

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 149**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2013** **PCT/EP2013/056706**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014** **WO14040759**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013** **E 13713175 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2895866**

54 Título: **Identificación de pacientes con fracción de acortamiento anormal**

30 Prioridad:

12.09.2012 EP 12184085

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

04.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BLOCK, DIRK;
MASSON, SERGE;
WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE;
ZAUGG, CHRISTIAN y
LATINI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 680 149 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

Identificación de pacientes con fracción de acortamiento anormal

5 La presente invención se refiere a un método para predecir el riesgo de mortalidad en un sujeto que no muestra signos evidentes de insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 10 a) determinar, en una muestra de dicho sujeto, la cantidad de IGFBP7 y
b) comparar la cantidad según se ha determinado en la etapa a) con una cantidad de referencia, de manera que se predice el riesgo de mortalidad en dicho sujeto.

La presente invención se refiere además a un dispositivo adaptado para llevar a cabo el método, comprendiendo dicho dispositivo:

- 15 a) una unidad analizadora que comprende un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7 (y opcionalmente un agente de detección que se une específicamente a troponina cardíaca y/o a agente de detección que se une específicamente a un péptido natriurético cerebral), estando adaptada dicha unidad a la determinación de la cantidad o cantidades de los marcadores) en una muestra de un sujeto que no muestra signos evidentes de insuficiencia cardíaca, y
20 b) una unidad analizadora para comparar la cantidad o cantidades determinadas con una o más cantidades de referencia, de manera que se predice el riesgo de mortalidad, comprendiendo dicha unidad una base de datos con una cantidad (o cantidades) de referencia y un algoritmo implementado por ordenador para llevar a cabo la comparación.

25 La fracción de acortamiento de la pared miocárdica media (MFS, por sus siglas en inglés) y/o función ventricular diastólica anormales en un estado preclínico temprano durante la progresión a hipertrofia ventricular izquierda (HVI, por sus siglas en inglés) y la insuficiencia cardíaca así como en la isquemia miocárdica. La MFS es una medida de la función sistólica que identifica los pacientes hipertensos con evidencia de daños en el órgano diana, reserva contráctil alterada y mortalidad incrementada. Por lo tanto, la identificación de los sujetos con fracción de
30 acortamiento anormal resulta importante. En particular, la identificación permite iniciar un tratamiento preventivo apropiado antes de que se produzca la progresión no reversible de la hipertrofia ventricular izquierda o incluso la insuficiencia cardíaca.

La fracción de acortamiento puede reconocerse mediante la utilización de modalidades de obtención de imágenes (ver, p.ej., Honda T. et al., J. Cardiol. 39(3):141-50, marzo de 2002; Palmiero P. et al., Echocardiography 25(1):20-6, enero de 2008; Shimizu G. et al., Circulation 71:266-272, 1985). Sin embargo, la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal frecuentemente no se analiza o se pasa por alto. Lo anterior es cierto en particular en personas de edad avanzada. La evaluación de la fracción de acortamiento utilizando la ecocardiografía requiere instrumentos caros, técnicas especializadas de obtención de imágenes y la grabación de imágenes y habilidades de
40 interpretación expertas. La aplicación generalizada del cribado ecocardiográfico para la MFS anormal se ha visto limitada por consideraciones de coste-beneficio. Sin embargo, dicha desventaja podría superarse utilizando un biomarcador sanguíneo asociado a la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media.

Además, un método basado en biomarcadores resultaría útil para estratificar los pacientes para técnicas posteriores de obtención de imágenes, tales como la ecocardiografía o las imágenes de resonancia magnética.

El documento n° WO 2012/025355 describe un método de diagnóstico de anomalías funcionales y/o estructurales del corazón que preceden a la insuficiencia cardíaca en un sujeto portador de factores de riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca mediante la determinación de la cantidad de una troponina cardíaca y de IGFBP7.
50 Da a conocer que un nivel de troponina-T igual o superior a 3,5 pg/ml es indicativo de anomalías funcionales y/o estructurales del corazón que precede a la insuficiencia cardíaca. No se describen sujetos con fracción de acortamiento de la pared miocárdica media (MFS) <15%.

Saytan et al., (Am. J. Kidney Dis. 50(6): 1009-1019, diciembre de 2007) dan a conocer que una fracción de acortamiento de la pared miocárdica media bajo es una medida de una función sistólica pobre y que en pacientes de hemodiálisis asintomáticos, la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media baja era un correlato independiente de log NT-proPNC (p<0,01). Además, no se observó correlación significativa entre cTnT y mWFS (p=0,51).

60 Kitagawa et al., Nephron Extra 1(1): 166-177, 2011) da a conocer que PNC, así como troponina I hs puede utilizarse para detectar la disfunción diastólica ventricular izquierda en pacientes no diabéticos de enfermedad renal crónica.

El factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23, por sus siglas en inglés) es una hormona de 32 kDa secretada a la sangre a partir de osteocitos del hueso. Sus dos funciones son inducir la excreción urinaria de fósforo e inhibir la activación de la vitamina D; ambas acciones se producen en los túbulos proximales del riñón. Las concentraciones elevadas de FGF-23 circulante se observan en pacientes con enfermedad renal de estadio terminal. La hormona es

una pieza clave en la regulación del metabolismo del calcio-fosfato y de la vitamina D y presenta una función causal en la patogénesis de la hipertrofia del VI, un determinante principal de los sucesos cardiovasculares.

Kirkpantur et al., *Nephrol. Dial. Transplant* 26: 1346-1354, 2011) dan a conocer que los niveles de FGF-23 están asociados a un índice de masa ventricular izquierda (IMVI, por sus siglas en inglés) y un índice de rendimiento miocárdico incrementados en pacientes de diálisis (ver la Tabla 2). Los sujetos con fracción de acortamiento anormal <15% no fueron examinados (ver la Tabla 2; todos los sujetos con FC=fracción de acortamiento de aproximadamente 30%).

Mirzaa et al. (*Mirzaa Atherosclerosis* 207:546-551, 2009) dan a conocer una asociación entre los niveles séricos elevados de FGF-23 y una masa ventricular izquierda incrementada, hipertrofia ventricular izquierda y forma geométrica ventricular izquierda y riesgo incrementado de presencia de hipertrofia ventricular izquierda en sujetos de edad avanzada que es más pronunciada en pacientes con enfermedades renales (eGFR<60 ml/min).

Faul et al., *J. Clin. Invest.* 121(11): 4393-4408, 2011, examinaron la función causal de FGF-23 en la patogénesis de la HVI en modelos animales y sugieren que los niveles de FGF-23 crónicamente elevados contribuyen directamente a tasas elevadas de hipertrofia ventricular izquierda y mortalidad. Se da a conocer además una asociación entre los niveles séricos elevados de FGF-23 y la prevalencia de hipertrofia ventricular izquierda en el ser humano y que los niveles incrementados de FGF-23 preceden al desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda en seres humanos con enfermedad renal crónica. Se describe además un método para predecir el riesgo de un paciente de sufrir de hipertrofia ventricular izquierda en el futuro basado en la detección de FGF-23.

Gutiérrez et al., *Circulation* 119(19): 2545-2552, 19 de mayo de 2009, dan a conocer que las concentraciones de FGF-23 se encuentran significativamente asociadas a IMVI incrementada. Las concentraciones log FGF-23 crecientes también se encuentran significativamente asociadas a la presencia de hipertrofia ventricular izquierda.

Taddei et al., *Heart Fail Rev.* 16:615-620, 2011, dan a conocer deficiencia de vitamina D, es decir, niveles reducidos de vitamina D, como factores de riesgo de HVI en pacientes de enfermedad renal crónica.

Palmiero et al., *Echocardiography* 25(1):20-6, enero de 2008, dan a conocer que la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media es un signo temprano importante de disfunción ventricular en pacientes hipertensos, aunque la función diastólica es normal.

Ix et al., *J. Am. College of Cardiol.*, 2012, dan a conocer que puede utilizarse FGF-23 como factor predictivo en sujetos de la población.

El sistema IGFBP desempeña un papel importante en el crecimiento y diferenciación celulares. La proteína 7 de unión a IGF (=IGFBP-7) 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 ha sido denominada FSTL2, IBP7, proteína I relacionada con la proteína de unión a IGF, IGFBP 7, IGFBP 7v, IGFBP rP1, IGFBP7, IGFBPRP1, precursor de la proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, MAC25, proteína MAC25, factor estimulante PGI2 y PSF o factor estimulante de prostaciclina. Se detectaron niveles bajos de IGFB-7 en sueros humanos aleatorios y se han observado niveles séricos incrementados asociados a resistencia a la insulina (López-Bermejo A. et al., *J. Clinical Endocrinology and Metabolism* 88:3401-3408, 2003; López-Bermejo A. et al., *Diabetes* 55:2333-2339, 2006).

El documento n° 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.

Motiwalla 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).

El mimecán (frecuentemente también denominado "osteoglicina") es un componente multifuncional de la matriz extracelular. Se ha demostrado que el mimecán participa en la regulación de la fibrillogénesis 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. Los análisis del transcriptoma en tejido de rata y humano ha revelado una elevada correlación entre el mimecán y la masa ventricular izquierda, así como un remodelado extracelular en la cardiomiopatía dilatada (Petretto E. et al., *Nature Genetics* 40:546-552, 2008).

El documento n° WO2011/012268 da a conocer que el mimecán puede utilizarse como marcador para la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

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. 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 Werb Z., Journal of Cell Science 115:4201-4214, 2002). La endostatina es un potente inhibidor de la angiogénesis y el crecimiento de los vasos sanguíneos. El documento n° WO2010/124821 da a conocer que la endostatina puede utilizarse como marcador para la evaluación de la insuficiencia cardíaca.

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

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

Método para evaluar si un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes

La presente exposición se refiere a un método para evaluar si un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes, que comprende las etapas de:

- a) determinar la cantidad o cantidades de una troponina cardíaca y/o factor de crecimiento fibroblástico (FGF-23) en una muestra del sujeto y
- b) comparar la cantidad o cantidades determinadas de esta manera con una cantidad de referencia (cantidades de referencia), de manera que se evalúa si el sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Preferentemente, se evalúa si el sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes llevando a cabo la etapa adicional de c) evaluar si el sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes, basada en los resultados de la comparación llevada a cabo en la etapa b).

