo reducido de mortalidad y/o de un suceso cardiovascular.

Las definiciones y explicaciones proporcionadas anteriormente también se aplican a los usos, kits y dispositivos siguientes.

La presente invención se refiere además a la utilización de:

- i) el biomarcador IGFBP7, o
- ii) un agente que permite medir el nivel de IGFBP7, en particular un agente que se une específicamente a IGFBP7 (tal como un anticuerpo), y opcionalmente
- iii) por lo menos un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mimecán, ácido úrico y GDF15 (factor 15 de diferenciación del crecimiento) o
- iv) por lo menos un agente que permite medir el nivel de dicho por lo menos un biomarcador adicional, en particular un agente que se une específicamente a dicho por lo menos un biomarcador adicional,

en una muestra de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca para el diagnóstico y/o gradación de la disfunción diastólica y/o de por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a la disfunción diastólica, o en una primera y en una segunda muestra o en una serie de muestras obtenida a intervalos, de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca para la monitorización de: i) la función diastólica y/o ii) por lo menos un parámetro de la función diastólica, o iii) la terapia para la insuficiencia cardíaca.

La presente invención se refiere además a la utilización de:

- i) el biomarcador IGFBP7 y/o
- ii) un agente que permite medir el nivel de IGFBP7, en particular un agente que se une específicamente a IGFBP7 (tal como un anticuerpo), y opcionalmente
- iii) por lo menos un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mimecán, ácido úrico y GDF15 (factor 15 de diferenciación del crecimiento) o
- iv) por lo menos un agente que permite medir el nivel de dicho por lo menos un biomarcador adicional, en particular un agente que se une específicamente a dicho por lo menos un biomarcador adicional,

para la preparación de una composición diagnóstica para el diagnóstico y/o la gradación de la disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a la disfunción diastólica, o para la preparación de una composición diagnóstica para la monitorización de: i) la función diastólica y/o ii) por lo menos un parámetro de la función diastólica, o iii) la terapia para la insuficiencia cardíaca en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca.

Tal como se indica en otros sitios en la presente memoria, el paciente puede presentar una FEVI reducida.

Preferentemente, el agente es un anticuerpo que se une específicamente a dicho marcador. Más preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal, o en particular es un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, también pueden aplicarse otros agentes (ver, p.ej., las definiciones de marcador).

Según una realización preferente de la presente invención, se proporciona un dispositivo adaptado para llevar a cabo la invención, en el que dicho dispositivo comprende:

- a. una unidad analizadora que comprende un agente que se une específicamente al biomarcador IGFBP7 y opcionalmente un agente (agentes) que permiten medir el nivel de por lo menos un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mimecán, ácido úrico y GDF15, en particular un agente que se une específicamente a dicho por lo menos un biomarcador adicional, en el que dicha unidad está adaptada para medir el nivel o niveles del biomarcador o biomarcadores en una muestra de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, y
- b. una unidad analizadora (o unidad de evaluación) para comparar el nivel o niveles medidos con uno o más niveles de referencia, en la que la disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional

asociada a disfunción diastólica se diagnostica o se gradua, comprendiendo dicha unidad una base de datos con uno o más niveles de referencia y un algoritmo para llevar a cabo la comparación.

5 Según una realización preferente de la presente invención, se proporciona un dispositivo adaptado para llevar a cabo un método de la invención, que comprende:

10 a. una unidad analizadora que comprende un agente que se une específicamente al biomarcador IGFBP7 y opcionalmente un agente que permite medir el nivel de por lo menos un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mimecán, ácido úrico y GDF15, en particular un agente que se une específicamente a dicho por lo menos un biomarcador adicional, en el que dicha unidad está adaptada para medir el nivel o niveles del biomarcador o biomarcadores en una primera y segunda muestras de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, y

15 b. una unidad analizadora (o unidad de evaluación) para comparar el nivel o niveles medidos en la segunda muestra con el nivel o niveles en la primera muestra, en la que i) la función diastólica y/o ii) por lo menos un parámetro de la función diastólica, o iii) la terapia para insuficiencia cardíaca en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca se monitoriza, comprendiendo dicha unidad un algoritmo para llevar a cabo la comparación.

20 Según otra realización preferente de la presente invención, se proporciona un dispositivo adaptado para llevar a cabo un método de la invención, que comprende:

25 a. una unidad analizadora que comprende un agente que se une específicamente al biomarcador IGFBP7 y opcionalmente un agente que permite medir el nivel de por lo menos un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mimecán, ácido úrico y GDF15, en particular un agente que se une específicamente a dicho por lo menos un biomarcador adicional, en el que dicha unidad está adaptada para medir el nivel o niveles del biomarcador o biomarcadores en una serie de muestras obtenida a intervalos de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, y

30 b. una unidad analizadora (o unidad de evaluación) para comparar los niveles medidos en la serie de muestras con un nivel de referencia (o niveles de referencia) y para calcular el porcentaje del tiempo sobre el nivel o niveles de referencia, en el que i) la disfunción diastólica y/o ii) por lo menos un parámetro de la función diastólica, o iii) terapia para insuficiencia cardíaca en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca se monitoriza, comprendiendo dicha unidad una base de datos con uno o más niveles de referencia y un algoritmo para llevar a cabo la comparación y/o el cálculo.

40 Preferentemente, el algoritmo de los dispositivos anteriormente indicados es el algoritmo diagnóstico tal como se ha indicado en otros sitios de la presente memoria (en relación a los métodos respectivos). Preferentemente, el algoritmo es un algoritmo implementado por ordenador. Preferentemente, la unidad analizadora comprende un ordenador que comprende incluido tangiblemente un código de programa informático para llevar a cabo la comparación.

45 Los niveles de referencia preferentes se dan a conocer en otros sitios de la presente memoria. En una realización, el nivel o niveles de referencia se almacenan en una base de datos que comprende la unidad analizadora o unidad de evaluación.

En una realización, el agente es un agente que se une específicamente al biomarcador respectivo, tal como un anticuerpo.

50 El término "dispositivo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un sistema que comprende por lo menos los medios anteriormente indicados operablemente ligados entre sí para poner en práctica el método de la presente exposición. Los medios adecuados para determinar las cantidades de los marcadores de los métodos dados a conocer y los medios para llevar a cabo la comparación se dan a conocer anteriormente en relación a los métodos dados a conocer. El cómo asociar los medios de una manera operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, en el caso de que se aplique una unidad de análisis para medir automáticamente el nivel del biomarcador de la presente exposición, los datos obtenidos con dicha unidad de análisis de funcionamiento automático pueden procesarse con, p.ej., un ordenador como unidad de evaluación con el fin de obtener los resultados deseados. En algunas realizaciones, los medios están comprendidos en un único dispositivo en este caso.

60 Una realización preferente de la presente exposición incluye un sistema/dispositivo para llevar a cabo el método de la presente invención. Entre los ejemplos de sistemas/dispositivos se incluyen analizadores de química clínica, analizadores de química de la coagulación, analizadores de inmunquímica, analizadores de orina, analizadores de ácidos nucleicos, utilizados para detectar el resultado de reacciones químicas o biológicas o para monitorizar el progreso de las reacciones químicas o biológicas. Más específicamente, entre los sistemas ejemplares de la presente exposición pueden incluirse los sistemas Roche Elecsys™ y Cobas® y los analizadores de inmunoensayo

Abbott Architect™ y Axsym™, los analizadores Siemens Centaur™ e Immulite™ y los analizadores Beckman Coulter UniCel™ y Acess™ Analyzers, o similares.

5 Las realizaciones del sistema o dispositivo pueden incluir una o más unidades analizadoras para la práctica de la presente exposición. Las unidades analizadoras del sistema o dispositivo dado a conocer en la presente memoria se encuentran en comunicación operable con el dispositivo informático dado a conocer en la presente memoria mediante cualquiera de entre las conocidas conexión con cable, Bluetooth, LAN o señal inalámbrica. Además, según la presente exposición, una unidad analizadora puede comprender un aparato autónomo o módulo dentro de un instrumento más grande, que lleva a cabo uno o ambos de entre la detección, p.ej. la evaluación cualitativa y/o
10 cuantitativa de muestras con fines diagnósticos. Por ejemplo, una unidad analizadora puede llevar a cabo o asistir con el pipeteado, dosificación y mezcla de muestras y/o reactivos. Una unidad analizadora puede comprender una unidad de sujeción de reactivos para sostener los reactivos para llevar a cabo los ensayos. Los reactivos pueden disponerse, por ejemplo, en forma de recipientes o casetes que contienen los reactivos individuales o grupos de reactivos, en receptáculos o posiciones apropiadas dentro de un compartimiento de almacenamiento o transportador. Los reactivos de detección también pueden encontrarse en forma inmovilizada sobre un soporte sólido para la puesta en contacto con la muestra. Además, una unidad analizadora puede incluir un componente de procedimiento y/o detección que es optimizable para el análisis específico.

20 Según algunas realizaciones, puede configurarse una unidad analizadora para la detección óptica de un analito, por ejemplo un marcador, con una muestra. Una unidad analizadora ejemplar configurada para la detección óptica comprende un dispositivo configurado para convertir la energía electromagnética en una señal eléctrica, que incluye detectores ópticos de elemento único y multielemento o de matriz. Según la presente exposición, un detector óptico es capaz de monitorizar una señal electromagnética óptica y proporcionar una señal de salida eléctrica o señal de respuesta respecto a una señal de línea base indicativa de la presencia y/o concentración de un analito en una muestra situada en un camino óptico. Entre dichos dispositivos también pueden incluirse, por ejemplo, fotodiodos, incluyendo los fotodiodos de avalancha, los fototransistores, los detectores fotoconductores, conjuntos lineales de sensores, detectores CCD, detectores CMOS, incluyendo redes de detectores CMOS, fotomultiplicadores y redes de fotomultiplicadores. Según determinadas realizaciones, un detector óptico, tal como un fotodiodo o fotomultiplicador, puede contener electrónica adicional de acondicionamiento o procesamiento de la señal. Por ejemplo, un detector
25 óptico puede incluir por lo menos un preamplificador, filtro electrónico o circuito integrado. Entre los preamplificadores adecuados se incluyen, por ejemplo, preamplificadores integrados, trans-impedancia y de ganancia de corriente (espejo de corriente).

35 Además, una o más unidades analizadoras según la presente exposición pueden comprender una fuente de luz para emitir luz. Por ejemplo, una fuente de luz de una unidad analizadora puede consistir en por lo menos un elemento emisor de luz (tal como un diodo emisor de luz, una fuente de radiación de alimentación eléctrica, tal como una lámpara incandescente, una lámpara electroluminiscente, una lámpara de descarga de gas, una lámpara de descarga de alta intensidad, un láser) para medir las concentraciones de los analitos en una muestra sometida a ensayo o para permitir una transferencia de energía (por ejemplo por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o la catálisis enzimática).

40 Además, una unidad analizadora del sistema puede incluir una o más unidades de incubación (por ejemplo para mantener una muestra o un reactivo a una temperatura o intervalo de temperaturas especificado). En algunas realizaciones, una unidad analizadora puede incluir un termociclador, puede incluir un termociclador en tiempo real, para someter una muestra a ciclos térmicos repetidos y monitorizar los cambios de cantidad de un producto de amplificación en la muestra.

45 Adicionalmente, una unidad analizadora del sistema dado a conocer en la presente memoria puede comprender, o encontrarse operativamente conectado con un recipiente de reacción o unidad de alimentación de cubetas. Entre las unidades de alimentación ejemplares se incluyen unidades procesamiento de líquidos, tales como una unidad de pipeteado, para administrar muestras y/o reactivos en los recipientes de reacción. La unidad de pipeteado puede comprender una aguja lavable reutilizable, p.ej. una aguja de acero o puntas de pipeta desechables. La unidad analizadora puede comprender además una o más unidades de mezcla, por ejemplo un agitador para agitar una cubeta que comprende un líquido, o una paleta de mezcla para mezclar líquidos en una cubeta o recipiente de reactivo.

50 Se infiere de lo anterior que según algunas realizaciones de la presente exposición, partes de algunas etapas de los métodos dados a conocer y descritos en la presente memoria pueden ser llevados a cabo por un dispositivo informático. Un dispositivo informático puede ser un ordenador universal o un dispositivo informático portátil, por ejemplo. También debe entenderse que pueden utilizarse múltiples dispositivos informáticos juntos, tal como en una red, u otros métodos de transferencia de datos, para llevar a cabo una o más etapas de los métodos dados a conocer en la presente memoria. Entre los dispositivos informáticos ejemplares se incluyen ordenadores de sobremesa, ordenadores portátiles, dispositivo asistente personal de datos ("PDA", por sus siglas en inglés), tal como dispositivos de la marca BLACKBERRY, dispositivos celulares, tabletas convertibles, servidores y similares.

65

En general, un dispositivo informático comprende un procesador capaz de ejecutar una pluralidad de instrucciones (tal como un programa de software).

Un dispositivo informático dispone de acceso a una memoria. Una memoria es un medio legible por un ordenador y puede comprender un único dispositivo de almacenamiento o múltiples dispositivos de almacenamiento, situados localmente con el dispositivo informático o accesibles al dispositivo informático a través de una red, por ejemplo. Un medio legible por ordenador puede ser cualquier medio disponible al que pueda accederse mediante el dispositivo informático e incluye medios tanto volátiles como no volátiles. Además, los medios legibles por ordenador pueden ser uno o ambos de entre medios extraíbles y no extraíbles. A título de ejemplo y no limitativo, los medios legibles por ordenador pueden comprender medios de almacenamiento informático. Entre los medios de almacenamiento informático ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, RAM, ROM, EEPROM, memoria flash o cualquier otra tecnología de memoria, CD-ROM, disco versátil digital (DVD) u otro almacenamiento de disco óptico, cassetes magnéticos, cinta magnética, almacenamiento de disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético o cualquier otro medio que pueda utilizarse para almacenar una pluralidad de instrucciones capaces de ser accedidas por el dispositivo informático y ejecutadas por el procesador del dispositivo informático.