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) pueden estar asistidas 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).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente exposición preferentemente también se refiere a un sistema para evaluar si un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes, que comprende:

- a) una unidad analizadora configurada para entrar en contacto, in vitro, con una parte de una muestra de un sujeto con un ligando que comprende una afinidad de unión específica para una troponina cardíaca y/o con un ligando que comprende una afinidad de unión específica para FGF-23,
- b) una unidad analizadora configurada para detectar una señal de una parte de la muestra del sujeto puesta en contacto con el ligando o ligandos,
- c) un dispositivo informático que presenta un procesador en comunicación operable con dichas unidades de análisis, y
- d) un medio legible por máquina no transitorio que incluye una pluralidad de instrucciones ejecutables por el procesador; las instrucciones, al ejecutarlas calcular la cantidad o cantidades de la troponina cardíaca y/o FGF-23, y compara la cantidad o cantidades con una cantidad de referencia (cantidades de referencia), evaluando de esta manera si el sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

El término "evaluar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a determinar si un sujeto tal como se indica en la presente memoria debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes o no. De esta manera, llevando a cabo el método de la presente invención, puede estratificarse si un sujeto tal como se indica en la presente memoria debe someterse a evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes o no. Llevando a cabo el método de la presente invención, p.ej., pueden identificarse los sujetos que no deberían someterse a dichas evaluaciones diagnósticas. Debido a que dichas evaluaciones requieren instrumentación cara, técnicas especializadas de obtención de imágenes y la grabación de imágenes y habilidades de interpretación expertas, pueden evitarse costes innecesarios de atención sanitaria. Un sujeto susceptible de evaluación basada en la obtención de imágenes preferentemente es un sujeto que presenta una probabilidad incrementada de sufrir de disfunción sistólica y/o diastólica. De esta manera, el sujeto requiere una evaluación diagnóstica basada en la

obtención de imágenes. En particular, un sujeto que es susceptible de evaluación basada en la obtención de imágenes preferentemente es un sujeto que presenta una probabilidad incrementada de sufrir de una fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal. Un sujeto que no es susceptible de evaluación basada en la obtención de imágenes preferentemente es un sujeto que presenta una probabilidad reducida de sufrir de disfunción sistólica y/o diastólica. De esta manera, el sujeto no requiere una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. En particular, un sujeto que no es susceptible de evaluación basada en la obtención de imágenes preferentemente es un sujeto que presenta una probabilidad reducida de sufrir de una fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal.

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 evaluados. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de sujetos sea evaluada correctamente. Si una evaluación es correcta puede confirmarse mediante métodos bien conocidos de la técnica. Además, si una parte es estadísticamente significativa puede ser determinado sin hacer ninguna otra referencia por el experto en la materia utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidos, 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.

De acuerdo con el método de la presente exposición, debe evaluarse si el sujeto que debe someterse a ensayo debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Preferentemente, la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes presenta el objetivo de generar fotografías del corazón. De esta manera, la evaluación es una evaluación del corazón. Más preferentemente, la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes es la ecocardiografía o las imágenes de resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés). La evaluación diagnóstica más preferente es la ecocardiografía.

Las técnicas anteriormente indicadas de obtención de imágenes son bien conocidas de la técnica. El término "ecocardiografía" tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente se refiere a la evaluación de la estructura y función cardíacas con imágenes y grabaciones producidas mediante ultrasonidos. Preferentemente, el término incluye la ecocardiografía unidimensional, bidimensional y tridimensional. Además, se encuentra contemplado que el término "ecocardiografía" incluya la ecocardiografía transtorácica, la ecocardiografía de esfuerzo y la ecocardiografía de contraste. En una realización particularmente preferente, la ecocardiografía es ecocardiografía de modo M.

La obtención de imágenes de resonancia magnética es una técnica de obtención de imágenes médicas utilizada en radiología para visualizar estructuras internas del cuerpo en detalle. Mediante MRI, se analiza la absorción y transmisión de ondas de radio de alta frecuencia a medida que irradian los átomos de hidrógeno en las moléculas de agua y otros componentes de los tejidos sometidos a un campo magnético fuerte. La expresión "obtención de imágenes de resonancia magnética" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la obtención de imágenes de resonancia magnética cardíaca (frecuentemente también denominada obtención de imágenes de resonancia magnética cardiovascular). La evaluación diagnóstica basada en imágenes se utiliza para diagnosticar la disfunción diastólica o la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes se utiliza para diagnosticar la disfunción sistólica.

La expresión "disfunción diastólica" es bien entendida por el experto en la materia. Preferentemente, el término se refiere a una función reducida de bombeo 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. La expresión "disfunción sistólica" también 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. Preferentemente, la disfunción sistólica y/o diastólica no se ve acompañada de signos evidentes de insuficiencia cardíaca. También preferentemente, la disfunción sistólica y/o diastólica no debe estar acompañada de hipertrofia ventricular izquierda.

En un ejemplo particularmente preferente, la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes para la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal, en particular la fracción de acortamiento ventricular izquierda anormal.

La expresión "fracción de acortamiento de la pared miocárdica media" es bien conocida de la técnica (abreviada en la presente memoria como "MFS"). Es bien conocido de la técnica que la MFS ventricular izquierda (VI) reducida es un signo temprano de disfunción del VI. Preferentemente, la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media se considera como anormal en el caso de que sea inferior a 15%. Este punto umbral ha sido utilizado como valor de referencia en la fijación de IC y ha demostrado relevancia pronóstica en sujetos hipertensos (ver Murredu et al., *European Journal of Heart Failure* 14:718-729, 2012). También preferentemente, la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media se considera como anormal en el caso de que sea inferior a 14% o 13%. Además, la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media se considera normal en el caso de que sea superior (o igual

a) 15%. También preferentemente, la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media se considera normal en el caso de que sea superior a 16% o 17%.

La fracción de acortamiento de la pared miocárdica media puede calcularse mediante métodos bien conocidos. Por ejemplo, puede calcularse a partir del modelo de dos cuerpos cilíndricos descrito por Shimizu et al. (Shimizu G., Hirota Y., Kita Y., Kawamura K., Saito T., Gaasch W.H., Left ventricular midwall mechanics in systemic arterial hypertension. *Circulation* 83:1676-84, 1991). Dicho método es un refinamiento del método convencional de pared miocárdica media y proporciona datos que reflejan el acortamiento de una fibra o anillo circunferencial teórica de la pared media del miocardio. Supone una masa constante del ventrículo izquierdo durante todo el ciclo cardíaco y no requiere suponer que las fracciones de engrosamiento de la pared interna y externa son iguales.

La determinación de la MFS también es descrita por Mayet et al. o en artículos anteriores de Shimizu et al. (ver, p.ej., Mayet et al., *Hipertensión*, 36: 755-759, 2000; Shimizu G., Zile M.R., Blaustein A.S., Gaasch W.H., Left ventricular chamber filling and midwall fiber lengthening in patients with left ventricular hypertrophy: overestimation of fiber velocities by conventional midwall measurements, *Circulation* 71:266-272, 1985, o Shimizu G., Conrad C.H., Gaasch W.H., Phase-plane analysis of left ventricular chamber filling and midwall fiber lengthening in patients with left ventricular hypertrophy, *Circulation* 75(suppl I):I-34-I-39, 1987). Además, la determinación de la MFS ha sido descrita por de Simone et al. (*JACC* 23(6): 1444-51, 1994). Preferentemente, la MFS tal como se utiliza en la presente memoria se determina según el método descrito por Shimizu en 1987 y en 1985, más preferentemente la MFS se determina según Mayet et al., más preferentemente la MFS se determina según de Simone.

El término "sujeto" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y más preferentemente, seres humanos. El sujeto en el contexto de la presente invención puede ser masculino o femenino. Además, se encuentra particularmente contemplado que el sujeto sea de más de 65 años.

En un ejemplo preferente, el sujeto no sufre de hipertrofia ventricular izquierda. En particular, se encuentra particularmente contemplado que el sujeto presente una masa ventricular izquierda normal.

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. Se dan a conocer, p.ej., criterios particularmente preferentes para el diagnóstico de HVI en las directrices (Mancia et al., *European Heart J.* 28: 1462, 2007). También preferentemente, los criterios pueden obtenerse de las directrices de ACC/AHA para la evaluación y control de la insuficiencia cardíaca crónica en el adulto, *J. Am. Coll. Cardiol.* 38:2101-2113, 2001.

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 observada en pacientes que sufren de hipertensión arterial (es decir, presión sanguínea elevada) es una enfermedad que requiere tratamiento. En el contexto de la presente exposición, las anomalías funcionales y/o estructurales del corazón típicamente preceden a la hipertrofia ventricular izquierda y/o a la insuficiencia cardíaca.

La hipertrofia como respuesta a la postcarga incrementada asociada a una resistencia vascular sistémica elevada resulta necesaria y protectora hasta un punto determinado. Más allá de este punto, una diversidad de disfunciones acompaña a la HVI, incluyendo una capacidad menor de vasodilatación coronaria, una mecánica deprimida de la pared del ventrículo izquierdo y un patrón de llenado diastólico anormal del ventrículo izquierdo.

Preferentemente, un sujeto masculino sufre de HVI en el caso de que su índice de masa ventricular izquierda (y, de esta manera, la proporción de masa ventricular izquierda a superficie corporal, abreviadamente IMVI) es superior a 105 g/m^2 , más preferentemente es superior a 110 g/m^2 , y lo más preferentemente, es superior a 115 g/m^2 (o en particular, superior a 116 g/m^2). Preferentemente, un sujeto femenino sufre de HVI en el caso de que la IMVI sea superior a 85 g/m^2 , todavía más preferentemente es superior a 90 g/m^2 y lo más preferentemente es superior a 96 g/m^2 .

Tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, el sujeto preferentemente presenta una masa ventricular izquierda normal. En el caso de que el sujeto sea masculino, se aplica lo siguiente: se considera que un sujeto presenta una masa ventricular izquierda normal en el caso de que el índice de masa ventricular izquierda del sujeto masculino sea preferentemente igual o inferior a 105 g/m^2 , o más preferentemente, igual o inferior a 110 g/m^2 , o lo más preferentemente, igual o inferior a 115 g/m^2 (o en particular igual o inferior a 116 g/m^2). En el caso de que el sujeto sea femenino, se aplica lo siguiente: se considera que un sujeto presenta una masa ventricular izquierda normal en el caso de que el índice de masa ventricular izquierda del sujeto masculino sea preferentemente igual o inferior a 85 g/m^2 , o más preferentemente, igual o inferior a 90 g/m^2 , o lo más preferentemente, igual o inferior a 96 g/m^2 . Debe entenderse que un sujeto que presenta una masa ventricular izquierda normal no sufre de HVI.

Preferentemente, la IMVI se determina tal como dan a conocer Lang et al. (Recommendations for chamber quantification. Eur. J. Echocardiogr. 7:79-108, 2006).

En un ejemplo preferente, el sujeto sufre de hipertensión. La hipertensión puede ser cualquier forma de hipertensión conocida por el experto en la materia. En una realización preferente de la presente invención, el individuo sufre de hipertensión arterial, hipertensión sistólica y/o diastólica. En particular, el sujeto sufre de hipertensión arterial. Preferentemente, un sujeto sufre de hipertensión arterial en el caso de que la presión sistólica exceda de 140 mmHg y/o que la presión diastólica exceda de 90 mmHg . Más preferentemente, un sujeto sufre de hipertensión arterial en el caso de que la presión sistólica exceda de 140 mmHg y/o que la presión diastólica exceda de 90 mmHg durante tres meses o más, seis meses o más, doce meses o más, dos años o más, tres años o más, o cinco años o más. Preferentemente, una presión sanguínea temporalmente elevada, p.ej. causada por el ejercicio físico, no se encuentra comprendida en la expresión "hipertensión arterial".

La hipertensión puede estar acompañada de factores de riesgo de desarrollo de insuficiencia cardíaca. Factores de riesgo preferentes de desarrollo de insuficiencia cardíaca, daños orgánicos subclínicos, p.ej. del corazón, cerebro, riñones, vasos sanguíneos; obesidad, preferentemente obesidad definida como índice de masa corporal $\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$; obesidad; síndrome metabólico; diabetes mellitus de tipo 1 o de tipo 2, en particular diabetes mellitus de tipo 2; diabetes de tipo 1 con microalbuminuria, tabaquismo de cigarrillos; historia de revascularización; historia de terapia farmacológica o abuso de sustancias cardiotóxicas; dislipemia; colesterol total, proporción colesterol total/HDL-colesterol, historia personal de fiebre reumática e historia familiar de cardiomiopatía. De esta manera, pueden sufrir de hipertensión acompañada de uno o más de los factores de riesgo adicionales indicados anteriormente. Sin embargo, también se encuentra contemplado que dicho sujeto sufra de solo hipertensión.

Además, se encuentra adicionalmente contemplado que el sujeto no sufra de SCA (síndrome coronario agudo). El término "SCA" tal como se utiliza en la presente memoria incluye STEMI (por sus siglas en inglés, infarto de miocardio con elevación de ST), NSTEMI (por sus siglas en inglés, infarto de miocardio sin elevación de ST) y angina de pecho inestable. Se encuentra adicionalmente contemplado que el sujeto que debe someterse a ensayo no presente una historia de SCA. En particular, el sujeto no ha sufrido de SCA en el mes anterior a llevar a cabo el método de la presente invención (para ser más exactos, dentro del mes anterior a la obtención de la muestra).

También se encuentra contemplado que el sujeto no sufra de enfermedad arterial coronaria. La expresión "enfermedad arterial coronaria", abreviadamente EAC, frecuentemente también denominada enfermedad cardíaca coronaria (ECC) o enfermedad cardíaca aterosclerótica, es conocida por el experto en la materia. Preferentemente, el término se refiere a una condición en la que los vasos sanguíneos que suministran sangre y oxígeno al corazón se encuentran estrechados. La enfermedad arterial coronaria habitualmente está causada por una condición denominada aterosclerosis, que se produce al acumularse material lipídico y una sustancia denominada placa sobre las paredes de las arterias. Lo anterior causa que se estrechen. En particular, la EAC es el resultado de la acumulación de placas ateromatosas dentro de las paredes de las arterias que suministran al miocardio (el músculo del corazón). Preferentemente, un sujeto que sufre de EAC presenta una estenosis de por lo menos 50% (y, de esta manera, una oclusión de por lo menos 50%) en por lo menos una arteria coronaria mayor. De esta manera, un sujeto que no sufre de EAC preferentemente presenta menos de 50% de estenosis en las arterias coronarias mayores. Cómo evaluar el grado de oclusión de una arteria coronaria es bien conocido de la técnica, preferentemente el grado se evalúa mediante angiografía coronaria. Aunque los síntomas y signos de enfermedad arterial coronaria se observan en el estado avanzado de la enfermedad, la mayoría de individuos con enfermedad arterial coronaria no muestran evidencia de enfermedad durante décadas, a medida que la enfermedad progresa hasta la primera aparición de síntomas de un suceso agudo, con frecuencia un ataque de corazón "súbito".

Además, la sujeto no debe encontrarse embarazada. Además, el sujeto, preferentemente, no es un atleta.

Se encuentra adicionalmente contemplado que el sujeto no sufra de insuficiencia cardíaca y/o que no muestre síntomas evidentes de insuficiencia cardíaca.

La expresión "insuficiencia cardíaca" tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente se refiere a una función sistólica y/o diastólica deteriorada del corazón que se ve acompañada por signos evidentes de insuficiencia cardíaca tal como es conocida por el experto en la materia. Preferentemente, la insuficiencia cardíaca a la que se hace referencia en la presente memoria es la insuficiencia cardíaca crónica. La insuficiencia cardíaca según la

presente invención incluye la insuficiencia cardíaca evidente y/o avanzada. En la insuficiencia cardíaca evidente, el sujeto muestra síntomas de insuficiencia cardíaca tal como es conocida por el experto en la materia. Se encuentra particularmente contemplado que la expresión "insuficiencia cardíaca" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los estadios C y D de la clasificación de ACC/AHA. En estos estadios, el sujeto muestra síntomas típicos de insuficiencia cardíaca, es decir, el sujeto aparentemente no es sano. El sujeto con insuficiencia cardíaca y que se clasifica en el estadio C o D se ha sometido a cambios estructurales y/o funcionales permanentes, no reversibles, en el miocardio y, como consecuencia de estos cambios, no resulta posible una restauración completa de la salud.

La clasificación de 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 4 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.

En una realización preferente de la presente invención, el sujeto que debe someterse a ensayo se clasifica como sujeto en estadio B (según la clasificación de ACC/AHA tal como se ha indicado anteriormente). De esta manera, el sujeto no muestra signos evidentes de insuficiencia cardíaca. En el caso de que el sujeto se clasifique como sujeto en estadio B, el sujeto preferentemente presenta una masa ventricular izquierda normal tal como se especifica en otros sitios en la presente memoria en mayor detalle.

Además, se encuentra contemplado que el sujeto en el contexto de la presente invención no presente una función renal deteriorada. Preferentemente, el sujeto no sufrirá de insuficiencia renal, en particular el sujeto no sufrirá de insuficiencia renal aguda, crónica y/o de estadio terminal. Además, el sujeto, preferentemente, no sufre de hipertensión renal. Cómo evaluar si un paciente muestra una función renal deteriorada 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 deteriorada 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.

En el caso de que el método de la presente invención comprenda la determinación de la cantidad de FGF-23 (y vitamina D), el sujeto, preferentemente, no muestra deficiencia de vitamina D.

Además, resulta preferente que el sujeto en el contexto del método de evaluación de si un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes, el método de diagnóstico de MFS anormal y el método de predicción del riesgo de mortalidad no presente niveles incrementados de un péptido natriurético. Preferentemente, el sujeto no presenta niveles incrementados de un péptido natriurético cerebral. Más preferentemente, el sujeto no presenta niveles incrementados de un péptido natriurético de tipo PNC. Más preferentemente, el sujeto no presenta niveles incrementados de NT-proPNC. Preferentemente, el sujeto presenta un nivel de NT-proPNC inferior a 125 pg/ml para una edad <75 años, 450pg/ml para una edad ≥75 años, o más preferentemente, inferior a 100 pg/ml para una edad < 75 años, 300 pg/ml para una edad ≥ 75 años, en particular en una muestra de sangre, suero o plasma.

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, preferentemente, muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferentemente muestras de sangre, plasma o suero. 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. Preferentemente, las muestras de células, tejidos u órganos se obtienen de dichas células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos a los que se hace referencia en la presente memoria.

La expresión "troponina cardíaca" se refiere a todas las isoformas de troponina expresadas en las células del corazón y, preferentemente, las células subendocárdicas. Dichas isoformas se encuentran bien caracterizadas en la técnica, tal como se indica en, p.ej., Anderson, *Circulation Research* 76(4): 681-686, 1995 y en Ferrieres, *Clinical Chemistry* 44: 487-493, 1998. Preferentemente, la troponina cardíaca se refiere a la troponina T y/o a la troponina I y, más preferentemente, a la troponina T. Debe entenderse que las isoformas de las troponinas pueden determinarse en el método de la presente invención juntas, es decir, simultánea o secuencialmente, o individualmente, es decir, sin determinar en absoluto la otra isoforma. Las secuencias de aminoácidos de la troponina T humana y de la troponina I humana se dan a conocer en Anderson, *loc cit* y en Ferrieres, *Clinical Chemistry* 44: 487-493, 1998.

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 (en particular a lo largo de la longitud completa).

Preferentemente, el grado de identidad debe determinarse mediante comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la que el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (p.ej., huecos o extremos protuberantes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se observa el residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el número por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman, *Add. Appl. Math.* 2:482, 1981; mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para la comparación, preferentemente se utilizan GAP y BESTFIT para determinar la alineación óptima y, de esta manera, el grado de identidad. Preferentemente se utilizan los valores por defecto de 5,00 para el peso de hueco y de 0,30 para el peso de longitud de hueco. 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 cantidad de 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: 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).

5 Preferentemente, la troponina cardíaca es la troponina T, en particular la troponina T humana. Preferentemente, la cantidad de troponina T se determina mediante la utilización de un ensayo de troponina altamente sensible tal como se indica en los Ejemplos o en el documento n° WO2012/025355.

10 El factor de crecimiento fibroblástico 23 (abreviadamente, "FGF-23") es una pieza clave en la regulación del metabolismo del calcio-fosfato y de la vitamina D y presenta una función causal en la patogénesis de la hipertrofia del VI, un determinante principal de los sucesos cardiovasculares. El factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) es una hormona de 32 kDa secretada a la sangre a partir de osteocitos del hueso. Sus dos funciones son inducir la excreción urinaria de fósforo e inhibir la activación de la vitamina D; ambas acciones se producen en los túbulos
15 proximales del riñón. Las concentraciones elevadas de FGF-23 circulante se observan en pacientes con enfermedad renal de estadio terminal. Preferentemente, FGF-23 es FGF-23 humana. La secuencia de la FGF-23 humana es bien conocida de la técnica, p.ej., la secuencia de aminoácidos puede evaluarse mediante el número de acceso GenBank NM_020638.1, GI: 10190673. Además, la secuencia también se da a conocer en Shimada et al., PNAS 98(11):6500 a 6505, 2001. El término "FGF-23" comprende también variantes de la FGF-23 anteriormente indicada. Dichas
20 variantes presentan por lo menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que la FGF-23 específica. 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 dicho FGF-23. Además, debe entenderse que una variante a la que se hace referencia según la
25 presente invención presentará una secuencia de aminoácidos que difiere en 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
30 menos aproximadamente 98% o por lo menos aproximadamente 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de FGF-23 (en particular a lo largo de la longitud completa). Cómo calcular el grado de identidad se da a conocer en otros sitios en la presente memoria. Preferentemente, FGF-23 se determina mediante la utilización del kit ELISA de la FGF-23 humana (C-term.) de Immutopics, Inc. (que se distribuye, p.ej., bajo el n° de cat. 60-6100).