Según realizaciones de la presente exposición, el software puede incluir instrucciones que, al ser ejecutadas por un procesador del dispositivo informático, pueden llevar a cabo una o más etapas de los métodos dados a conocer en la presente memoria. Algunas de las instrucciones pueden adaptarse para producir señales que controlan el funcionamiento de otras máquinas y, de esta manera, pueden funcionar a través de dichas señales de control para transformar materiales muy alejados del ordenador mismo. Dichas descripciones y representaciones son los medios utilizados por el experto en la materia del procesamiento de datos, por ejemplo, para transmitir más eficazmente la sustancia de su trabajo a otros expertos en la materia.

La pluralidad de instrucciones puede comprender además un algoritmo que es una secuencia de etapas que generalmente se considera autoconsistente que conduce a un resultado deseado. Dichas etapas son las que requieren manipulaciones físicas de cantidades físicas. Habitualmente, aunque no necesariamente, dichas cantidades adoptan la forma de pulsos eléctricos o magnéticos capaces de ser almacenados, transferidos, transformados, combinados, comparados y, de otro modo, manipulados. En ocasiones resulta conveniente, principalmente por motivos de uso común, referirse a dichas señales como valores, caracteres, datos de visualización, números o similares como referencia a los ítems físicos o manifestaciones en las que se realizan o expresan dichas señales. Sin embargo, debe considerarse que la totalidad de dichos términos y términos similares deben asociarse con las cantidades físicas apropiadas y se utilizan meramente como etiquetas convenientes aplicadas a dichas cantidades. Según algunas realizaciones de la presente exposición, un algoritmo para llevar a cabo una comparación entre un nivel medido de uno o más marcadores dados a conocer en la presente memoria y una referencia adecuada, se plasma y se lleva a cabo mediante la ejecución de las instrucciones. Los resultados pueden proporcionarse como el resultado de datos en bruto diagnósticos paramétricos, o como datos absolutos o relativos. Según diversas realizaciones del sistema dado a conocer en la presente memoria, un "diagnóstico", "gradación" o "monitorización" puede ser proporcionado por el dispositivo dado a conocer en la presente memoria basándose en dicha comparación de la "cantidad" calculada con una referencia o un umbral.

El dispositivo informático comprendido en el dispositivo también puede disponer de acceso a un dispositivo de salida. Entre los dispositivos de salida ejemplares se incluyen aparatos de fax, pantallas, impresoras y archivos, por ejemplo. Según algunas realizaciones de la presente exposición, un dispositivo informático puede llevar a cabo una o más etapas de un método dado a conocer en la presente memoria y después proporcionar un resultado mediante un dispositivo de salida, relacionado con un resultado, indicación, proporción u otro factor del método.

Finalmente, la invención se refiere a un kit preferentemente adaptado para llevar a cabo un método de la presente invención, que comprende un agente que se une específicamente al biomarcador IFGBP7 y, opcionalmente, por lo menos un agente que se une específicamente a un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mimecán, ácido úrico y GDF15. Preferentemente, el kit comprende además estándares de referencia para el biomarcador o biomarcadores, así como instrucciones para llevar a cabo dicho método.

El término "kit" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una colección de los componentes anteriormente indicados, preferentemente proporcionados separadamente o dentro de un único recipiente. El recipiente comprende además instrucciones para llevar a cabo el método de la presente invención. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de un manual o pueden ser proporcionadas por un código de programa informático que es capaz de llevar a cabo las comparaciones a las que se hace referencia en los métodos de la presente invención y para establecer un diagnóstico de acuerdo con ellas al ser implementadas en un ordenador o dispositivo de procesamiento de datos. El código del programa informático puede proporcionarse en un medio o dispositivo de almacenamiento de datos, tal como un medio de almacenamiento óptico (p.ej. un disco compacto) o directamente en un ordenador o dispositivo de procesamiento de datos. Además, el kit comprende por lo menos un estándar para una referencia tal como se ha definido anteriormente en la presente memoria, es decir, una solución con un nivel (niveles) predefinidos de uno o más biomarcadores que deben medirse que representan un nivel de referencia (o niveles de referencia) tal como se explica en otro sitio en la presente memoria.

En algunas realizaciones, un kit dado a conocer en la presente memoria incluye por lo menos un componente o combinación empaquetada de componentes para la puesta en práctica de un método dado a conocer. La expresión "combinación empaquetada" se refiere a que los kits proporcionan un único paquete que contiene una combinación de uno o más componentes, tal como sondas (por ejemplo, un anticuerpo), controles, tampones, reactivos (por ejemplo, conjugado y/o sustrato), instrucciones y similares, tal como se da a conocer en la presente memoria. Un kit que contiene un único recipiente también se encuentra incluido dentro de la definición de "combinación empaquetada". En algunas realizaciones, los kits incluyen por lo menos una sonda, por ejemplo un anticuerpo (con afinidad específica para un epítipo de un biomarcador tal como se da a conocer en la presente memoria). Por ejemplo, los kits pueden incluir un anticuerpo que se marca con un fluoróforo o un anticuerpo que es un elemento de una proteína de fusión. En el kit, la sonda puede inmovilizarse y puede inmovilizarse en una conformación específica. Por ejemplo, puede proporcionarse una sonda inmovilizada en un kit para la unión específica a la proteína diana, para detectar la proteína diana en una muestra y/o para eliminar la proteína diana de una muestra.

Según algunas realizaciones, los kits incluyen por lo menos una sonda, que puede inmovilizarse, en por lo menos un recipiente. Los kits pueden incluir además múltiples sondas, opcionalmente inmovilizadas, en uno o más recipientes. Por ejemplo, pueden encontrarse presentes múltiples sondas en un único recipiente o en recipientes separados, por ejemplo, en los que cada recipiente contiene una única sonda.

En algunas realizaciones, un kit puede incluir una o más sondas no inmovilizadas y uno o más soportes sólidos que incluyen o no incluyen una sonda inmovilizada. Algunas de dichas realizaciones pueden comprender algunos o todos los reactivos y suministros necesarios para inmovilizar una o más sondas en el soporte sólido, o algunos o todos los reactivos y suministros necesarios para la unión de sondas inmovilizadas a proteínas específicas dentro de una muestra.

En determinadas realizaciones, puede inmovilizarse una única sonda (incluyendo múltiples copias de la misma sonda) sobre un único soporte sólido y proporcionarse en un único recipiente. En otras realizaciones, se proporcionan en un único recipiente dos o más sondas, cada una específica para una proteína diana diferente o una forma diferente de una única proteína diana (tal como un epítipo específico). En algunas de dichas realizaciones, puede proporcionarse una sonda inmovilizada en múltiples recipientes diferentes (p.ej. en forma de uso único) o pueden proporcionarse múltiples sondas inmovilizadas en múltiples recipientes diferentes. En realizaciones adicionales, las sondas pueden inmovilizarse sobre múltiples soportes sólidos de diferente tipo. Se contempla cualquier combinación de una o más sondas y uno o más recipientes para los kits dados a conocer en la presente memoria y puede seleccionarse cualquier combinación de los mismos para conseguir un kit adecuado para un uso deseado.

Un recipiente de los kits puede ser cualquier recipiente que resulte adecuado para empaquetar y/o contener uno o más componentes dados a conocer en la presente memoria, incluyendo, por ejemplo, sondas (por ejemplo, un anticuerpo), controles, tampones y reactivos (por ejemplo, conjugado y/o sustrato). Entre los materiales adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, vidrio, plástico, cartón u otro producto de papel, madera, metal y cualquier aleación de los mismos. En algunas realizaciones, el recipiente puede alojar por completo una o más sondas inmovilizadas o puede simplemente cubrir la sonda para minimizar la contaminación por polvo, aceites, etc. y la exposición a la luz. En algunas realizaciones adicionales, los kits pueden comprender un único recipiente o múltiples recipientes, y en el caso de múltiples recipientes, cada recipiente puede ser igual a todos los demás recipientes, diferente de los demás o diferente de algunos pero no de todos los demás recipientes.

Finalmente, la presente invención se refiere a por lo menos un fármaco seleccionado de entre una espirolactona, sildenafil y Anakinra para la utilización en el tratamiento de la disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca que presenta un nivel, en particular un nivel en sangre, suero o plasma, del marcador IGFBP7 y opcionalmente de por lo menos un marcador adicional se seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mímecán, ácido úrico y GDF15, superior al nivel o niveles de referencia para dicho marcador o marcadores.

Las figuras muestran:

Figura 1: parámetros diastólicos mostrados en terciles de IGFBP7 para A) flujo Doppler transmitral, B) $E/E' > 15$, C) índice de volumen de la aurícula izquierda $> 28 \text{ ml/m}^2$ y D) $E' < 8 \text{ cm/s}$. La totalidad excepto $E' < 8 \text{ cm/s}$ mostró una asociación sustancial entre las concentraciones de IGFBP7 y parámetros más severos.

Figura 2: cambios en parámetros diastólicos durante un seguimiento medio de 10 meses como función del tiempo con una concentración de IGFBP7 $< 117,8 \text{ ng/ml}$. La cantidad de tiempo con una concentración inferior a $117,8 \text{ ng/ml}$ fue más baja en los pacientes que desarrollaban una proporción E/A agravada, PSVD e iVAi ($P < 0,05$ para todos).

Figura 3: correlaciones entre IGFBP7 y parámetros diastólicos mostrados como diagramas de dispersión con la línea ajustada y los intervalos de confianza al 95 por ciento; se muestra A) flujo Doppler de entrada transmitral,

B) E/E', C) proporción S/D de la vena pulmonar, D) índice de volumen de la aurícula izquierda (iVAI) y E) presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD).

Ejemplos

5 A continuación, se ilustra la invención mediante los Ejemplos siguientes, que no pretenden restringir o limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: pacientes del estudio PROTECT

10 *Diseño del estudio y población de pacientes*

15 El estudio fue aprobado por la junta de examen institucional de Partners Healthcare y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. El estudio PROTECT fue un ensayo aleatorizado, de centro único, prospectivo de prueba de concepto que comparó la atención estándar de la insuficiencia cardíaca con la atención guiada por NT-proBNP con el objetivo de reducir los niveles de péptido natriurético a ≤ 1000 pg/ml en pacientes con IC debido a disfunción sistólica del ventrículo izquierdo. El seguimiento de los pacientes se llevó a cabo durante un año con visitas trimestrales mínimas. Los métodos y resultados del estudio PROTECT han sido publicados anteriormente (Bhardwaj et al., Design and methods of the pro-b type natriuretic peptide outpatient tailored chronic heart failure therapy (protect) study, Am. Heart J. 159:532-538, 2010). El criterio de evaluación primario para el estudio PROTECT era un criterio compuesto de sucesos CV, incluyendo el agravamiento de la IC, la hospitalización por IC, arritmia ventricular significativa, síndrome coronario agudo, isquemia cerebral y muerte cardíaca, tal como se ha definido anteriormente. De los 151 pacientes incluidos en el estudio PROTECT, 124 disponían de muestras de figura 3 para la medición en serie de IGFBP7 y estudios ecocardiográficos de línea base. Dichos 124 sujetos de ensayo se visitaron durante un seguimiento medio de 10 meses, con un total de 882 consultas médicas.

Mediciones de biomarcadores

30 En cada visita, se recolectó sangre en tubos de vacío que contenían ácido etilén-diaminotetraacético, se centrifugaron y se dividió el suero en alícuotas en tubos y se congelaron a -80°C antes de los ensayos. Se midió IGFBP7 utilizando un nuevo inmunoensayo de tipo sándwich que se desarrolló y validó utilizando un ELISA prototipo de placa de microtitulación (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania).

Protocolo ecocardiográfico

35 Se llevó a cabo una ecocardiografía transtorácica bidimensional (ETB) detallada en la línea base y cuando fuese posible tras completar el estudio, una media de 10 meses después. Se obtuvieron mediciones ecocardiográficas referidas al tamaño y función de la cámara para las 4 cámaras (indexadas para superficie corporal), gravedad de la regurgitación valvular, presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD), así como índices diastólicos. Entre ellas se incluyeron el flujo Doppler transmitral (velocidad de la onda E, velocidad de la onda A, proporción E/A), velocidades Doppler tisular septal del anillo mitral (velocidad E' y velocidad A') y velocidades de flujo de la vena pulmonar. Para los fines del presente estudio, el flujo transmitral se dividió adicionalmente en $E/A < 1$, E/A de 1,0 a 1,5 y $E/A > 1,5$. Se consideró que las presiones de llenado eran elevadas en el caso de que $E/E' > 15$ y la proporción S/D de la vena pulmonar se consideró anormal en el caso de que $E/E' < 1,0$. Se consideró que el índice de volumen de la aurícula izquierda (iVAI) era anormal en el caso de que $> 28 \text{ ml/m}^2$ (Lang et al., Recommendations for chamber quantification: A report from the American society of echocardiography's guidelines and standards committee and the chamber quantification writing group, developed in conjunction with the European association of echocardiography, a branch of the European society of cardiology, J. Am. Soc. Echocardiogr. 18:1440-1463, 2005), se consideró que la presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) era elevada en el caso de que fuese superior a la mediana del grupo (43 mm Hg). La interpretación de los ultrasonidos fue realizada por dos personas (RBW y ALB) que eran ciegos a las asignaciones del estudio y a los resultados de los biomarcadores.