35 La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido, en particular un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste en una troponina cardíaca, el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23), la IGFBP7 (proteína 7 de unión a IGF), la GDF-15, la endostatina y el mimecán, a los que se hace referencia en la presente memoria, se refiere a la medición de la cantidad o concentración, preferentemente semicuantitativa o cuantitativa. La medición puede llevarse a cabo directa o indirectamente. La medición directa se refiere a medir la cantidad o la
40 concentración del péptido o polipéptido basándose en una señal que se obtiene del péptido o polipéptido mismo y la intensidad de la cual se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presentes en la muestra. Dicha señal, en ocasiones denominada en la presente memoria señal de intensidad, puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química concreta del péptido o polipéptido. La medición indirecta incluye medir una señal obtenida de un componente secundario, (es decir, un componente que no es el
45 péptido o polipéptido mismo), o un sistema de lectura biológico, por ejemplo respuestas celulares medibles, ligandos, marcajes o productos de reacción enzimática.

Según la presente invención, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido puede llevarse a cabo mediante todos los medios conocidos de determinación de la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden inmunoensayos y métodos que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de tipo
50 sándwich, competitivos u otros formatos de ensayo. Dichos ensayos se basan preferentemente en agentes de detección, tales como anticuerpos que reconocen específicamente el péptido o polipéptido que debe determinarse. Los agentes de detección pueden ser capaces directa o indirectamente de generar una señal que indica la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la intensidad de la señal puede, preferentemente, correlacionarse
55 directa o indirectamente (por ejemplo es inversamente proporcional) a la cantidad del polipéptido presente en una muestra. Los métodos adecuados adicionales comprenden 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, preferentemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos cromatográficos. Además, entre los
60 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).

65 Preferentemente, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido comprende las e tapas 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 la cantidad del péptido o polipéptido.

También preferentemente, determinar la cantidad 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.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido puede, preferentemente, comprender las etapas de: (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido, es decir, el complejo del ligando formado en la etapa (a). Según una realización preferente, dichas etapas de poner en contacto, eliminar y medir 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 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.

El ligando unido, es decir, el ligando o el complejo de ligando/péptido, generará una señal de intensidad. La unión según la presente invención incluye la unión tanto covalente como no covalente. Un ligando según la presente invención puede ser cualquier compuesto, por ejemplo un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña, de unión al péptido o polipéptido descrito en la presente memoria. Entre los ligandos preferentes se incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos, tales como receptores o 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 aptámeros de ácidos nucleicos o peptídicos. Los métodos para preparar dichos ligandos 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 resultarán familiares los métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos de afinidad o especificidad más elevada. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. A 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 monocatenarios y anticuerpos híbridos humanizados en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que muestra 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 híbridos pueden prepararse mediante varios métodos bien conocidos de la técnica.

Preferentemente, el ligando o agente 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 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 ligante puede medirse mediante cualquier método conocido de la técnica. Preferentemente, dicho método es semicuantitativo o cuantitativo. Se describen a continuación técnicas adecuadas adicionales para la determinación de un polipéptido o péptido.

La unión de un ligando puede medirse directamente, p.ej. mediante RMN o resonancia del plasmón superficial. La medición de la unión de un ligando, según realizaciones preferentes, se lleva a cabo con una 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 ligando también sirva de sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse un producto de la reacción enzimática (por ejemplo la cantidad de una proteasa puede medirse mediante la determinación de la cantidad de sustrato cortado, por ejemplo en una transferencia western). Alternativamente, el ligando puede mostrar propiedades enzimáticas por sí mismo y el complejo de "ligando/péptido o polipéptido" o el ligando unido al péptido o polipéptido, respectivamente, pueden ponerse en contacto con un sustrato adecuado, permitiendo la detección mediante la generación de una señal de intensidad. Para la medición de productos de reacción enzimática, preferentemente la cantidad 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 una cantidad de producto detectable, preferentemente medible. En lugar de medir la cantidad del producto, puede medirse el tiempo necesario para la aparición de una cantidad de producto dada (por ejemplo detectable). En tercer lugar, el ligando puede acoplarse covalentemente o no covalentemente con un marcaje, permitiendo la detección y la medición del ligando. 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 ligando. El marcaje indirecto implica la unión (covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con un marcaje adecuado y/o ser la diana (receptor) de un ligando terciario de unión al ligando secundario. Los ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior se utilizan con frecuencia para incrementar la señal. Entre los ligandos secundarios y de orden más alto adecuados pueden incluirse anticuerpos, anticuerpos secundarios, y el bien conocido sistema de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando 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. Entre los marcajes radioactivos típicos se incluyen ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P y similares. Puede detectarse un marcaje radioactivo mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo una película fotosensible o una placa de fósforo fotestimulable ("Phosphorimager"). Entre los métodos de medición adecuados según la presente invención se incluyen también la precipitación (particularmente la inmunoprecipitación), la electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), ensayos inmunológicos enzimáticos de tipo sándwich, inmunoensayos de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroimmunoensayos de lantánidos de disociación mejorada (DELFA), ensayo de centelleo de proximidad (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría incrementada por látex o nefelometría, o ensayos inmunológicos de fase sólida. Pueden utilizarse métodos adicionales conocidos de la técnica (tales como la electroforesis en gel, la electroforesis en gel 2D, la electroforesis en SDS-gel de poliácridamida (SDS-PAGE), la transferencia western y la espectrometría de masas), solos o en combinación con marcaje u otros métodos de detección tal como se indica en la presente memoria.

La cantidad de un péptido o polipéptido puede determinarse, también preferentemente, de la manera siguiente: (a) puesta en contacto de un soporte sólido que comprende un ligando 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 ligando, preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, preferentemente se encuentra presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para fabricar 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 ligando 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, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, 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 contemplado utilizar "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 micropelícula o microesfera, se encuentra presente en suspensión. La matriz consiste de diferentes micropelículas o microesferas, posiblemente marcadas, que portan diferentes ligandos. 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).

Preferentemente, la cantidad de los marcadores indicados en la presente memoria se determina mediante la utilización de los ensayos descritos en los Ejemplos 1 y 2.

El término "cantidad" tal como se utiliza en la presente memoria comprende la cantidad absoluta de un polipéptido o péptido, la cantidad o concentración relativa de dicho polipéptido o péptido, así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona con los mismos o puede derivarse a partir 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 determinados en sistemas biológicos de lectura en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidos de ligandos unidos específicamente. Debe entenderse que los valores correlacionados con las cantidades o parámetros anteriormente indicados también pueden obtenerse mediante todas las operaciones matemáticas estándares.

El término "comparar" tal como se utiliza en la presente memoria comprende comparar la cantidad de un marcador tal como se indica en la presente memoria, en particular de péptido o polipéptido comprendido en la muestra que debe analizarse, con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada en otro sitio 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 de una muestra de ensayo se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación a la que se hace referencia en la etapa (b) del método de la presente invención puede llevarse a cabo manualmente o con un dispositivo informático (p.ej., un sistema dado a conocer en la presente memoria). Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos utilizando 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. Dicho resultado puede servir, preferentemente, como ayuda en la evaluación de si el sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes tal como se indica en otros sitios de la presente memoria, o no. Por ejemplo, un resultado de una comparación puede proporcionarse en forma de datos en bruto (cantidades absolutas o relativas) y, en algunos casos, como indicador en forma de un término, expresión, símbolo o valor numérico que puede ser indicativo de un diagnóstico/evaluación particular. Por lo tanto, la cantidad de referencia debe seleccionarse de manera que una diferencia o una similitud en las cantidades comparadas permita llevar a cabo la evaluación o el diagnóstico tal como se da a conocer en la presente memoria.

La expresión "cantidad de referencia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una cantidad que permite asignar un sujeto al grupo de sujetos que se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes o al grupo de sujetos que no se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Dicha cantidad de referencia puede ser una cantidad umbral que separa dichos grupos uno de otro. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la cantidad de referencia de un biomarcador tal como se indica en la presente memoria, en particular de una troponina cardíaca o FGF-23, será una cantidad que permita la asignación de un sujeto a un grupo de sujetos que se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes o a un grupo de sujetos que no se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Una cantidad umbral adecuada que separa los dos grupos puede calcularse sin más mediante las pruebas estadísticas a las que se hace referencia en otros sitios de la presente memoria basándose en cantidades del marcador al que se hace referencia en la presente memoria de un sujeto o grupo de sujetos que se someterán a evaluación, o de un sujeto o grupo de sujetos que no se someterá a la evaluación. Las cantidades de referencia preferente que pueden obtenerse de los sujetos o grupo de sujetos anteriormente mencionados se indican en otros sitios de la presente memoria.

La cantidad de referencia puede utilizarse para definir y establecer una cantidad umbral. La cantidad umbral, preferentemente, permite una regla de inclusión o de descarte de que el sujeto sea sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Dicha inclusión y/o descarte puede ser proporcionado por un dispositivo informático de un sistema dado a conocer en la presente memoria basándose en dicha comparación de la "cantidad" calculada respecto de una referencia o un umbral. Por ejemplo, un dispositivo informático de un sistema puede proporcionar un indicador en forma de un término, símbolo o valor numérico que es indicativo de la inclusión o descarte. La cantidad de referencia aplicable a un sujeto 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 al que se hace referencia en la presente memoria. Puede determinarse una cantidad de referencia adecuada a partir de una muestra de referencia que debe analizarse conjuntamente, es decir simultáneamente o seguidamente, con la muestra de ensayo.

Preferentemente, la cantidad de referencia es una cantidad de referencia calculada. Preferentemente, la cantidad de referencia calculada permitirá diferenciar entre un sujeto que será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes y un sujeto que no será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Las cantidades de referencia pueden, en principio, calcularse para una cohorte de sujetos tal como se ha

especificado anteriormente en la presente memoria basándose en los valores promedio o medios para un marcador biológico dado mediante la aplicación de métodos estadísticos estándares. En particular, la exactitud de un método tal como un método destinado a diagnosticar la incidencia o ausencia de un suceso, 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 de ensayo falsos positivos y el producto del número de negativos verdaderos y el número de resultados de ensayo 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.