Análisis estadístico

55 Todas las variables continuas se consideraron como medias \pm desviaciones estándar para valores de distribución normal; las variables no normales se identificaron utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se expresaron como medianas con intervalos intercuartil (IIC). Las comparaciones de las variables de las variables como función de las concentraciones de IGFBP7 se llevaron a cabo utilizando la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, según resultase apropiado. Para las variables continuas expresadas en múltiples categorías, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

65 En un esfuerzo por entender mejor las asociaciones lineales entre las concentraciones de IGFBP7 y otras variables continuas, los presentes inventores en primer lugar transformaron con ln los resultados no normales para conseguir la normalidad. Tras esta transformación, se llevaron a cabo correlaciones de Spearman, con p expresado junto con el valor de P correspondiente. En un esfuerzo por proporcionar una representación gráfica de los análisis de Spearman, se generaron diagramas de dispersión seleccionados que demostraban la recta de ajuste y los

5 intervalos de confianza al 95 por ciento. Tras las correlaciones univariantes, los presentes inventores examinaron a continuación los datos disponibles para los factores predictivos independientes de la variable dependiente de las concentraciones de IGFBP7. Para la inclusión en el modelo de regresión lineal multivariante, todas las variables candidatas requirieron un valor de P de retención de 0,10 o inferior en las correlaciones univariantes. Las variables incluidas eran las de las características clínicas de línea base, los valores de laboratorio, así como los resultados ecocardiográficos en la línea base. Tras la construcción del modelo lineal de ajuste óptimo, se expresaron los coeficientes β para cada factor predictivo de IGFBP7.

10 Consistentemente con estudios anteriores, las clasificaciones clínicas se realizaron basándose en un nivel de IGFBP7 de 117,8 ng/ml (correspondiente al tercil más alto del grupo). Además, la exploración de las tendencias a largo plazo de IGFBP7 para predecir el cambio en la función diastólica se basó en el tiempo con <117,8 ng/ml integrado para todo el tiempo en el estudio. Finalmente, también se utilizó el porcentaje del tiempo con un IGFBP<117,8 ng/ml para analizar el riesgo de resultados adversos utilizando los riesgos proporcionales de Cox univariable seguido de los multivariable, modelando la asociación con la incidencia de cualesquiera sucesos CV. El modelo multivariable ajustaba para factores de riesgo epidemiológica y clínicamente relevantes, incluyendo la asignación del brazo de tratamiento en PROTECT, la edad, el sexo, la clase según la New York Heart Association (NYHA), la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), E/A, E/E', iVAI y PSVD, así como la tasa de filtración glomerular estimada en la línea base y NT-proBNP. Se llevaron a cabo las estadísticas con PASW versión 17.0 (Chicago, IL) con todos los valores de P bilaterales y se consideraron significativos en el caso de que <0,05.

Resultados

25 La Tabla 1 muestra las características de línea base de los sujetos en el presente análisis. La edad media era de 63,4 años ($\pm 14,2$ años) y 83,9% eran hombres. Aproximadamente la mitad (50,8%) presentaba una causa isquémica de IC, 58% de los pacientes presentaba un cardioversos-desfibrilador implantable y un poco más de la mitad de los pacientes (54,8%) eran de la clase III o IV del NYHA. La mayoría de pacientes tomaba β -bloqueantes o inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina (ECA)/bloqueantes de receptor de angiotensina (BRA), mientras que 40,3% tomaba antagonistas de aldosterona. La mediana de los niveles de línea base de NT-proBNP e IGFBP7 era de 1.964 pg/ml y 89,9 ng/ml, respectivamente, y el umbral de $\geq 117,8$ ng/ml representaba el tercil más alto del grupo.

Tabla 1: características de línea base de los participantes en el estudio

Característica	
Brazo guiado por biomarcador	50%
Edad, años; media \pm desviación estándar	63,4 \pm 14,2
Clase III o IV del NYHA (%)	54,8%
Género masculino (%)	83,9%
Causa isquémica de IC (%)	50,8%
<i>Historia médica anterior</i>	
Hipertensión (%)	52,4%
Enfermedad arterial coronaria (%)	55,6%
Infarto de miocardio (%)	40,3%
Fibrilación auricular (%)	38,7%
Taquicardia ventricular (%)	28,2%
Enfermedad obstructiva de las vías respiratorias (%)	21,8%
Diabetes mellitus (%)	34,7%
Tabaquismo (pasado o presente, %)	40,1%
<i>Dispositivos implantados</i>	
Cardioversor-desfibrilador (%)	58,1%
Marcapasos biventricular (%)	32,4%
<i>Medicaciones en la línea base</i>	
Inhibidores de ACE (%)	67,7%
Bloqueante de receptor de angiotensina (%)	17,7%
β -bloqueante (%)	96,8%
Antagonista de receptor de mineralocorticoide (%)	40,3%
Diurético del asa (%)	91,9%
Diurético tiazida (%)	4,0%
Digoxina (%)	34,0%
Hidralazina (%)	4,9%
Nitrato (%)	15,3%
Estatina (%)	64,5%
Aspirina (%)	86,4%
<i>Examen físico</i>	
Índice de masa corporal, kg/m ² , media \pm desviación estándar	28,6 \pm 6,2
Presión sanguínea sistólica, mmHg, media \pm desviación	110,0 \pm 14,9

estándar	
Presión sanguínea diastólica, mmHg, media ± desviación estándar	65,5 ± 9,2
Distensión venosa yugular (%)	34,7%
Estertores (%)	12,1%
Galope S3 (%)	32,3%
Galope S4 (%)	8,9%
Murmullo (%)	65,3%
Reflujo hepatoyugular (%)	4,0%
Edema periférico (%)	29,8%
Resultados de ECG	
BRI (%)	15,0%
Con marcapasos (%)	49,0%
Duración del QRS, milisegundos, media ± desviación estándar	136,5 ± 34,8
Valores de laboratorio	
Nitrógeno de urea en sangre, mg/dl, media ± desviación estándar	30,4 ± 16,2
Creatinina, mg/dl, media ± desviación estándar	1,48 ± 0,47
Tasa de filtración glomerular estimada, ml/min/1,73 m ² , media ± desviación estándar	61,2 ± 21,7
NT-proBNP, pg/ml, mediana (IQR)	1.964 (999-3.718)
IGFBP7, ng/ml, mediana (IQR)	89,9 (74,2-117,3)

NYHA indica: New York Heart Association; IC indica: insuficiencia cardíaca; ECA indica: enzima conversor de la angiotensina; ECG indica: electrocardiograma; BRI indica: bloqueo de la rama izquierda; NT-proBNP indica: péptido natriurético de tipo pro-B aminoterminal; IGFBP7 indica: proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina.

IGFBP7 y mediciones ecocardiográficas

5 La Tabla 2 a continuación compara las mediciones ecocardiográficas de línea base de los participantes en el estudio, divididos utilizando el valor de corte umbral pronóstico de 117,8 ng/ml (parámetros cardíacos como función de las concentraciones de IGFBP7 en la línea base).

Parámetro	IGFBP7 ≥117,8 ng/ml (N=31)	IGFBP7 ≥117,8 ng/ml (N=93)	valor de P
A. Volúmenes y función del ventrículo izquierdo			
FEVI (%)	28 [20-35]	27,0 [20,0-34,5]	0,67
iVDFVI (ml/m ²)	63,0 [54,0-71,0]	62,0 [55,0-67,0]	0,88
iVSFVI (ml/m ²)	54,0 [44,0-63,0]	53,0 [45,5-58,0]	0,56
Índice de masa del VI (g/m ²)	164,3 [123,0-300,0]	148,5 [98,5-191,0]	0,21
velocidad de la VSVI (m/s)	17,0 [13,0-20,0]	16,0 [12,0-21,0]	0,99
B. Tamaño y volúmenes de la aurícula izquierda			
Tamaño de AI, AP, mm	44,0 [40,0-49,0]	44,0 [39,0-48,0]	0,78
Tamaño de AI, AP, mm	60,0 [52,0-66,0]	54,0 [45,6-56,0]	0,01
iVAI, ml/m ²	32,0 [23,3-48,4]	25,2 [14,1-36,4]	0,03
C. Función diastólica y estimaciones de presión de llenado			
Velocidad del pico E (ms)	98,5 [79,0-120,8]	82,0 [61,0-104,0]	0,005
Velocidad del pico A (ms)	44,0 [36,0-83,0]	64,0 [38,5-80,5]	0,001
E/A transmitral (ms)	2,25 [1,1-3,2]	1,23 [0,86-2,50]	0,008
Velocidad del pico E' (ms)	6,6 [4,9-8,4]	7,00 [5,1-8,8]	0,90
E/E'	15,2 [10,8-20,2]	10,8 [8,4-15,4]	0,001
E/E' > 15, %	51,6%	23,2%	<0,001
E'/A'	1,45 [1,0-2,54]	1,04 [0,67-1,71]	0,08
Velocidad máxima del flujo sistólico (ms)	32,0 [26,0-54,0]	40,0 [29,8-52,3]	0,09
Pendiente de desaceleración de la VMS	159,0 [110,0-206,0]	166,0 [125,0-226,0]	0,12
Tiempo de desaceleración de la VMS	210,0 [183,0-275,0]	230,0 [190,0-268,8]	0,08
Velocidad máxima del flujo diastólico (ms)	60,0 [47,0-76,0]	47,5 [39,8-70,2]	0,03
Pendiente de desaceleración de la VMD	300,0 [217,0-468,0]	226,0 [147,3-323,0]	0,009
Tiempo de desaceleración de la VMD	210,0 [160,0-260,0]	220,0 [180,5-271,5]	0,89
Proporción S/D de la VM	0,49 [0,38-0,97]	0,78 [0,51-1,3]	0,14

<i>D. Parámetros del ventrículo derecho</i>			
DDFVD, mm	41,0 [34,0-44,0]	38,0 [34,0-43,0]	0,40
DSFVD, mm	31,0 [26,0-34,0]	31,0 [26,0-35,0]	0,99
VDFVD, 4 cámaras, ml	34,5 [25,0-46,8]	32,0 [26,0-46,5]	0,84
SDFVD, 4 cámaras, mm	16,5 [14,0-21,0]	15,5 [13,0-19,75]	0,78
VSFVD, 4 cámaras, ml	18,0 [13,8-30,3]	18,0 [12,5-25,0]	0,99
SSFVD, 4 cámaras, mm	10,2 [9,0-13,3]	10,5 [8,0-13,0]	1,0
Grosor de la pared libre del VD, mm	7,0 [5,1-8,0]	6,0 [5,0-7,0]	0,82
Cambio fraccional de la superficie del VD (%)	36,0 [25,5-42,5]	29,0 [17,0-39,0]	0,05
Presión sistólica del VD, mm Hg	53,0 [44,5-66,5]	43,5 [36,3-55,0]	0,006
Hipocinesia del VD, %	35,5%	31,2%	0,90
Dilatación del VD, %	45,2%	24,7%	0,05
<i>E. Parámetros de la aurícula derecha</i>			
Tamaño de la AD, flujo de entrada, mm	39,0 [31-44,0]	38,0 [33,0-44,3]	0,98
Tamaño de AI, SI, mm	54,0 [48,0-60,0]	46,8 [42,1-54,0]	0,12
tamaño de la AD, 4C, mm	39,0 [23,0-62,0]	38,2 [33,1-45,0]	0,94
<i>F. Enfermedad cardíaca valvular</i>			
Regurgitación aórtica > leve	19,4%	15,1%	0,56
Regurgitación mitral > leve	58,1%	33,3%	0,001
Regurgitación tricúspide > leve	35,5%	12,9%	0,002
<i>FEVI indica: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; iVDFVI indica: índice de volumen diastólico final del ventrículo izquierdo; iVSFVI indica: índice de volumen sistólico final del ventrículo izquierdo; VSVI indica: vía de salida del ventrículo izquierdo; AI indica: aurícula izquierda; AP indica: anterior-posterior; SI indica: supero-infero; iVAI indica: índice del volumen auricular izquierdo; VP indica: vena pulmonar; S indica: sistólico; D indica: diastólico; DDFVD indica: diámetro diastólico final del ventrículo derecho; DSFVD indica: diámetro sistólico final del ventrículo derecho; VDFVD indica: volumen diastólico final del ventrículo derecho; SDFVD indica: superficie diastólica final del ventrículo derecho; VSFVD indica: volumen sistólico final del ventrículo derecho; SSFVD indica: superficie sistólica final del ventrículo derecho; AD indica: aurícula derecha; 4C indica: cuatro cámaras.</i>			

5 Aunque no se observaron asociaciones claras entre las concentraciones de IGFBP7 y los valores de mediana del tamaño y función del VD, se encontraron otras numerosas asociaciones significativas, en particular entre las concentraciones de IGFBP7 y las medidas que describían anomalías de la función diastólica. Por ejemplo, los pacientes con concentraciones de IGFBP7 más elevadas era más probable que presentasen un iVAI más alto (32,0 [IQR=23,3 a 48,4] frente a 25,2 [14,1 a 36,4] ml/m², P=0,03); los sujetos con concentraciones de IGFBP7 más altas también era más probable que presentasen asociaciones significativas entre IGFBP7 elevado y una velocidad Doppler transmitral de la onda E más elevada, una velocidad Doppler transmitral de la onda A más baja y la correspondiente asociación directa con una proporción E/A más alta. De manera similar, utilizando la proporción de velocidad de flujo de entrada mitral E a velocidad Doppler tisular E' (E/E'), se observaron valores más altos en pacientes con IGFBP7 elevado (15,2 [10,8 a 20,2] frente a 10,8 [8,4 a 15,4], P<0,001) y más pacientes con IGFBP7 alto presentaban un E/E' >15 (51,6% frente a 23,2%, P<0,001). Además, los pacientes con IGFBP7 elevado era significativamente más probable que presentasen un PSVD más alta (53,0 [44,5 a 66,5] mmHg frente a 43,5 [36,3 a 55,0] mm Hg, P=0,006) junto con un VD más dilatado. Además, un porcentaje significativamente más alto de pacientes en el grupo de IGFBP7 alto presentaba más regurgitación mitral leve (58,1% frente a 33,3%, P=0,001) o regurgitación tricúspide (35,5% frente a 12,9%, P=0,002).

20 A continuación, los presentes inventores se centraron en las correlaciones entre ln-IGFBP7 y diversos parámetros ecocardiográficos, detallados en la Tabla 3 a continuación.

25 Tabla 3: correlación univariante y análisis de regresión lineal multivariable de concentraciones de IGFBP7 y parámetros ecocardiográficos de línea base.

Característica	Univariante		Multivariable	
	ρ	P	β	P
Parámetros del VI				
FEVI	0,018	0,08		
iVSFVI	0,087	0,59		
iVDFVI	0,090	0,58		
Masa del VI	0,120	0,18		
Grosor septal IV	0,116	0,20		
Grosor de la pared posterior	0,034	0,71		
Velocidad de la VSVI	0,128	0,16		
Parámetros de la AI				
Tamaño de la aurícula izquierda, AP	0,265	0,003		
Tamaño de la aurícula izquierda, SI	0,231	0,01		
Índice de volumen de la aurícula izquierda	0,237	0,008	0,386	0,01

Parámetros del VD				
DDFVD	0,202	0,03		
DSFVD	0,009	0,90		
Grosor de la pared libre del VD	0,222	0,02		
Cambio fraccional de la superficie del VD (%)	0,240	0,009		
Presión sistólica del VD	0,316	0,001	0,317	0,001
Parámetros de la AD				
Tamaño de la aurícula derecha, flujo de entrada	0,029	0,76		
Tamaño de la aurícula derecha, SI	0,287	<0,001	0,584	<0,001
Índices diastólicos del VI, flujo transmitral				
Velocidad del pico E	0,230	0,01		
Velocidad del pico A	-0,208	0,03	-0,592	<0,001
E/A	0,304	0,001	0,601	0,005
Índices diastólicos del VI, flujo de la vena pulmonar				
Velocidad máxima de la onda S	-0,147	0,14		
Pendiente de desaceleración de la onda S	-0,120	0,24		
Tiempo de desaceleración de la onda S	0,120	0,24	0,437	<0,001
Velocidad máxima de la onda D	0,411	<0,001		
Pendiente de desaceleración de la onda D	0,316	0,001		
Tiempo de desaceleración de la onda D	-0,048	0,64		
S/D	-0,173	0,09		
Índices diastólicos del VI, Doppler tisular				
Velocidad Dt del pico E	-0,01	0,92		
Velocidad Dt del pico A	0,287	0,003		
E/E' Dt	0,257	0,005	0,222	0,02
E'/A' Dt	-0,364	0,005	-0,759	<0,001
VI indica: ventrículo izquierdo; FEVI indica: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; iVSFVI indica: índice de volumen sistólico final del ventrículo izquierdo; iVDFVI indica: índice de volumen diastólico del ventrículo izquierdo; IV indica: intraventricular; VSVI indica: vía de salida del ventrículo izquierdo; AI indica: aurícula izquierda; AP indica: anterior-posterior; SI indica: supero-infero; VD indica: ventrículo derecho; DDFVD indica: diámetro diastólico final del ventrículo derecho; DSFVD indica: diámetro sistólico final del ventrículo derecho; AD indica: aurícula derecha; S indica: sistólico; D indica: diastólico; Dt indica: Doppler tisular.				

En los análisis univariantes, los presentes inventores detectaron numerosas correlaciones significativas entre las concentraciones de In-IGFBP7 y la estructura y función cardíaca, tales como el tamaño auricular y las presiones del VD. Además, los presentes inventores encontraron correlaciones significativas extensas con parámetros diastólicos, tales como las ondas Doppler transmitrales E y A (así como su proporción), la velocidad Doppler de la vena pulmonar y la pendiente de la onda D (así como la correlación marginal con la proporción S/D de la vena pulmonar) y variables en las imágenes Doppler tisular, incluyendo E/E'. La figura 3 muestra diagramas de dispersión de E/A Doppler transmitral, E/E', la proporción S/D de la vena pulmonar, el iVAI y la PSVD en relación a las concentraciones de IGFBP7.

A continuación, en una regresión lineal ajustada multivariante que consideraba las variables clínicas y ecocardiográficas (Tabla 3), los presentes inventores identificaron varias variables que eran especialmente predictivas de In-concentración de IGFBP7. En concordancia con los resultados anteriores de los presentes inventores, lo anterior nuevamente mostraba un fenotipo de función diastólica anormal. Los factores predictivos independientes incluían índice de volumen de la aurícula izquierda, tamaño auricular derecho en dimensiones supero-infero, presión sistólica ventricular derecha, así como numerosos parámetros diastólicos derivados de las imágenes Doppler, incluyendo la velocidad de la onda A, la proporción E/A, el tiempo de desaceleración de la onda S, E/E' y E'/A'. Además, algunas variables clínicas incluidas en el modelo multivariante fueron la edad ($\beta = 0,271$; $P = 0,004$), causa isquémica de IC ($\beta = 0,270$; $P = 0,003$) y la presencia de hepatomegalia en el examen ($\beta = 0,487$; $P < 0,001$), la totalidad de los cuales se correlacionaba positivamente con los niveles de IGFBP7 (*datos no mostrados*). Los valores de NT-proBNP de línea base se correlacionaban con IGFBP7 ($\rho = 0,378$; $P < 0,001$) aunque en análisis ajustados, NT-proBNP sólo era un factor predictivo independiente débil de concentración de IGFBP7 ($\beta = 0,107$; $P = 0,07$).

A continuación, los presentes inventores consideraron los sujetos en términos de los terciles de IGFBP7 y de esta manera ilustraron diversos parámetros diastólicos. Tal como se muestra en la figura 1A, el porcentaje de pacientes con proporciones E/A Doppler transmitrales (clasificadas en los grupos <1 , $1,0$ a $1,5$ o $>1,5$) se encontraba directamente asociado; además, el porcentaje más alto de pacientes con $E/A > 1,5$ se encontraba presente en el tercil más alto de IGFBP7 ($p < 0,001$). De una manera similar, las figuras 1B y 1C detallan asociaciones entre los terciles de IGFBP7 y los porcentajes de pacientes con $E/E' > 15$ e $iVAI > 28$ ml/m². En contraste con dichas asociaciones directas, los presentes inventores encontraron que la asociación entre E' y las concentraciones de IGFBP7 aparentemente era una tendencia no significativa (figura 1D).

Cambios en los parámetros diastólicos como función de las concentraciones de IGFBP7 durante el tiempo

Tal como se ha indicado, los participantes en el estudio realizaron un total de más de 880 visitas al consultorio durante el periodo de estudio. De ellas, 108 presentaron exámenes de línea base y ecocardiográfico de visita final similares. Lo anterior proporcionó una oportunidad ideal para examinar las tendencias a largo plazo de las concentraciones de IGFBP7 y los cambios en parámetros diastólicos ligados al biomarcador bajo las condiciones de línea base.

De promedio durante los 10 meses de seguimiento, los participantes en el estudio se mantuvieron 78% del tiempo con IGFBP7 <117,8 ng/ml. Los presentes inventores examinaron el "tiempo transcurrido con la respuesta" como función del cambio en parámetros de función diastólica entre la línea base y el ecocardiograma final. Se muestran estos resultados en la figura 2. En los pacientes con proporciones E/A <1,5 tanto en la línea base como en la evaluación final, un mayor porcentaje del tiempo transcurrió con niveles de IGFBP7 inferiores a 117,8 ng/ml, en comparación con pacientes con una proporción E/A inicialmente normal que se elevó a >1,5 en el seguimiento (86% vs. 42%, P<0,001). Se observaron resultados similares con la PSVD, la proporción S/D del flujo venoso pulmonar y el iVAI. En cada caso, los pacientes con función diastólica en deterioro era más probable que se mantuviesen menos tiempo con niveles de IGFBP7 <117,8 ng/ml durante las mediciones en serie.

Resultados

En modelos ajustados para variables epidemiológicas relevantes predictivas de riesgo de IC crónica (incluyendo parámetros ecocardiográficos de disfunción diastólica), el tiempo transcurrido con una concentración de IGFBP7 <117,8 ng/ml era un factor predictivo independiente de supervivencia libre de sucesos (HR=0,83 por cada 10% de tiempo en incremento de respuesta; IC al 95%=0,73 a 0,95, P=0,006). Cabe destacar que tras inclusión de los resultados de IGFBP7 en los modelos, las medidas de función diastólica no eran significativas en la predicción de riesgo.

Comentario

BNP y NT-proBNP han sido ampliamente investigadas para el diagnóstico, pronóstico y control de la IC ((Januzzi et al., ver anteriormente, Januzzi et al., The n-terminal pro-bnp investigation of dyspnea in the emergency department (pride) study, Am J Cardiol. 95:948-954, 2005, Januzzi et al., Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide testing for prediction of 1-year mortality in patients with dyspnea treated in the emergency department, Arch. Intern. Med. 166:315-320, 2006, Maisel et al., Rapid measurement of b-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure, N Engl J Med. 347:161-167, 2002). También se ha propuesto que podrían resultar útiles para detectar la disfunción diastólica (Tschöpe et al., ver anteriormente; Weiner et al., ver anteriormente; Yu et al., ver anteriormente). Sin embargo, las concentraciones de ambos péptidos natriuréticos resultan afectadas por muchas otras variables de estructura y función cardíaca, así como por otros trastornos cardiopulmonares (Daniels et al., ver anteriormente), los cuales pueden complicar la interpretación de estos valores. En el estudio de sujetos con IC crónica ambulatoria debido a DSVI, los presentes inventores presentan la utilización de IGFBP7 (previamente ligada a hipertrofia, angiogénesis y supervivencia celular) como marcador sustitutivo de disfunción diastólica y de diagnóstico.

Los presentes inventores encontraron que los sujetos con niveles elevados de IGFBP7 era más probable que presentasen evidencia amplia de disfunción diastólica en la ecocardiografía, con anomalías en el flujo Doppler transmitral, imágenes de Doppler tisular, tamaño auricular y presiones del VD, la totalidad de los cuales son mediciones utilizadas comúnmente en la determinación ecocardiográfica compleja de la disfunción diastólica (Nagueh et al., ver anteriormente). Tal como se deriva de múltiples análisis, se observó una tendencia de creciente severidad de las anomalías diastólicas con niveles más altos de IGFBP7. Lo anterior implica que, además de la asociación de IGFBP7 con la presencia de anomalías diastólicas, las concentraciones de IGFBP7 también proporcionan información sobre el grado de la disfunción. Finalmente, y tal vez más curiosamente, las tendencias a largo plazo en las concentraciones de IGFBP7 se asociaron al desarrollo de una función diastólica en deterioro con el tiempo y medidas ecocardiográficas desplazadas en modelos de supervivencia. Según los conocimientos de los presentes inventores, éste es el primer informe publicado que relaciona IGFBP7 con la presencia y gravedad de muchas de las medidas utilizadas comúnmente de función diastólica y plantea la interesante posibilidad de que este biomarcador pueda utilizarse como marcador sustitutivo para la presencia, gravedad y riesgo asociados a la disfunción diastólica.

IGFBP7, también conocido como mac25 y proteína 1 relacionada con IGFBP (IGFBP-rP1), pertenece a la familia de IGFBP, comparte un motivo común en el extremo aminoterminal de la proteína (Hwa et al., The insulin-like growth factor-binding protein (igfbp) superfamily, Endocr. Rev. 20:761-787, 1999, Oh et al., Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (igfbp)-7, Recombinant human mac25 protein specifically binds igf-i and -ii, J Biol Chem. 271:30322-30325, 1996). El factor de crecimiento similar a insulina (IGF, por sus siglas en inglés) desempeña importantes funciones en el crecimiento y proliferación de las células de mamífero. Esta ruta comprende factores de crecimiento similares a la insulina e insulina, y su unión a los receptores correspondientes. IGFBP7 es una proteína secretada que compite con IGF-1 e inhibe su unión al receptor de IGF (Hwa et al., see above, Chen et

al., Insulin-like growth factor-binding protein-7 functions as a potential tumor suppressor in hepatocellular carcinoma, Clin. Cancer Res. 17:6693-6701, 2011). A su vez, lo anterior suprime la señalización posterior del receptor de IGF, incluyendo PI3K/Akt y crecimiento y proliferación celulares asociadas (Evdokimova et al., Igfbp7 binds to the igf-1 receptor and blocks its activation by insulin-like growth factors, Sci. Signal 5:ra92, 2012). De esta manera, se ha implicado IGFBP7 como supresor tumoral y la exposición prolongada en células tumorales conduce a una reducción de la síntesis de proteínas y del crecimiento celular y a una apoptosis potenciada (Chen et al., ver anteriormente; Evdokimova et al., ver anteriormente). Dicha proteína también ha sido investigada en la lesión renal aguda, en donde se ha propuesto que IGFBP7 conduce a una expresión incrementada de p53 y p21, seguida de la parada del ciclo celular en la etapa G₁, que puede bloquear la división de las células epiteliales renales con ADN dañado por isquemia o sepsis (Kashani et al., Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury, Crit. Care 17:R25, 2013).