Una cantidad de referencia preferente se encuentra comprendida en un intervalo de entre 5 y 6 pg/ml para una troponina cardíaca, en particular para la troponina T. Una cantidad de referencia particularmente preferente es 5,9 pg/ml.

Una cantidad de referencia preferente se encuentra comprendida en el intervalo de entre 73 y 77 pg/ml para FGF-23. Una cantidad de referencia particularmente preferente es 74 UR/ml. Preferentemente, la cantidad de los marcadores se determina mediante la utilización de los ensayos descritos en los Ejemplos 1 y 2.

Preferentemente, se aplica lo siguiente como algoritmo diagnóstico (en particular en el caso de que la referencia sea una cantidad de referencia calculada):

Preferentemente, una cantidad incrementada del marcador (y, de esta manera, de una troponina cardíaca y/o de FGF-23) en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia indica que el sujeto se someterá a evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. También preferentemente, una cantidad reducida del marcador o marcadores en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia indica que el sujeto no se someterá a evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, la cantidad de referencia puede derivarse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que son susceptibles de una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. En este caso, una cantidad del marcador o marcadores que debe determinarse en el contexto de la presente invención que son esencialmente idénticos o que son superiores a la cantidad o cantidades de referencia indica que el sujeto que debe someterse a ensayo se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Preferentemente, la cantidad de referencia se obtiene de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos. Preferentemente, un sujeto que es conocido que es susceptible de una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes es un sujeto que sufre de una fracción de acortamiento anormal de la pared media (la expresión "fracción de acortamiento de la pared media anormal" se especifica en otros sitios de la presente memoria).

Preferentemente, mediante la aplicación de la cantidad de referencia anteriormente indicada puede incluirse que el sujeto se someta a una evaluación basada en la obtención de imágenes.

Adicional o alternativamente, la cantidad de referencia puede, preferentemente, derivarse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que no son susceptibles de evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. En este caso, una cantidad del marcador o marcadores que debe determinarse en el contexto de la presente invención que son esencialmente idénticos o que son superiores a la cantidad o cantidades de referencia indica que el sujeto que debe someterse a ensayo se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Preferentemente, la cantidad de referencia se obtiene de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos. Preferentemente, un sujeto que es conocido que es susceptible de una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes es un sujeto que sufre de una fracción de acortamiento anormal de la pared media (la expresión "fracción de acortamiento de la pared media anormal" se especifica en otros sitios de la presente memoria).

Preferentemente, mediante la aplicación de la cantidad de referencia anteriormente indicada puede descartarse que el sujeto se someta a una evaluación basada en la obtención de imágenes.

Además, en el caso de que la cantidad de referencia se derive de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que no son susceptibles de evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes, en particular de un sujeto o grupo de sujetos que no sufre de una fracción de acortamiento de la pared media anormal, se aplica lo siguiente como algoritmo diagnóstico: Preferentemente, una cantidad de una troponina cardíaca, en particular de troponina T, que es por lo menos 10%, o más preferentemente por lo menos 25% superior a la cantidad de referencia de la troponina cardíaca, en particular de troponina T, es indicativa de un sujeto que será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. También preferentemente, una cantidad de FGF-23 que es por lo menos 5% o, más preferentemente, por lo menos 10% superior, o todavía más preferentemente, por lo menos 25% superior a la cantidad de referencia de FGF-23, es indicativa de que un sujeto será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

La definición del término "sujeto" se proporciona en otros sitios en la presente memoria. Las definiciones también se aplican al sujeto o sujetos de referencia de acuerdo con los métodos de la presente invención (es decir, a los sujetos de los que se derivan las cantidades de referencia). Preferentemente, el sujeto que debe someterse a ensayo y el sujeto o sujetos de referencia presentan la misma edad, género y/o raza. De acuerdo con lo anterior, resulta preferente que la cantidad de referencia se ajuste para edad, género y/o raza. También preferentemente, el sujeto que debe someterse a ensayo y el sujeto o sujetos de referencia pueden sufrir de hipertensión, en particular de hipertensión acompañada de los mismos factores de riesgo (para factores de riesgo, ver en otros sitios de la presente memoria).

Los marcadores tales como los indicados en la presente memoria pueden determinarse solos. Sin embargo, pueden determinarse juntos, es decir, el método de la presente invención puede comprender la determinación de una troponina cardíaca y FGF-23.

Además, en una realización de la presente invención se contempla determinar además la cantidad de vitamina D en la etapa a) además de la determinación de FGF-23 para calcular una proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D en una etapa a1) adicional y comparar la proporción calculada de esta manera con una proporción de referencia.

De acuerdo con lo anterior, la presente exposición se refiere además a un método para evaluar si un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes, que comprende las etapas de:

- a) determinar la cantidad del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) y la cantidad de vitamina D en una muestra del sujeto,
 - a1) calcular una proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D, y
 - b) comparar la proporción calculada de esta manera con una proporción de referencia, de manera que se evalúa si el sujeto se someterá a la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Las cantidades de FGF-23 y de vitamina D pueden determinarse en muestras diferentes del sujeto. Sin embargo, también se encuentra contemplado determinar las cantidades en la misma muestra.

Preferentemente, el método anteriormente indicado puede comprender además la determinación de la cantidad de una troponina cardíaca en la muestra (en la etapa a)) y la comparación de la cantidad determinada de esta manera con una cantidad de referencia (en la etapa b)).

Preferentemente, la evaluación de si el sujeto será sometido a la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes se basa en los resultados de la comparación o comparaciones llevadas a cabo en la etapa b).

La proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D puede ser la proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D o puede ser la proporción entre la cantidad de vitamina D y la cantidad de FGF-23.

- 5 El experto en la materia podrá determinar proporciones de referencia adecuadas sin más tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria en el contexto de la cantidad de referencia.

Preferentemente, en el caso de que la proporción sea la proporción de la cantidad de FGF-23 a la cantidad de vitamina D, lo siguiente también es de aplicación como algoritmo diagnóstico:

- 10 Preferentemente, una proporción incrementada entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D en la muestra del sujeto en comparación con la proporción de referencia (entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D) indica que el sujeto se someterá a evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

- 15 También preferentemente, una proporción reducida entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D en la muestra del sujeto en comparación con la proporción de referencia (entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D) indica que el sujeto no se someterá a evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

- 20 La proporción de referencia de FGF-23 a vitamina D puede derivarse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que son susceptibles de evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. En este caso, una proporción de FGF-23 a vitamina D que es esencialmente idéntica o que es superior a la proporción de referencia indica que el sujeto será sometido a dicha evaluación. Preferentemente, la proporción de referencia se deriva de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos. Preferentemente, un sujeto que es conocido que es susceptible de someterse a evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes es un sujeto que sufre de MFS anormal.

Preferentemente, mediante la aplicación de la proporción de referencia anteriormente indicada puede confirmarse que el sujeto será sometido a dicha evaluación.

- 30 Adicional o alternativamente, la proporción de referencia de FGF-23 a vitamina D puede, preferentemente, derivarse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que no son susceptibles de someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. En este caso, una proporción de FGF-23 a vitamina D en la muestra de ensayo que es esencialmente idéntica o que es inferior a la proporción de referencia indica que el sujeto no será sometido a dicha evaluación. Preferentemente, la proporción de referencia se deriva de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos. Preferentemente, un sujeto que es conocido que es susceptible de someterse a evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes es un sujeto que no sufre de MFS anormal.

- 40 Preferentemente, mediante la aplicación de la proporción de referencia anteriormente indicada puede descartarse que el sujeto será sometido a dicha evaluación.

- 45 También preferentemente, en el caso de que la proporción de referencia de FGF-23 a vitamina D se deriva de un sujeto o de un grupo de sujetos que es conocido que sufre de una fracción de acortamiento de la pared media anormal, también se aplica lo siguiente como algoritmo diagnóstico: Preferentemente, una proporción de FGF-23 a vitamina D en la muestra de ensayo que es por lo menos 5%, o más preferentemente, por lo menos 10%, superior a la proporción de referencia es indicativa de que el sujeto será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

- 50 La expresión "vitamina D" es bien entendida por el experto en la materia. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término preferentemente se refiere a un grupo de prohormonas solubles en lípidos, las dos formas principales de las cuales son la vitamina D2 (también denominada ergocalciferol) y la vitamina D3 (también denominada colecalciferol). Preferentemente, el término comprende la vitamina D en cualquiera de sus formas, en particular la vitamina D1, la vitamina D2, la vitamina D3 o la vitamina D4. Además, se encuentra contemplado que el término comprenda cualquier precursor de las mismas. La vitamina D se obtiene típicamente en un organismo de la exposición solar, los alimentos y complementos, es biológicamente inerte y experimenta dos reacciones de hidroxilación para resultar activada en el organismo. Por ejemplo, una forma activa de la vitamina D presente en el ser humano es el calcitriol.

- 60 Es conocido de la técnica que el método más exacto para determinar la cantidad de vitamina D es mediante la determinación de la 25-hidroxivitamina D. La 25-hidroxivitamina D es un prehormona que es producida en el hígado mediante la hidroxilación de la vitamina D3 (colecalciferol) por el enzima colecalciferol 25-hidroxilasa. Por lo tanto, el término "vitamina D" en particular se refiere a 25-hidroxivitamina D. De acuerdo con lo anterior, resulta particularmente preferente en el contexto de la presente invención determinar la cantidad de 25-hidroxivitamina D en una muestra del sujeto.

65

En una realización preferente del método anteriormente indicado, la cantidad (proporción) de referencia del marcador o marcadores que debe determinarse en el contexto del método es la cantidad (proporción) del marcador o marcadores en una muestra del sujeto (de ensayo) que ha sido obtenida antes de la muestra tal como se indica en la etapa a).

En el contexto de la presente solicitud, la muestra que ha sido obtenida antes de la muestra tal como se indica en la etapa a), también se denomina "primera muestra", en la que la muestra de ensayo indicada en la etapa a) se denomina "segunda muestra", ya que se obtiene después de la primera muestra.