IGFBP7 se expresa a nivel elevado en la vasculatura. Algunos trabajos recientes han localizado IGFBP7 en los cuerpos de Weibel-Palade (orgánulos de almacenamiento) en las células endoteliales que envían mediadores inflamatorios y hemostáticos a la luz vascular mediante exocitosis (van Breevoort et al., ver anteriormente). IGFBP7 aparentemente es capaz de regular la angiogénesis junto con el factor de von Willebrand y otros factores en los orgánulos de depósito (van Breevoort et al., ver anteriormente).

La fisiopatología de las anomalías diastólicas en la IC implica hipertrofia celular, con la consiguiente pérdida celular mediante apoptosis y una fibrosis incrementada y rigidez diastólica (Ouzounian et al., Diastolic heart failure: Mechanisms and controversies, Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 5:375-386, 2008). Basándose en estos datos, puede plantearse la hipótesis de que las concentraciones elevadas de IGFBP7 pueden resultar protectoras mediante la inhibición de la hipertrofia de los miocitos y la división de los fibroblastos, evitando de esta manera la deposición adicional de colágeno, un contribuyente a la rigidez diastólica del miocardio ventricular (Zile et al., New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part ii: Causal mechanisms and treatment, Circulation, 105:1503-1508, 2002). Sin embargo, la activación excesiva de IGFBP7 puede conducir al bloqueo de la señalización de IGF-1 y de la insulina, conduciendo a una apoptosis y muerte celular aceleradas.

Cabe subrayar los datos de los presentes inventores que asocian las tendencias de IGFBP7 durante el tiempo con la aparición de índices diastólicos en deterioro. De manera similar, la inclusión del tiempo transcurrido con <117,8 ng/ml también desplaza dichas variables de anomalía diastólica en modelos de supervivencia libre de sucesos. Es ilusionante considerar que IGFBP7 podría representar un mediador de, o una respuesta a, factores que resultan en una rigidez ventricular agravada que conduce a presiones de llenado elevadas que se reflejan en medidas anormales de función diastólica (y el consiguiente riesgo que comportan). El hecho de que los presentes inventores han demostrado anteriormente que IGFBP7 es pronósticamente aditivo a NT-proBNP mismo asociado a muchas otras anomalías cardíacas significativas (Tschöpe et al., ver anteriormente; Weiner et al., ver anteriormente) no predictivas de IGFBP7 apoya esta sugerencia. Aunque Tschöpe et al. Han demostrado que las anomalías en NT-proBNP están asociadas a la presencia y gravedad de la disfunción diastólica en pacientes con FE conservada (Tschöpe et al., ver anteriormente), esta asociación es considerablemente menos robusta que la observada entre IGFBP7 y la diastología anormal en este estudio, sugiriendo que la combinación de NT-proBNP e IGFBP7 proporciona una representación biológica de base más amplia de las anomalías subyacentes de estructura y función cardíacas presentes en la IC.

Aunque el estudio de los presentes inventores es el primero publicado que muestra la asociación entre IGFBP7 y disfunción diastólica en detalle, existen varias limitaciones. En primer lugar, el tamaño muestral es limitado, aunque los resultados son internamente consistentes en los numerosos análisis. En segundo lugar, el estudio de los presentes inventores incluía pacientes con DSVI, ya que la mayoría de pacientes con DSVI presentan un componente de disfunción sistólica (Yancy et al., ver anteriormente; Bursi et al., Systolic and diastolic heart failure in the community, JAMA, 2006;296:2209-2216), los resultados de los presentes inventores no se aplican necesariamente a los pacientes con IC con FE conservada (IC-FEc). Sin embargo, la gravedad de la disfunción diastólica en los sujetos en la presente invención varía ampliamente y los presentes inventores han demostrado la asociación de IGFBP7 en todos los grados de disfunción diastólica. En tercer lugar, los presentes inventores utilizaron múltiples resultados ecocardiográficos como medidas sustitutivas de disfunción diastólica. Tal como han señalado Maurer y colaboradores, los patrones de ecocardiografía Doppler diastólica anormal podrían no resultar suficientes para concluir la presencia de propiedades diastólicas anormales del miocardio (Maurer et al., Diastolic dysfunction: Can it be diagnosed by Doppler echocardiography? J. Am. Coll. Cardiol. 44:1543-1549, 2004). Sin embargo, en una población de pacientes con IC-FEc, está generalmente aceptado que dichas medidas sí reflejan una mezcla de presiones de llenado elevadas y propiedades de relajación alteradas del miocardio; la falta de una correlación fuerte con NT-proBNP sugiere que las concentraciones de IGFBP7 no se deben enteramente al estado de volumen.

Resumen/Conclusión

Se realizó un seguimiento de 124 pacientes con IC ambulatoria debida a disfunción sistólica del ventrículo izquierdo (DSVI) y exámenes ecocardiográficos bidimensionales detallados de línea base durante una media de 10 meses. Se midió IGFBP7 en serie en cada visita al consultorio. Los pacientes con concentraciones de línea base elevadas de

IGFBP7 era más probable que presentasen anomalías de los parámetros que describen la función diastólica, tal como el índice del volumen auricular izquierdo (iVAI), 32,0 ml/m² frente a 25,2 ml/m² (P=0,03), E/A transmitral, 2,25 vs. 1,23 (P=0,008), E/E' de 15,2 vs. 10,8 (P<0,001) y presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) de 53,0 mmHg frente a 43,5 mmHg (P=0,006). Además, se correlacionó IGFBP7 con parámetros diastólicos tales como iVAI (p=0,237, P=0,008), E/A transmitral (p=0,304, P=0,001), E/E' (p=0,257, P=0,005) y PSVD (p=0,316, P=0,001). Además, se encontró que dichos parámetros eran factores predictivos independientes de IGFBP7 en los análisis ajustados. Entre aquellos sujetos con ecocardiogramas de línea base y finales (108 pacientes), más tiempo transcurrido con valores de IGFBP7 elevados en mediciones en serie se asociaba a una función diastólica en deterioro y iVAI o PSVD en incremento. Las concentraciones de IGFBP7 eran predictivas de un riesgo incrementado de sucesos CV independientes de medidas ecocardiográficas de disfunción diastólica.

IGFBP7 es un nuevo biomarcador fuertemente asociado a la disfunción diastólica y el pronóstico en pacientes con IC debida a DSVI. Los mecanismos biológicos que explican la asociación entre dicho biomarcador único y la función diastólica siguen sin conocerse bien y justifican investigaciones adicionales. Deberían realizarse estudios adicionales para validar el papel de IGFBP7 en la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección conservada y para determinar si IGFBP7 es un potencial contribuyente de la progresión de la insuficiencia cardíaca diastólica.

Ejemplo 2: pacientes del estudio TIME de ICC

Se extrajeron las muestras del estudio 'TIME CHF Trial of Intensified versus standard Medical therapy in Elderly patients with Chronic Heart Failure'. Esta cohorte incluía pacientes en la clase ≥II del NYHA bajo terapia que habían experimentado una hospitalización por IC en el último año o que habían presentado un FEVI ≤45% o que habían presentado niveles de NT-proBNP elevados (es decir, 400 pg/ml en pacientes <75 años, NT-proBNP <800 pg/ml en pacientes de 75 años o más) y con ≥60 años de edad (sin límite superior de edad) (Pfisterer M, Buser P, Rickli H, Gutmann M, Erne P, Rickenbacher P. et al., Bnp-guided vs symptom-guided heart failure therapy The trial of intensified vs standard medical therapy in elderly patients with congestive heart failure (time-CHF) randomized trial. JAMA: the journal of the American Medical Association, 301:383, 2009).

Las muestras disponibles del estudio TIME CHF se extrajeron para los análisis de biomarcadores de asociaciones a parámetros sistólicos (FEVI) y diastólicos (E/A, E/E', diámetro de la AI, AI al cuadrado).

Todas las muestras presentaban parámetros sistólicos pero sólo un subgrupo además había sido caracterizado con parámetros diastólicos. Se midieron marcadores cardíacos convencionales en analizadores automatizados Roche en un subgrupo de muestras más grande, mientras que se sometieron a ensayo marcadores innovadores disponibles en un subgrupo de muestras más pequeño.

Ejemplo 2.1

Ejemplo del estudio TIME-CHF: se determinaron los marcadores convencionales (NTproBNP Elecsys, cTnThs Elecsys, GDF15 Elecsys, ácido úrico, Roche Cobas) en 622, 561, 561 y 512 muestras, respectivamente. Todas las muestras se obtuvieron de pacientes con datos ecocardiográficos de FEVI (fracción de eyección del ventrículo izquierdo). La proporción E/E' se encontraba disponible para 228 pacientes. La proporción E/A se encontraba disponible para 314 pacientes. Se encontraba disponible el grosor de pared para 456 pacientes.

Se determinaron los nuevos marcadores (mimecán, endostatina, IGFBP7 y osteopontina) en 197, 198, 197 y 184 muestras, respectivamente. Todas las muestras se obtuvieron de pacientes con datos de FEVI disponibles. Los datos de E, A y E/A se encontraban disponibles para 106 pacientes. Los datos de Doppler tisular se encontraban disponibles para 77 pacientes. El grosor de pared (diámetro del septo) se encontraba disponible para 142 pacientes.

Tabla 4: correlaciones entre IGFBP7, cTnTh, NTproBNP, GDF15, ácido úrico, endostatina, mimecán y osteopontina y parámetros sistólicos y diastólicos

	Endostatina (n=198)	Mimecán (n=197)	IGFBP7 (n=197)	Osteopontina (n=184)	NT-proBNP (n=622)	cTnThs (n=561)	GDF15 (n=561)	Ácido úrico (n=512)
FEVI	-0,09 P=0,23	0,10 P=0,17	-0,01 P=0,87	0,13 P=0,08	-0,24** P<0,001	-0,07 P=0,10	0,07 P=0,13	-0,02 P=0,74
E	0,13 P=0,10	0,12 P=0,13	0,19 P=0,02	0,14 P=0,08	0,10 P=0,02	0,07 P=0,19	0,15** P=0,001	0,13** P=0,008
E/A	0,03 P=0,76	0,03 P=0,73	0,20 P=0,04	-0,03 P=0,80	0,17** P=0,003	0,01 P=86	0,10 P=0,10	0,13* P=0,046
E'	0,13 P=0,27	-0,03 P=0,79	0,20 P=0,08	0,11 P=0,34	-0,17** P=0,007	-0,24** P<0,001	0,08 P=91	-0,02 P=73
E/E'	0,11 P=0,36	0,18 P=0,15	0,05 P=0,70	0,05 P=0,69	0,16* P=0,02	0,22** P=0,002	0,05 P=44	-0,01 P=89

Diámetro de la AI	0,08 P=0,32	0,09 P=0,29	0,13 P=0,12	0,10 P=0,26	0,13** P=0,007	-0,01 P=0,83	0,14** P=0,004	0,24** P<0,001
AI al cuadrado	0,05 P=0,52	0,05 P=0,54	0,15 P=0,08	0,11 P=0,19	0,14** P=0,003	-0,04 P=0,39	0,08 P=0,12	0,19** P<0,001
Diámetro del septo	-0,05 P=0,54	-0,04 P=0,68	0,07 P=0,43	0,22** P=0,01	-0,014 P=0,76	0,04 P=0,39	0,05 P=0,30	-0,04 P=0,46

*p<0,05 **p<0,01

La evaluación de los datos en la Tabla 4 muestra que NTproBNP era el único marcador que se encontró que se correlacionaba significativamente (p<0,01) con la (dis-)función sistólica (FEVI, -0,24, p<0,001). NTproBNP se correlacionaba significativamente con parámetros diastólicos (E/A, E/E', parámetros de la AI). Se encontró que NTproBNP se correlacionaba más significativamente con los parámetros sistólicos que los diastólicos. La correlación más fuerte de NTproBNP se encontró para la (dis-)función sistólica. FEVI (-0,24, p<0,001) vs. Parámetros diastólicos: E/E' (0,16, p=0,02), E/A (0,17, p=0,003), AI al cuadrado (0,14, p=0,003, diámetro de AI (0,13, p=0,007). Tal como se muestra en el Ejemplo 1) NTproBNP no resulta adecuado para discriminar la disfunción diastólica de la disfunción sistólica.

Se encontró que IGFBP-7 no se correlacionaba con FEVI ((dis-)función sistólica) ni con el diámetro de septo. En contraste, se encontró que IGFBP-7 era el candidato a nuevo marcador con correlaciones más significativas con varios parámetros de (dis-)función diastólica. La evaluación de los datos (Tabla 4) muestra que las correlaciones más fuertes de IGFBP-7 eran con E/A y con parámetros de AI. Las correlaciones de E/A de IGFBP-7 eran más fuertes que las correlaciones de E/A con todos los marcadores convencionales investigados, incluyendo NTproBNP y cTNTs (considerando diferentes tamaños muestrales). Tal como se muestra en el Ejemplo 1), IGFBP7 resulta muy adecuado para discriminar múltiples parámetros de disfunción diastólica (E/A: 0,2, p=0,04, LA al cuadrado: 0,15, p=0,08) vs. disfunción sistólica (FEVI: -0,01, p=0,87) y vs. grosor de pared (diámetro del septo: 0,07, p=0,43). IGFBP7 mostraba la mayoría de asociaciones específicas con múltiples parámetros diastólicos vs. Todos los marcadores nuevos y convencionales sometidos a ensayo. IGFBP7 resulta muy adecuado para detectar la disfunción diastólica por sí misma o en combinación con otros marcadores. Resultan preferentes las combinaciones de IGFBP7 con marcadores que muestran correlaciones fuertes con E/E' (cTNTs, NTproBNP, mimecán y endostatina).

Tal como se muestra en la Tabla 4, se encontró que una combinación de IGFBP-7 y NTproBNP era útil para evaluar diversos parámetros complementarios de disfunción diastólica.

La evaluación de los datos mostró que cTNTs se correlacionaba mejor con parámetros de (dis-)función diastólica (E/E': 0,22, p= 0,002) vs. parámetros de (dis-)función sistólica (FEVI: -0,07, p=0,1). Se observó una asociación altamente significativa de cTNTs con E/E'. Tal como se demuestra en la Tabla 4, los parámetros clínicos complementarios de función diastólica están asociados a IGFBP-7 y cTNTs. De esta manera, una combinación de IGFBP-7 y cTNTs resulta muy adecuada para detectar la disfunción diastólica.

La evaluación de los datos demostró que las correlaciones de mimecán con parámetros diastólicos y sistólicos no alcanzaban la significancia. La correlación más fuerte del mimecán se encontró con E/E' (0,18, p=0,15). El mimecán podría resultar adecuado para complementar IGFBP7 en la detección de la disfunción diastólica.

Se encontró que la osteopontina estaba asociada a parámetros tanto sistólicos (FEVI: 0,13, p= 0,08) como diastólicos (E: 0,14, p=0,08), así como a grosor de pared (diámetro del septo: 0,22, p=0,01). La combinación de IGFBP7 con osteopontina podría resultar útil para evaluar información complementaria.

La evaluación de los datos demostró que las correlaciones de endostatina con parámetros diastólicos y sistólicos no alcanzaban la significancia. La endostatina se correlacionaba con E/E'. IGFBP7 resulta muy adecuado para detectar la disfunción diastólica por sí misma o en combinación con otros marcadores. Resultan preferentes las combinaciones de IGFBP7 con marcadores que muestran correlaciones fuertes con E/E' (cTNTs, NTproBNP, mimecán y endostatina). La combinación de IGFBP-7 con endostatina podría resultar útil para la asociación con diversos parámetros diastólicos.

Se encontró que tanto GDF-15 como ácido úrico se correlacionaban mejor con los parámetros diastólicos que los sistólicos.

Las correlaciones de GDF15 con E y el diámetro de AI alcanzaron la significancia.

Las correlaciones del ácido úrico con E/A, el diámetro de AI y AI al cuadrado alcanzaron la significancia.

Se encontró que una combinación de IGFBP-7 y cTNTs y/o GDF15 y/o ácido úrico resultaba útil para evaluar múltiples parámetros de disfunción diastólica.

Combinaciones preferentes para el Ejemplo 2.1 (en este orden):

- PRIO1 -> IGFBP7 + cTNTs
- PRIO2-> IGFBP7 + NTproBNP
- 5 • PRIO3 -> IGFBP7 + Mimecán
- PRIO4 -> IGFBP7 + ácido úrico
- PRIO5 -> IGFBP7 + GDF15
- PRIO6 -> IGFBP7 + endostatina

10 Ejemplo 2.2: ejemplo del estudio TIME-CHF:

Sólo los pacientes con fracción de eyección conservada (IC-FEc) fueron seleccionados en el presente análisis.

15 Se determinaron los marcadores convencionales (NTproBNP Elecsys, cTNTs Elecsys, GDF15 Elecsys, ácido úrico Roche Cobas) en 112, 99, 100 y 95 muestras, respectivamente. Todas las muestras se obtuvieron de pacientes con fracción de eyección conservada.

Se determinaron los nuevos marcadores (mimecán, endostatina, IGFBP7 y osteopontina) en 15 a 23 pacientes con fracción de eyección conservada.

20 Tabla 5: correlaciones entre IGFB7, cTNTs, NTproBNP, GDF15, ácido úrico, endostatina, mimecán y osteopontina y parámetros sistólicos y diastólicos en pacientes IC-FEc (FEVI >=50%)

	Endostati na	Mimecán	IGFBP7	Osteopon tina	NT- proBNP (n=112)	cTnThs (n=99)	GDF15 (n=100)	Ácido úrico (n=95)
FEVI	0,06 P=0,80	-0,10 P=0,65	-0,07 P=0,77	0,14 P=0,53	-0,23* P=0,02	-0,04 P=0,69	0,11 P=0,29	-0,05 P=0,65
E	0,37 P=0,10	0,47 P=0,03	0,55 P=0,01	0,27 P=0,25	0,04 P=0,72	0,06 P=0,58	0,08 P=0,49	0,17 P=0,14
E/A	0,38 P=0,17	0,01 P=0,96	0,76 P=0,001	0,03 P=0,93	0,02 P=0,88	0,20 P=0,19	-0,13 P=0,39	0,01 P=0,94
E'	0,08 P=0,78	-0,007 P=0,98	0,52 P=0,045	-0,15 P=0,60	-0,04 P=0,79	-0,35 P=0,01	0,14 P=0,35	0,09 P=0,52
E/E'	0,31 P=0,25	0,26 P=0,36	-0,08 P=0,79	0,49 P=0,06	0,25 P=0,07	0,32 P=0,02	0,008 P=0,96	-0,06 P=0,70
Diámetro de la AI	0,29 P=0,20	0,23 P=0,32	0,17 P=0,45	0,17 P=0,47	0,16 P=0,14	0,02 P=0,84	0,18 P=0,11	0,31 P=0,007
AI al cuadrado	0,41 P=0,06	-0,12 P=0,60	0,44 P=0,04	0,22 P=0,35	0,03 P=0,76	0,03 P=0,78	0,12 P=0,30	0,26 P=0,02
Diámetro del septo	0,29 P=0,20	-0,33 P=0,14	-0,06 P=0,79	0,12 P=0,60	0,10 P=37	0,17 P=0,14	0,05 P=0,69	0,07 P=0,58

25 La evaluación de los datos (Tabla 5) demostró que NT-proBNP estaba tan asociado a FEVI como a E/E'; significancia ligeramente superior con la función sistólica en pacientes con fracción de eyección conservada. De esta manera, NT-proBNP no resulta adecuado para discriminar la disfunción diastólica de la disfunción sistólica. Una combinación de NTproBNP con IGFBP7 podría resultar útil para evaluar múltiples parámetros de disfunción diastólica.

30 cTNTs no mostraron relación aparente con FEVI (-0,04, p=0,69) pero se encontró que estaban significativamente correlacionados con la función diastólica (E/E': 0,32, p=0,02). De esta manera, una combinación de cTNTs con IGFBP7 podría resultar útil para evaluar múltiples parámetros de disfunción diastólica.

35 Se encontró que IGFBP7 presentaba una correlación muy fuerte y altamente significativa con parámetros diastólicos (E/A: 0,76, p=0,001; AI al cuadrado: 0,44, p= 0,04), tal como se muestra en la Tabla 5. IGFBP7 mostró la mejor relación con múltiples parámetros diagnósticos vs. todos los marcadores nuevos y convencionales y resulta muy adecuado para detectar la disfunción diastólica por sí solo o en combinación con otros marcadores. Resultan preferentes las combinaciones de IGFBP7 con marcadores que muestran correlaciones fuertes con E/E' (osteopontina, cTNTs, NTproBNP, endostatina y mimecán).

40 La evaluación de los datos en la Tabla 5 mostró correlaciones fuertes de la osteopontina con E/E' (0,49, p=0,06) en pacientes con fracción de eyección conservada. De esta manera, la osteopontina podría resultar útil para complementar IGFBP7 en la evaluación de la función diastólica. Resulta preferente una combinación de IGFBP7 con osteopontina para detectar la disfunción diastólica.

45

La evaluación de los datos en la Tabla 5 mostró las correlaciones más fuertes de la endostatina con E/E' y parámetros de la AI.

5 Se demostró que la endostatina y el ácido úrico presentaban asociaciones significativas con parámetros de la AI complementarios a las asociaciones de IGFBP7 en la evaluación de la función diastólica. La combinación de IGFBP-7 y endostatina y/o ácido úrico podría resultar útil para la asociación con diversos parámetros diastólicos.

10 El mimecán mostró correlaciones significativas con E. La combinación de mimecán e IGFBP7 podría resultar útil para evaluar la disfunción diastólica.

10 La evaluación de los datos demostró que las correlaciones de GDF15 con parámetros de la función sistólica y diastólica no alcanzaban la significancia.

15 En pacientes IC-FEc, las mejores combinaciones (con IGFBP7) fueron:

- 15 PRIO1: Osteopontina
- PRIO2: cTNT_{hs}
- PRIO3: NTproBNP
- 20 PRIO4: Endostatina
- PRIO5: Mimecán
- PRIO6: ácido úrico
- PRIO7: GDF15:

25

REIVINDICACIONES

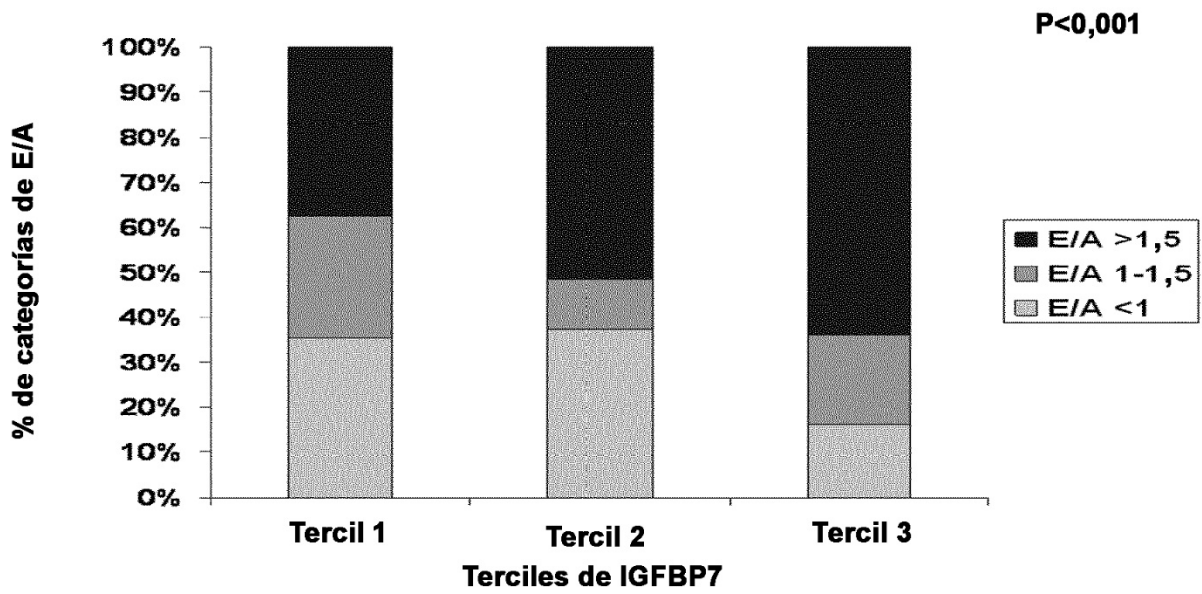
1. Método de diagnóstico y/o gradación de la disfunción diastólica y/o de por lo menos una anomalía estructural o funcional del corazón asociada a la disfunción diastólica en un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - a) medición del nivel de IGFBP7 (proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina) en una muestra de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, en el que dicho paciente presenta una fracción de eyección ventricular (FEVI) reducida y
 - b) comparación del nivel de IGFBP7 medido en a) con un nivel de referencia, en el que la anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica se selecciona de entre el grupo que consiste en una proporción E'/A' incrementada, un tamaño incrementado de la aurícula izquierda, un índice del volumen auricular izquierdo incrementado, velocidad incrementada del pico E, velocidad reducida del pico A, proporción E/A transmitral incrementada, proporción E/E' incrementada, velocidad pico sistólica de la vena pulmonar reducida, velocidad pico diastólica de la vena pulmonar incrementada, proporción sistólica/diastólica de la vena pulmonar reducida, superficie ventricular derecha incrementada, presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) incrementada, dilatación ventricular derecha incrementada, tamaño incrementado de la aurícula derecha, regurgitación mitral más que leve y regurgitación tricúspide más que leve.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el paciente sufre de insuficiencia cardíaca de estadio C o D según la clasificación de ACC/AHA y/o de insuficiencia cardíaca de clase III o IV del NYHA según la clasificación del NYHA.
3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, en el que el paciente presenta un FEVI inferior a 50%, en particular en el que el paciente presenta un FEVI inferior al 40%.
4. Método según las reivindicaciones 1 y 2, en el que el paciente presenta un FEVI conservado superior a 50%.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paciente presenta hipertrofia del ventrículo izquierdo, en particular en el que el paciente presenta un índice de masa del ventrículo izquierdo superior a 126 g/m².
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el paciente sufre de insuficiencia cardíaca debido a disfunción sistólica del ventrículo izquierdo.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se diagnostica disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica, y en el que:
 - a) un nivel de IGFBP7 superior al nivel de referencia indica que el paciente sufre de disfunción diastólica y/o dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica, y/o
 - b) un nivel de IGFBP7 inferior al nivel de referencia indica que el paciente no sufre de disfunción diastólica y/o dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se diagnostica disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica, y en el que:
 - a) un nivel de IGFBP7 superior al nivel de referencia indica que el paciente sufre de una forma severa de disfunción diastólica y/o de una forma severa de dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica, y/o
 - b) un nivel de IGFBP7 inferior al nivel de referencia indica que el paciente sufre de una forma leve de disfunción diastólica y/o de una forma leve de dicha por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra es una muestra de sangre, suero o plasma y/o en el que el paciente es un ser humano.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el método comprende además las etapas a1) de medición del nivel de por lo menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mímecán, ácido úrico y GDF15 (factor 15 de diferenciación del crecimiento) en la muestra del paciente, y b1) la comparación del nivel con un nivel de referencia.