De acuerdo con lo anterior, la presente exposición se refiere a un método para evaluar si un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes, que comprende las etapas de:

- a) determinar la cantidad o cantidades de una troponina cardíaca y/o factor de crecimiento fibroblástico (FGF-23) en una primera muestra del sujeto y una segunda muestra del sujeto, y
- b) comparar la cantidad o cantidades determinadas de esta manera en la segunda muestra con la cantidad o cantidades en la primera muestra, de manera que se evalúa si el sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, la segunda muestra se ha obtenido después de la primera muestra (en otras palabras, la primera muestra se ha obtenido antes de la segunda muestra). Se encuentra particularmente contemplado que la segunda muestra se obtenga después de un periodo razonable de tiempo después de obtener la primera muestra. Debe entenderse que las cantidades de biomarcador indicadas en la presente memoria no cambian instantáneamente (p.ej. en 1 minuto o en 1 hora). Por lo tanto, "razonable" en el presente contexto se refiere a intervalos entre la obtención de la primera y la segunda muestra, en el que dichos intervalos permiten el ajuste del biomarcador o biomarcadores. Preferentemente, la segunda muestra se ha obtenido 1 a 24 meses después de la primera muestra. Más preferentemente, la segunda muestra se ha obtenido 6 a 18 meses después de la primera muestra. Todavía más preferentemente, la segunda muestra se ha obtenido 6 a 12 meses después de la primera muestra. Más preferentemente, la segunda muestra se ha obtenido 9 a 12 meses después de la primera muestra. De acuerdo con lo anterior, la primera muestra se obtiene preferentemente 1 a 24 meses, más preferentemente 6 a 18 meses, todavía más preferentemente 6 a 12 meses, o lo más preferentemente 9 a 12 meses antes de la segunda muestra.

También se encuentra contemplado evaluar el curso temporal de la cantidad de los marcadores tal como se indica en el método de la presente invención, es decir, de una troponina cardíaca y/o de FGF-23 (o el curso temporal de una proporción entre FGF-23 y vitamina D en un sujeto tal como se indica en la presente memoria). De acuerdo con lo anterior, el método anteriormente mencionado puede comprender la etapa adicional de determinar la cantidad de una troponina cardíaca y/o de FGF-23 (o una proporción entre FGF-23 y vitamina D) en por lo menos una muestra adicional de dicho sujeto (de esta manera, en una tercera muestra, en una cuarta muestra, en una quinta muestra, etc.) y comparar la cantidad (proporción) determinada de esta manera con la proporción entre dicha troponina cardíaca y la FGF-23 (o con la proporción entre FGF-23 y vitamina D), respectivamente, en dicha primera muestra y/o en dicha segunda muestra y/o en cualquier muestra obtenida antes de obtener por lo menos una muestra adicional. Para los intervalos de tiempo preferentes para obtener las muestras, ver anteriormente.

Preferentemente un incremento y, más preferentemente, un incremento significativo, y lo más preferentemente, un incremento estadísticamente significativo de la cantidad de una troponina cardíaca y/o de FGF-23 (y/o de la proporción entre las cantidades de FGF-23 y vitamina D) en la segunda muestra en comparación con la primera muestra indica que el sujeto se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Preferentemente, una reducción y, más preferentemente, una reducción significativa y, lo más preferentemente, una reducción estadísticamente significativa de la cantidad de una troponina cardíaca y/o de FGF-23 (y/o de la proporción entre las cantidades de FGF-23 y vitamina D) o una cantidad esencialmente no modificada de una troponina cardíaca y/o de FGF-23 (o una proporción esencialmente no modificada) en la segunda muestra en comparación con la primera muestra indica que el sujeto no será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

En particular, un incremento significativo es un incremento de un nivel que se considera significativo para la evaluación, en particular dicho incremento 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.

Los incrementos significativos preferentes de la cantidad de una troponina cardíaca y/o de FGF-23 (o una proporción de FGF-23 a vitamina D), preferentemente de la cantidad (proporción) del biomarcador o biomarcadores en una muestra de sangre, suero o plasma, que se han encontrado durante el curso de la invención que resultan indicativos

de que un sujeto será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes, o no, proporcionados posteriormente en la presente memoria.

En el caso de que el marcador sea una troponina cardíaca, resulta de aplicación lo siguiente:

preferentemente, la cantidad de una troponina cardíaca, en particular de troponina T, en la segunda muestra que es por lo menos 10%, o más preferentemente por lo menos 25% superior a la cantidad de referencia (la cantidad de troponina cardíaca en la primera muestra), es indicativa de que un sujeto que será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Además, un incremento de la cantidad de una troponina cardíaca, en particular de troponina T, en la segunda muestra en comparación con la cantidad en la primera muestra, preferentemente de por lo menos 0,5 pg/ml, más preferentemente de por lo menos 1,0 pg/ml y todavía más preferentemente de por lo menos 1,5 pg/ml, de por lo menos 2,0 pg/ml o de por lo menos 2,5 pg/ml, de por lo menos 3,0 pg/ml y lo más preferentemente de por lo menos 4,0 pg/ml, se considera significativo y, de esta manera, indica que el sujeto será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

En el caso de que el marcador sea FGF-23, se aplica lo siguiente:

preferentemente, la cantidad de FGF-23 en la segunda muestra que es por lo menos 5%, o más preferentemente por lo menos 10% superior a la cantidad de referencia (la cantidad de FGF-23 en la primera muestra), es indicativa de que un sujeto que será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Además, un incremento de la cantidad de FGF-23 en la segunda muestra en comparación con la cantidad en la primera muestra, preferentemente de por lo menos 1,0 pg/ml, más preferentemente de por lo menos 2,0 pg/ml y todavía más preferentemente de por lo menos 3,0 pg/ml, de por lo menos 4,0 pg/ml o de por lo menos 5,0 pg/ml, de por lo menos 6,0 pg/ml y lo más preferentemente de por lo menos 7,0 pg/ml, se considera significativo y, de esta manera, indica que el sujeto será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

En el caso de que se determine la proporción de FGF-23 a vitamina D, se aplica lo siguiente.

Preferentemente una proporción en la segunda muestra que es por lo menos 5% o, más preferentemente, por lo menos 10% superior a la proporción de referencia (la proporción en la primera muestra) es indicativa de que un sujeto será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

En una realización preferente del método anteriormente indicado, el sujeto que debe someterse a ensayo no sufre de MFS anormal en el tiempo en el que se obtuvo la primera muestra. Además, resulta preferente que el sujeto no sufra de disfunción diastólica y/o sistólica en el tiempo en que se obtuvo la primera muestra. Sin embargo, el sujeto sufre de hipertensión en el tiempo en que se obtiene la primera muestra. La hipertensión puede estar acompañada de factores de riesgo tal como se indica en otros sitios en la presente memoria. Preferentemente se clasifica como sujeto en estadio A según la clasificación de ACC/AHA tal como se ha indicado anteriormente en el tiempo en que se obtuvo la primera muestra.

Método para el diagnóstico de la fracción de acortamiento de la pared miocárdica anormal

Las definiciones y aplicaciones proporcionadas en la presente memoria anteriormente se aplican por analogía a lo siguiente.

La presente exposición se refiere además a un método para el diagnóstico de fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal (MFS) en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a) determinar la cantidad de una troponina cardíaca y/o factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) en una muestra del sujeto y
- b) comparar la cantidad o cantidades determinadas de esta manera con una cantidad de referencia (cantidades de referencia), de manera que se diagnostica una fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal.

Preferentemente, se evalúa si el sujeto sufre de MFS anormal llevando a cabo la etapa adicional de c) evaluar si el sujeto sufre de MFS anormal basándose en los resultados de la comparación llevada a cabo en la etapa b).

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) pueden estar asistidas por automatización, p.ej. por equipos robóticos y sensoriales adecuados para la

determinación en la etapa (a) o una comparación implementada por ordenador y/o evaluación basada en dicha comparación en la etapa (b).

El término "diagnosticar" tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente se refiere a evaluar si un sujeto tal como se indica en la presente memoria sufre de fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal (MFS) o no. La expresión fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal ha sido definida en otro sitio de la presente memoria.

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 evaluados. 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 o no puede ser determinado sin más por el experto en la materia utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidos, 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 "cantidad de referencia" ha sido definida en otro sitio en la presente memoria. En el contexto del método anteriormente mencionado, el término se refiere a una cantidad que permite la asignación de un sujeto al grupo de sujetos que sufre de MFS anormal o a un grupo de sujetos que no sufre de MFS anormal (y que, de esta manera, presenta un MFS normal). Dicha cantidad de referencia puede ser una cantidad umbral que separa dichos grupos uno de otro. De acuerdo con lo anterior, la cantidad de referencia de un biomarcador tal como se indica en la presente memoria, en particular una troponina cardíaca o FGF-23, es una cantidad que permite la asignación de un sujeto a un grupo de sujetos que sufre de MFS anormal o un grupo de sujetos que no sufre de MFS anormal. Una cantidad umbral adecuada que separa los dos grupos puede calcularse sin más mediante las pruebas estadísticas a las que se hace referencia en otros sitios de la presente memoria basándose en cantidades del marcador al que se hace referencia en la presente memoria de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que sufren de MFS anormal o a un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que no sufre de MFS anormal. Las cantidades de referencia preferente que pueden obtenerse de los sujetos o grupo de sujetos anteriormente mencionados se indican en otros sitios de la presente memoria.

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

preferentemente, una cantidad incrementada del biomarcador (o cantidades incrementadas del biomarcador) en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia (o cantidades de referencia) indica que el sujeto sufre de MFS anormal y en el que una cantidad reducida (o cantidades reducidas) en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia (o cantidades de referencia) indica que el sujeto no sufre de MFS anormal. Preferentemente, un sujeto que no sufre de MFS anormal presenta un MFS normal.

Tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, la cantidad de referencia puede derivarse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que sufre de MFS anormal. En este caso, una cantidad (cantidades) del marcador o marcadores que debe determinarse en la etapa a) que son esencialmente idénticos o que son más grandes que la cantidad o cantidades de referencia indican que el sujeto que se somete a ensayo sufre de MFS anormal. Preferentemente, la cantidad de referencia se obtiene de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos.

Preferentemente, mediante la aplicación de la cantidad de referencia anteriormente mencionada puede confirmarse MFS anormal.

Adicional o alternativamente, la cantidad de referencia puede, preferentemente, derivarse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que no sufre de MFS anormal. En este caso, una cantidad (cantidades) del marcador o marcadores que debe determinarse en la etapa a) del método de la presente invención son esencialmente idénticas o son inferiores a la cantidad o cantidades de referencia indican que el sujeto no sufre de MFS anormal. Preferentemente, la cantidad de referencia se obtiene de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos.

Preferentemente, mediante la aplicación de la cantidad de referencia anteriormente mencionada puede descartarse MFS anormal.

Preferentemente, en el caso de que la cantidad o cantidades de referencia se derivan de un sujeto o de un grupo de sujetos que es conocido que no sufre de fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal, lo siguiente también se aplica como algoritmo diagnóstico: preferentemente, una cantidad de una troponina cardíaca, en particular de troponina T, que es por lo menos 10%, o más preferentemente por lo menos 25% superior a la cantidad de referencia de la troponina cardíaca, en particular de troponina T, es indicativa de un sujeto que sufre de MFS anormal. También preferentemente, una cantidad de FGF-23 que es por lo menos 5% o, más preferentemente,

por lo menos 10% superior a la cantidad de referencia de FGF-23, es indicativa de un sujeto que sufre de MFS anormal.