11. Método para la monitorización de la función diastólica y/o por lo menos un parámetro de disfunción diastólica, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 a) medición del nivel del biomarcador IGFBP7 (proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina) y, opcionalmente, por lo menos un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mimecán, ácido úrico y GDF15 (factor 15 de diferenciación del crecimiento) en una primera y en una segunda muestras de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, presentando dicho paciente una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) reducida, en el que dicha segunda muestra se ha obtenido después de la primera muestra, y
- 10 b) la comparación del nivel del biomarcador IGFBP7 y opcionalmente del nivel de dicho por lo menos un biomarcador adicional medido en la segunda muestra, con el nivel en la primera muestra, en el que el parámetro o parámetros de función diastólica se seleccionan de entre el grupo que consiste en tamaño de la aurícula izquierda, preferentemente el diámetro superior-inferior de la aurícula izquierda, índice del volumen de la aurícula izquierda, velocidad pico E, velocidad pico A, proporción E/A transmitral, proporción de velocidad de flujo de entrada mitral E a velocidad Doppler tisular E', proporción E'/A', velocidad pico sistólica de la vena pulmonar, velocidad pico diastólica de la vena pulmonar, proporción sistólica/diastólica de la vena pulmonar, superficie ventricular derecha incrementada, presión sistólica ventricular derecha (PSVD), dilatación ventricular derecha, tamaño auricular derecho, preferentemente el diámetro superior-inferior de la aurícula derecha, regurgitación mitral y regurgitación tricúspide.
12. Método según la reivindicación 11, en el que una reducción del nivel de IGFBP7 y, opcionalmente, de por lo menos un biomarcador adicional en la segunda muestra del paciente en comparación con la primera muestra es indicativo de mejora de la función diastólica y/o de mejora de por lo menos un parámetro de la función diastólica, y/o en el que un incremento del nivel de IGFBP7 y, opcionalmente, de por lo menos un biomarcador adicional en la segunda muestra del paciente en comparación con la primera muestra, es indicativo de deterioro de la función diastólica y/o de deterioro de por lo menos un parámetro de la función diastólica.
13. Utilización de:
- i) IGFBP7 como biomarcador, y/o
- ii) un agente que permite medir el nivel de IGFBP7, y opcionalmente
- 35 iii) osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mimecán, ácido úrico y/o GDF15 (factor 15 de diferenciación del crecimiento) a modo de por lo menos un biomarcador adicional, o
- iv) por lo menos un agente que permite medir el nivel de dicho por lo menos un biomarcador adicional,
- 40 en una muestra de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca y que presenta una fracción de eyección ventricular izquierdo reducido para el diagnóstico y/o gradación de la disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica, en el que la anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica se selecciona de entre el grupo que consiste en una proporción E'/A' incrementada, tamaño de aurícula izquierda incrementado, índice de volumen incrementado de la aurícula izquierda, velocidad del pico E incrementada, velocidad del pico A reducida, proporción E/A transmitral incrementada, proporción E/E' incrementado, velocidad pico sistólica de la vena pulmonar reducida, velocidad pico diastólica de la vena pulmonar reducida, proporción sistólica/diastólica de la vena pulmonar reducida, superficie ventricular derecha incrementada, presión sistólica ventrícula derecha (PSVD) incrementada, dilatación ventricular derecha incrementada, tamaño incrementado de la aurícula derecha, regurgitación mitral más que leve y regurgitación tricúspide más que leve.
- 45 o en una primera y en una segunda muestras de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca y que presenta una fracción de eyección ventricular izquierda reducida para la monitorización de la función diastólica y/o por lo menos un parámetro de la función diastólica, en el que por lo menos un parámetro de la función diastólica se selecciona de entre el grupo que consiste en tamaño auricular izquierdo, preferentemente el diámetro superior-inferior de la aurícula izquierda, índice del volumen auricular izquierdo, velocidad del pico E, velocidad del pico A, proporción E/A transmitral, proporción de velocidad de flujo de entrada mitral E a velocidad Doppler tisular E', proporción E'/A', velocidad pico sistólica de la vena pulmonar, velocidad pico diastólica de la vena pulmonar, proporción sistólica/diastólica de la vena pulmonar, superficie ventricular derecha incrementada, presión sistólica ventricular derecha (PSVD), dilatación ventricular derecha, tamaño de la aurícula derecha, preferentemente el diámetro superior-inferior de la aurícula derecha, regurgitación mitral y regurgitación tricúspide.
- 60
14. Dispositivo adaptado para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende:
- 65

- 5 a) una unidad analizadora que comprende un agente que se une específicamente al biomarcador IGFBP7 y opcionalmente un agente (o agentes) que permiten medir el nivel de por lo menos un biomarcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en osteopontina, una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP, endostatina, mímecán, ácido úrico y GDF15, estando adaptada dicha unidad a la medición del nivel o niveles de uno o más biomarcadores en una muestra de n paciente que sufre de insuficiencia cardíaca, presentando dicho sujeto una fracción de eyección ventricular izquierda reducida, y
- 10 b) una unidad analizadora (o unidad de evaluación) para comparar el nivel o niveles medidos con uno o más niveles de referencia, en la que la disfunción diastólica y/o por lo menos una anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica se diagnostica o se gradúa, comprendiendo dicha unidad una base de datos con uno o más niveles de referencia y un algoritmo para llevar a cabo la comparación,
- 15 en el que la anomalía estructural o funcional asociada a disfunción diastólica se selecciona de entre el grupo que consiste en una proporción E'/A' incrementada, un tamaño incrementado de la aurícula izquierda, un índice del volumen auricular izquierdo incrementado, velocidad incrementada del pico E, velocidad reducida del pico A, proporción E/A transmitral incrementada, proporción E/E' incrementada, velocidad pico sistólica de la vena pulmonar reducida, velocidad pico diastólica de la vena pulmonar incrementada, proporción sistólica/diastólica de la vena pulmonar reducida, superficie ventricular derecha incrementada,
- 20 presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) incrementada, dilatación ventricular derecha incrementada, tamaño incrementado de la aurícula derecha, regurgitación mitral más que leve y regurgitación tricúspide más que leve.
- 25 15. Utilización según la reivindicación 13 o el dispositivo según la reivindicación 14, en la que el agente es un anticuerpo que se une específicamente al biomarcador.

Figura 1

A)



B)

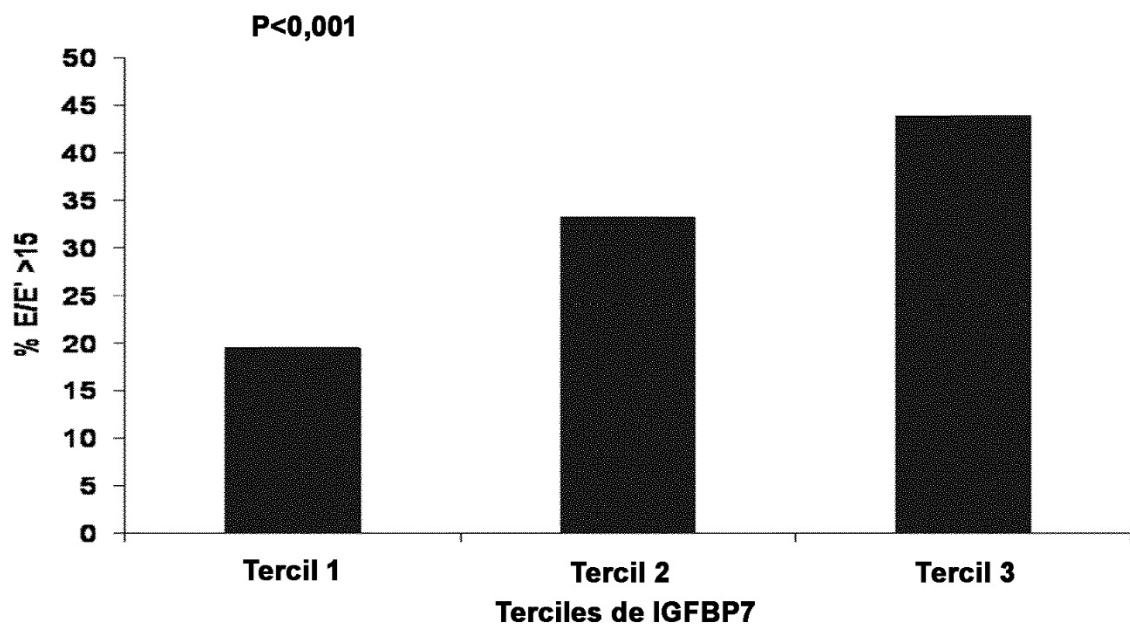
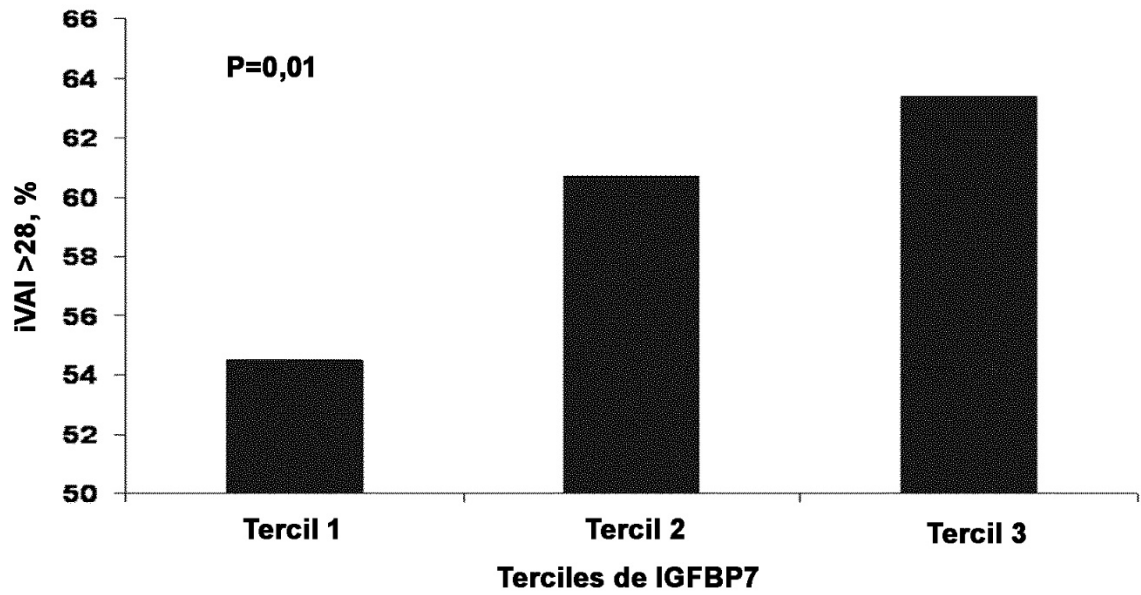


Figura 1 (continuación)

C)



D)

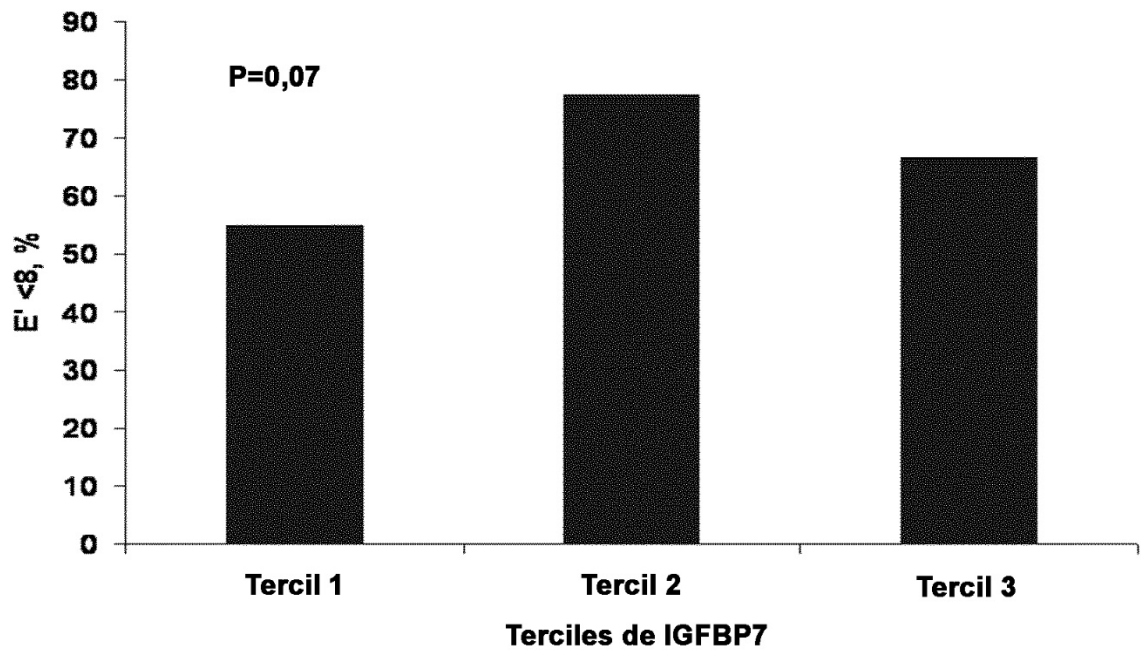


Figura 2

% tiempo transcurrido con IGFBP7 <117,8 ng/ml durante las mediciones de seguimiento

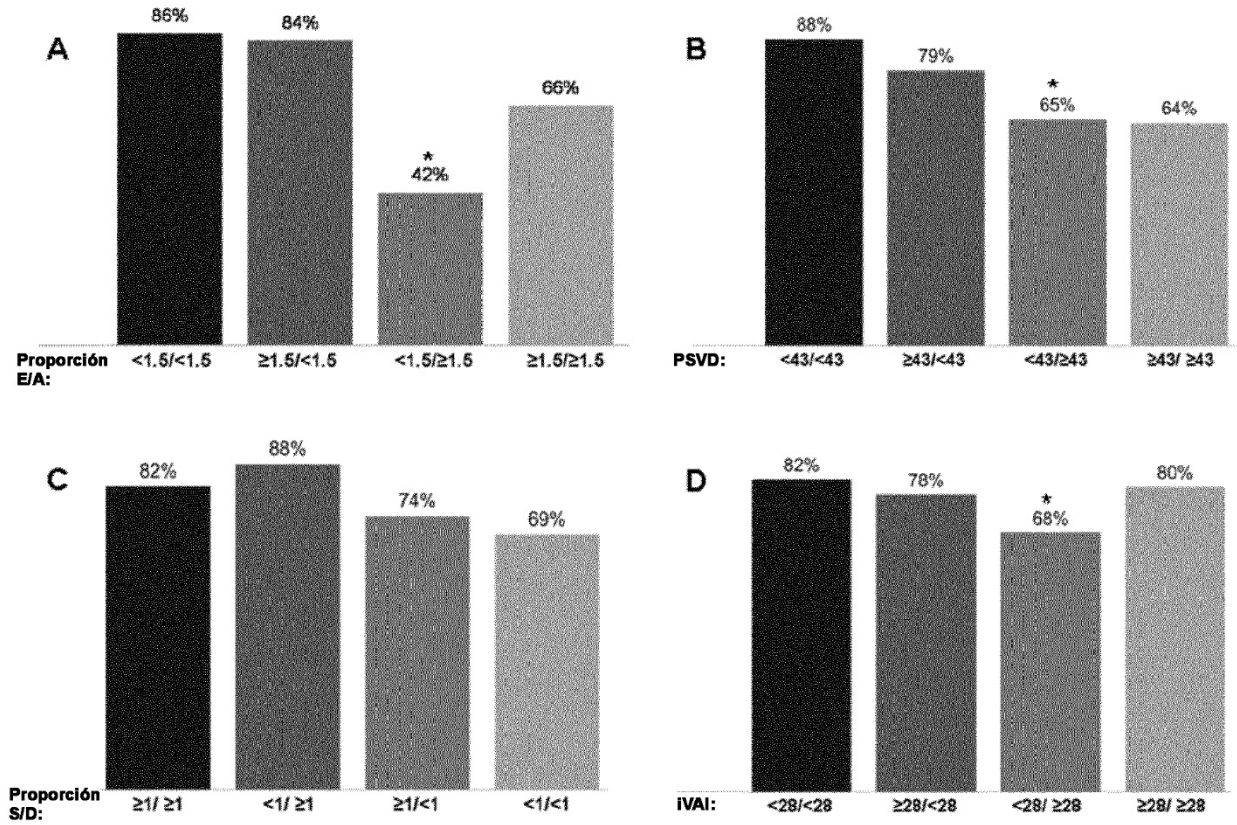
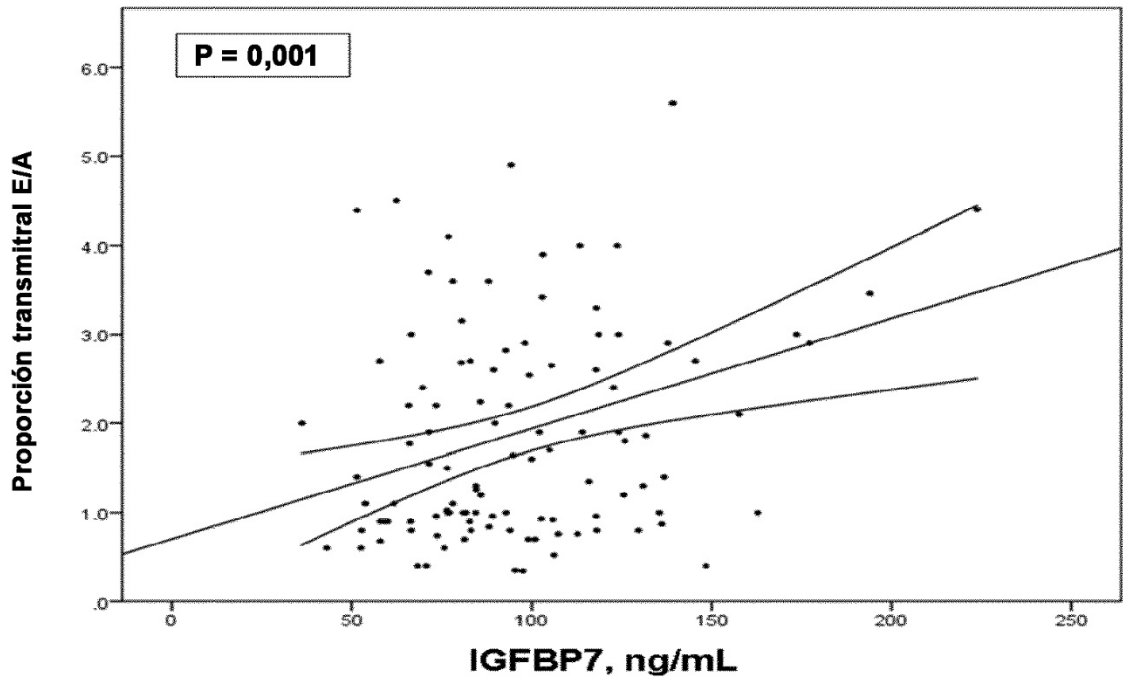


Figura 3

A)



B)

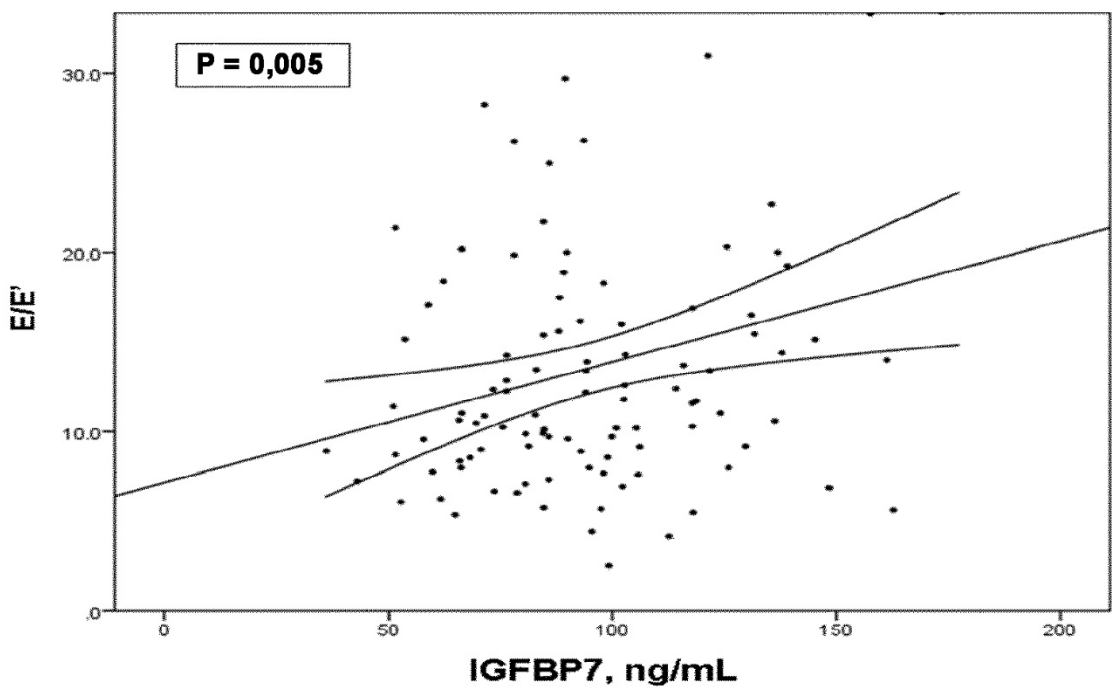
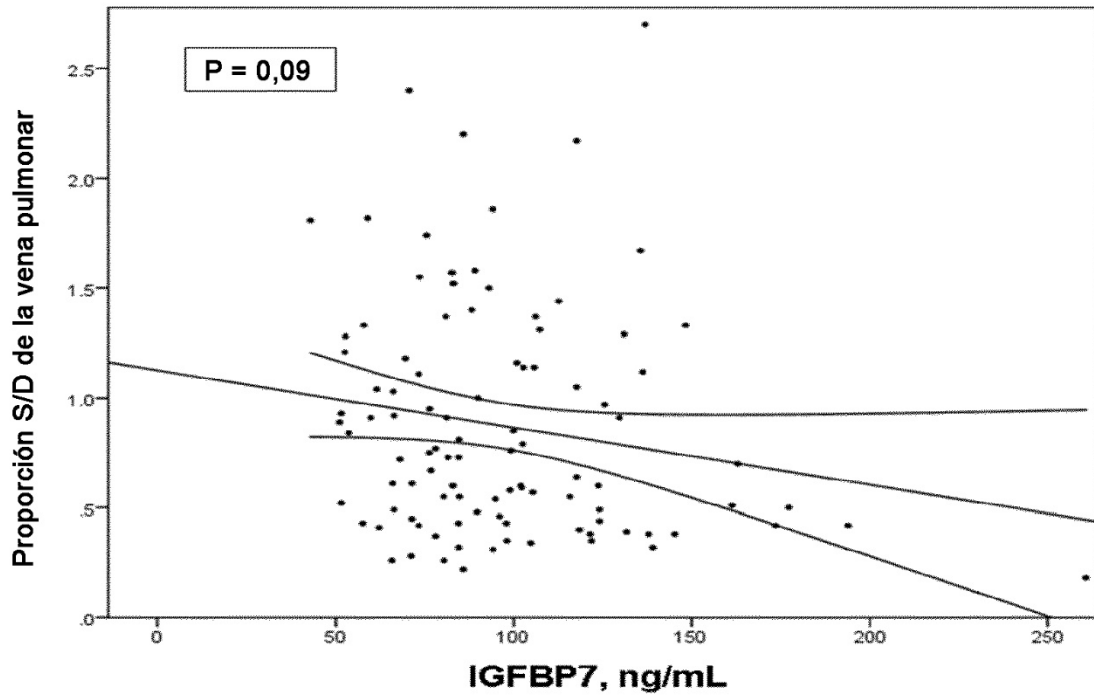


Figura 3 (continuación)

C)



D)

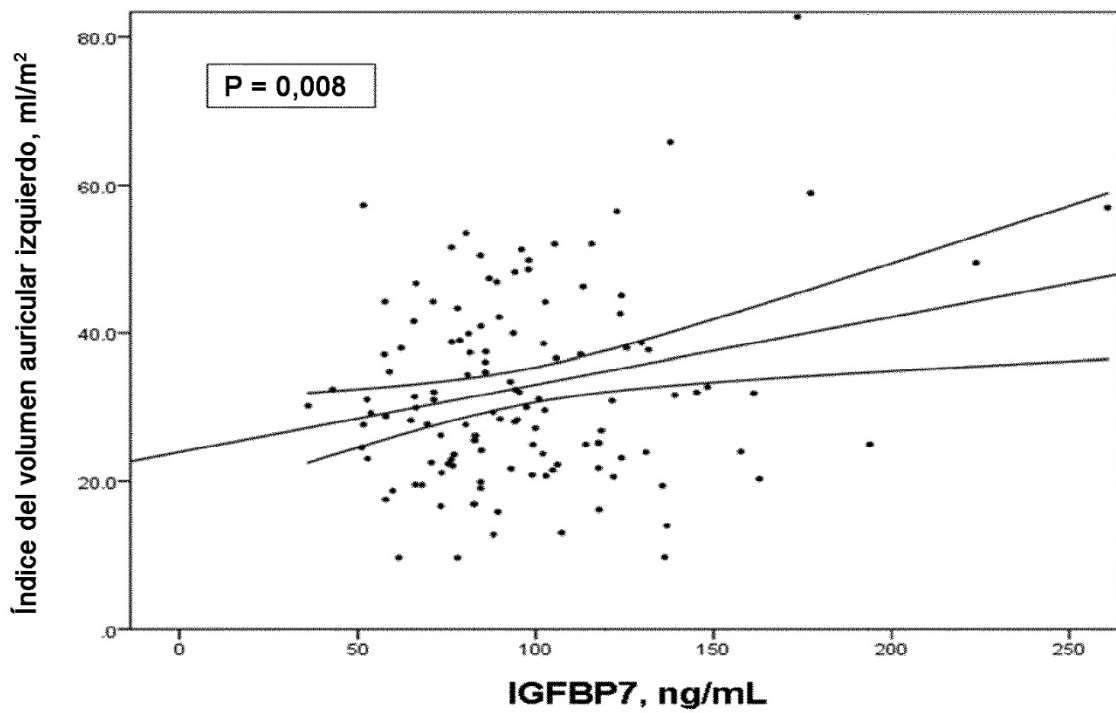


Figura 3 (continuación)

E)