La definición del término "sujeto" se proporciona en otros sitios en la presente memoria. Las definiciones se aplican también al sujeto o sujetos de referencia. Preferentemente, el sujeto que debe someterse a ensayo y el sujeto o sujetos de referencia presentan aproximadamente la misma edad (+/- años, preferentemente la misma edad), el mismo género y/o raza. También preferentemente, el sujeto que debe someterse a ensayo y el sujeto o sujetos de referencia pueden sufrir de hipertensión, en particular de hipertensión acompañada de los mismos factores de riesgo (para factores de riesgo, ver en otros sitios de la presente memoria).

Además, en una realización de la presente invención se contempla determinar además la cantidad de vitamina D en la etapa a) además de la determinación de FGF-23 para calcular una proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D en una etapa a1) adicional y comparar la proporción calculada de esta manera con una proporción de referencia.

De acuerdo con lo anterior, la presente exposición se refiere además a un método para el diagnóstico de fracción de acortamiento de la pared miocárdica media (MFS) anormal en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a) determinar la cantidad del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) y la cantidad de vitamina D en una muestra del sujeto,
- a1) calcular una proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D, y
- b) comparar la proporción calculada de esta manera con una proporción de referencia, de manera que se diagnostica una fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal.

Las cantidades de FGF-23 y de vitamina D pueden determinarse en muestras diferentes del sujeto. Sin embargo, se encuentra particularmente contemplada la determinación de las cantidades en la misma muestra.

Preferentemente, el método puede comprender además la determinación de la cantidad de una troponina cardíaca en la muestra (en la etapa a)) y la comparación de la cantidad determinada de esta manera con una cantidad de referencia (en la etapa b)).

Preferentemente, la evaluación de si el sujeto será sometido a la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes se basa en los resultados de la comparación o comparaciones llevadas a cabo en la etapa b).

La proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D puede ser la proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D o puede ser la proporción entre la cantidad de vitamina D y la cantidad de FGF-23.

El experto en la materia podrá determinar proporciones de referencia adecuadas sin más tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria en el contexto de la cantidad de referencia.

Preferentemente, en el caso de que la proporción sea la proporción de la cantidad de FGF-23 a la cantidad de vitamina D, lo siguiente también es de aplicación como algoritmo diagnóstico:

preferentemente, una proporción incrementada entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D en la muestra del sujeto en comparación con la proporción de referencia (entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D) indica que el sujeto sufre de MFS. También preferentemente, una proporción reducida de la cantidad de FGF-23 a la cantidad de vitamina D en la muestra del sujeto en comparación con la proporción de referencia (de la cantidad de FGF-23 a la cantidad de vitamina D) indica que el sujeto no sufre de MFS anormal.

Preferentemente, en el caso de que se determine la proporción de FGF-23 a vitamina D, también resulta de aplicación lo siguiente:

la proporción de referencia de FGF-23 a vitamina D puede derivarse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que sufre de MFS anormal. En este caso, una proporción de FGF-23 a vitamina D que es esencialmente idéntica o que es superior a la proporción de referencia indica que el sujeto que debe someterse a ensayo sufre de MFS anormal. Preferentemente, la proporción de referencia se deriva de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos.

Adicional o alternativamente, la proporción de referencia de FGF-23 a vitamina D puede derivarse, preferentemente, de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que no sufre de MFS anormal. En este caso, una proporción de FGF-23 a vitamina D en la muestra de ensayo que es esencialmente idéntica o que es inferior a la proporción de referencia indica que el sujeto no sufre de MFS anormal. Preferentemente, la cantidad de referencia se obtiene de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos.

Preferentemente, en el caso de que la proporción de referencia de FGF-23 a vitamina D se derive de un sujeto o de un grupo de sujetos que es conocido que sufre de una fracción de acortamiento de la pared media anormal, también se aplica lo siguiente como algoritmo diagnóstico: preferentemente, una proporción de FGF-23 a vitamina D en la muestra de ensayo que es por lo menos 5%, o más preferentemente, por lo menos 10%, superior a la proporción de referencia es indicativa de que un sujeto sufre de MFS anormal.

Una proporción de referencia particularmente preferente derivada de un sujeto o de un grupo de sujetos que es conocido que no sufre de una fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal es la mediana de la proporción en un grupo de dichos sujetos. Preferentemente, la proporción de referencia es 5,3.

En un ejemplo preferente, el método comprende además la etapa de recomendar una terapia, en el caso de que el sujeto que debe someterse a ensayo sufra de MFS anormal y/o en el caso de que el sujeto que debe someterse a ensayo se someta a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Las terapias preferentes comprenden cambios de estilo de vida, régimen dietético, intervenciones en el cuerpo, así como la administración de fármacos apropiados para el tratamiento del sujeto.

Los fármacos adecuados para el tratamiento son bien conocidos de la técnica; ver, p.ej., Heart Disease, 8a edición, eds. Braunwald, Elsevier Saunders, capítulo 24 (respecto a la insuficiencia cardíaca) y capítulo 41 (respecto a la hipertensión), 2008. Estos tratamientos son una parte de la presente invención.

Entre los cambios del estilo de vida se incluyen el cese del tabaquismo, la moderación del consumo de alcohol, el incremento de la actividad física, la pérdida de peso, la restricción de sodio (sal), el control del peso y la alimentación saludable, aceites de pescado diarios y restricción de sal.

La terapia también puede incluir intervenciones. Una intervención preferente es la administración de medicación antihipertensiva con una preferencia por inhibidores del enzima conversor de la angiotensina (ACE), bloqueante del receptor de la angiotensina II (ARB, por sus siglas en inglés), antagonistas de la aldosterona, los beta-bloqueantes frente a los diuréticos y los antagonistas del calcio.

Preferentemente, debe recomendarse la administración de uno o más de los fármacos siguientes: diuréticos del asa, tiazida y diuréticos de tipo tiazida, diuréticos ahorradores de K, antagonistas de receptor de mineralocorticoide de tipo I, antialdosterona, inhibidores de la anhidrasa carbónica y antagonistas de vasopresores;

beta-bloqueantes como propenolol, metoprolol, bisoprolol, carvedilol, bucindolol, nebivolol, antagonistas del calcio como dihidropiridinas, verapamilo, diltiazem;

agonistas adrenérgicos, como dobutamina, dopamina, epinefrina, isoprotenerol, norepinefrina y fenilefrina;

agentes inotrópicos positivos, como digoxina y digitoxina,

inhibidores de ACE, como enalapril, captopril, ramipril y trandolapril;

antagonistas de receptores de angiotensina como losartán, valsartán, irbesartán, candesartán, telmisartán y eprosartán;

antagonistas de aldosterona como eplerona, espironolactona, canrenona, mexrenona, prorenona; estatinas, en particular, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina; hidralazina y dinitrato de isosórbido.

Método para predecir el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular

La presente invención se refiere además a un método para predecir el riesgo de mortalidad en un sujeto, que comprende las etapas de:

a) determinar, en una muestra de dicho sujeto, la cantidad de IGFBP7 y

b) comparar la cantidad según se ha determinado en la etapa a) con una cantidad de referencia, de manera que se predice el riesgo de mortalidad en dicho sujeto.

En una realización del método anteriormente indicado, se contempla determinar además la cantidad de vitamina D en la etapa a) además de la determinación de FGF-23 para calcular una proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D y comparar la proporción calculada de esta manera con una proporción de referencia.

De acuerdo con lo anterior, se da a conocer un método para predecir el riesgo de mortalidad y/o un accidente cardiovascular en un sujeto, que comprende las etapas de:

a) determinar la cantidad del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) y la cantidad de vitamina D en una muestra del sujeto,

a1) calcular una proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D, y

b) comparar la proporción calculada de esta manera con una proporción de referencia, de manera que se predice el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular en dicho sujeto.

Evidentemente también puede determinarse la cantidad de IGFBP7 además de las cantidades de FGF-23 y vitamina D:

de acuerdo con lo anterior, se da a conocer un método para predecir el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a) determinar las cantidades de IGFBP7, de factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) y de vitamina D en una muestra del sujeto,
 - a1) calcular una proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D,
 - b) comparar la proporción calculada de esta manera con una proporción de referencia, y
 - b1) comparar la cantidad de IGFBP7 con una proporción de referencia,
- de manera que se predice el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular en dicho sujeto.

La proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D puede ser la proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D o puede ser la proporción entre la cantidad de vitamina D y la cantidad de FGF-23.

Preferentemente, el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular se predice llevando a cabo la etapa adicional de c) predecir el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular, basándose en los resultados de la comparación llevada a cabo en la etapa b) (o en las etapas b) y b1).

Las cantidades de los biomarcadores puede determinarse en diferentes muestras del sujeto. Sin embargo, también se encuentra contemplado determinar las cantidades en la misma muestra.

En una realización preferente, el método para predecir el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular comprende además la etapa de determinar la cantidad de un péptido natriurético cerebral, en particular de PNC o NT-proPNC, y/o de la cantidad de una troponina cardíaca, en particular de troponina T o I, en la muestra del sujeto, y la etapa de comparar la cantidad de dicho péptido natriurético cerebral y/o de la cantidad de la troponina cardíaca con una cantidad de referencia (o cantidades de referencia).

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 de la presente invención también puede utilizarse para la monitorización, confirmación y subclasificación. El método puede llevarse a cabo manualmente y/o ser asistido por automatización.

Preferentemente, la etapa (a), (b) y/o (c) pueden estar asistidas por automatización total o parcialmente, p.ej. por equipos robóticos y sensoriales adecuados para la determinación en la etapa (a) o una comparación implementada por ordenador en la etapa (b).

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 accidente cardiovascular, preferentemente un accidente 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 sujeto desarrollará un accidente 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 cuatro o cinco años. 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 para una parte estadísticamente significativa de los sujetos que deben analizarse. Si una parte es estadísticamente significativa o no puede ser determinado sin más 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 sujetos 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 accidente cardiovascular. La expresión "accidente cardiovascular" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier trastorno del sistema cardiovascular, incluyendo

preferentemente cualquier accidente 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 sujetos.

La expresión "predecir el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que el sujeto 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 accidente cardiovascular o el riesgo de mortalidad dentro de una ventana de predicción predeterminada se encuentra elevado significativamente (es decir, incrementado significativamente) para un sujeto con respecto al riesgo medio para un accidente cardiovascular o mortalidad cardíaca en una población de sujetos. Un riesgo reducido tal como se indica en la presente invención preferentemente se refiere a que el riesgo de desarrollar un accidente 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 accidente cardiovascular o de mortalidad cardíaca en una población de sujetos. 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 cuatro (o cinco) años, un riesgo elevado de mortalidad (o de un accidente 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 cuatro (o 5) años. Un riesgo reducido de mortalidad (o de un accidente 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 lo más preferentemente se encuentra comprendido en el intervalo de 3,0% a 8,0%, preferentemente con respecto a una ventana de predicción de cuatro años.

El término "sujeto" ha sido definido anteriormente. La definición del término "sujeto" también se aplica al método anteriormente indicado. De esta manera, tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria en relación al método para evaluar si un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes, el sujeto, p.ej., presentará una masa ventricular normal.

El sujeto en el contexto del método anteriormente indicado de la presente invención de predicción del riesgo de mortalidad preferentemente no sufre de insuficiencia cardíaca y/o no muestra síntomas evidentes de insuficiencia cardíaca (ver las explicaciones, anteriormente). De acuerdo con lo anterior, el sujeto no sufre de insuficiencia cardíaca clasificada como estadio C o D según la clasificación de ACC/AHA (ver la referencia, anteriormente). Además, tal como se indica posteriormente en la presente memoria, el paciente no presenta una fracción de eyección ventricular izquierda reducida.

En una realización preferente del método anteriormente indicado, el sujeto, preferentemente, sufre de insuficiencia cardíaca clasificada como de estadio A o de estadio B según la clasificación de ACC/AHA. En otra realización preferente del método anteriormente indicado, el sujeto es sano con respecto a enfermedades y trastornos cardíacos. Un sujeto que es sano con respecto a enfermedades y trastornos cardíacos se considera un sujeto que no sufre de enfermedades y trastornos cardíacos.

Preferentemente, el sujeto en el contexto del método anteriormente mencionado no sufre de insuficiencia cardíaca sistólica (en particular de insuficiencia cardíaca sistólica con una fracción de eyección reducida) y/o de disfunción sistólica. Preferentemente, el sujeto presenta una fracción de eyección ventricular izquierda conservada. De acuerdo con lo anterior, el sujeto que debe someterse a ensayo puede presentar una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) preferentemente superior a 55%, más preferentemente superior a 60% y, lo más preferentemente, superior a 65%.

El sistema de proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) desempeña una función 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 ha sido denominada FSTL2, IBP7, proteína I relacionada con la proteína de unión a IGF, IGFBP 7, IGFBP 7v, IGFBP rP1, IGFBP7, IGFBPRP1, precursor de la proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, MAC25, proteína MAC25, factor estimulante PGI2 y PSF o factor estimulante de 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 mamarias 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 T1AI2, 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 la 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. Para una explicación del término "variantes", ver anteriormente.

Tal como se ha indicado anteriormente, el método anteriormente mencionado puede comprender además la determinación de la cantidad de péptido natriurético cerebral y/o de la cantidad de una troponina cardíaca en una muestra del sujeto. La expresión "troponina cardíaca" ha sido descrita en otro sitio en la presente memoria. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "péptidos natriuréticos cerebrales" preferentemente se refiere a los péptidos de tipo péptido natriurético cerebral (PNC) y variantes de los mismos que presentan el mismo potencial predictivo. Los péptidos de tipo PNC comprenden pre-proPNC, proPNC, NT-proPNC y PNC. El pre-propéptido (134 aminoácidos en el caso de preproPNC) comprende un péptido de señal corto que es escindido enzimáticamente para liberar el propéptido (108 aminoácidos en el caso de proPNC). El propéptido se corta adicionalmente en un propéptido N-terminal (NT-propéptido, 76 aminoácidos en el caso de NT-proPNC) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de PNC). Preferentemente, los péptidos natriuréticos cerebrales según la presente invención son NT-proPNC, PNC y variantes de los mismos. PNC es la hormona activa y presenta una semivida más corta que la contrapartida inactiva respectiva, NT-proPNC. El PNC es metabolizado en la sangre, mientras que NT-proPNC circula en la sangre en forma de una molécula intacta y como tal es eliminada renalmente. La semivida in vivo de NT-proPNC 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-proPNC, 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 PNC 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-proPNC y variantes del mismo. Tal como se ha comentado brevemente anteriormente, el NT-proPNC 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-proPNC humana. La estructura de BNP y NT-proPNC 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-proPNC humano tal como se utiliza en la presente memoria es NT-proPNC humano tal como se da a conocer en la patente nº EP 0 648 228 B1. El NT-proPNC al que se hace referencia según la presente invención comprende además variantes alélicas y otras variantes de dicha secuencia específica para el NT-proPNC 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-proPNC humano, preferentemente a lo largo de la longitud

completa de NT-proPNC humano. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos de la técnica. Preferentemente, el grado de identidad debe determinarse mediante comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la que el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (p.ej., huecos o extremos protuberantes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se observa el residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el número por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias.

La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman, *Add. Appl. Math.* 2:482, 1981); mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para la comparación, preferentemente se utilizan GAP y BESTFIT para determinar la alineación óptima y, de esta manera, el grado de identidad. Preferentemente se utilizan los valores por defecto de 5,00 para el peso de hueco y de 0,30 para el peso de longitud de hueco. Las variantes a las que se ha hecho referencia anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualesquiera otros homólogos, parálogos u ortólogos específicos de especie. Son sustancialmente similares y también se encuentran contemplados los productos de degradación proteolítica que todavía se identifican por medios diagnósticos o mediante ligandos dirigidos contra el péptido de longitud completa respectivo. También se encuentran comprendidos polipéptidos variantes que presentan deleciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de NT-proPNC humano con la condición de que dichos polipéptidos presenten propiedades de NT-proPNC. Las propiedades de NT-proPNC a las que se hace referencia en la presente memoria son propiedades inmunológicas y/o biológicas. Preferentemente, las variantes de NT-proPNC presentan propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítomos) comparables a las de la NT-proPNC humana. De esta manera, las variantes pueden reconocerse mediante los medios o ligandos anteriormente mencionados utilizados para la determinación de la cantidad de péptidos natriuréticos. Las propiedades biológicas y/o inmunológicas de NT-proPNC pueden detectarse mediante el ensayo descrito en Karl et al. (*Karl, Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 230:177-181, 1999), Yeo et al. (*Yeo, Clinica Chimica Acta* 338:107-115, 2003). Las variantes incluyen además péptidos modificados post-traduccionalmente, tales como péptidos glucosilados. Además, una variante según la presente invención también es un péptido o polipéptido que ha sido modificado tras la recolección de la muestra, por ejemplo mediante la unión covalente o no covalente de un marcaje, particularmente un marcaje radioactivo o fluorescente, al péptido.

La expresión "cantidad de referencia" ha sido definida anteriormente. En el contexto del método anteriormente mencionado, la cantidad de referencia de un biomarcador tal como se indica en la presente memoria, en particular de FGF-23, IGFBP7, una troponina cardíaca o un péptido natriurético cerebral, es la cantidad que permite la asignación de un sujeto a un grupo de sujetos que presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular, o en un grupo de sujetos que presenta un riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular. Una cantidad umbral adecuada que separa los dos grupos puede calcularse sin más mediante las pruebas estadísticas indicadas en otros sitios en la presente memoria, basadas en cantidades del marcador al que se hace referencia en la presente memoria de un sujeto o de un grupo de sujetos que es conocido que presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular, o de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que presenta un riesgo reducido de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular. Las cantidades de referencia preferente que pueden obtenerse de los sujetos o grupo de sujetos anteriormente mencionados se indican en otros sitios de la presente memoria.

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

preferentemente, la cantidad de referencia se deriva de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular. En este caso, una cantidad del marcador FGF-23 y/o una cantidad de IGFBP7 que son esencialmente idénticos o son más grandes que la cantidad o cantidades de referencia indican que el sujeto que debe someterse a ensayo presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular. Lo mismo resulta de aplicación a los marcadores que pueden determinarse adicionalmente en el contexto de la presente invención, es decir, a la troponina cardíaca y al péptido natriurético cerebral.

Adicional o alternativamente, la cantidad de referencia puede derivarse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que presentan un riesgo reducido de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular. En este caso, una cantidad del marcador FGF-23 y/o una cantidad de IGFBP7 que son esencialmente idénticas o son superiores a la cantidad o cantidades de referencia indican que el sujeto que debe someterse a ensayo presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular. Lo mismo resulta de aplicación a los marcadores que pueden determinarse adicionalmente en el contexto de la presente invención, es decir, a la troponina cardíaca y al péptido natriurético cerebral.

Además, se encuentra contemplado que la cantidad de referencia es una cantidad de referencia calculada.

Preferentemente, la cantidad de referencia calculada permitirá diferenciar entre un sujeto que presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular, y un sujeto que presenta un riesgo reducido de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular. Preferentemente, una cantidad incrementada (o cantidades incrementadas) de uno o más marcadores son indicativos de un sujeto que presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular, mientras que una cantidad reducida (o cantidades reducidas) de uno o más marcadores es indicativa de que un sujeto que presenta un riesgo reducido de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular.

Tal como se ha indicado anteriormente, el método anteriormente mencionado puede comprender la determinación combinada de FGF-23 y vitamina D y el cálculo de una proporción de referencia. El experto en la materia podrá determinar proporciones de referencia adecuadas sin más tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria en el contexto de la cantidad de referencia.

Una proporción de referencia preferente para la proporción de cantidad de FGF-23 a cantidad de vitamina D se encuentra comprendida en el intervalo de 4 a 8,5, en particular de 6,5 a 8,5. Son proporciones de referencia adicionales de FGF-23 a cantidad de vitamina D, preferentemente 6,5, más preferentemente 7,5 o lo más preferentemente, 8,5.

Una cantidad de referencia preferente se encuentra comprendida en el intervalo de entre 100 y 115 ng/ml para IGFBP7. Una cantidad de referencia particularmente preferente es 115 ng/ml.

Preferentemente, en el caso de que la proporción sea la proporción de la cantidad de FGF-23 a la cantidad de vitamina D, lo siguiente también es de aplicación como algoritmo diagnóstico:

preferentemente, una proporción incrementada entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D en la muestra del sujeto en comparación con la proporción de referencia (entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D) indica que el sujeto presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular. preferentemente, una proporción reducida entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D en la muestra del sujeto en comparación con la proporción de referencia (entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D) indica que el sujeto presenta un riesgo reducido de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular.

También preferentemente, la proporción de referencia de FGF-23 a vitamina D puede obtenerse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular. En dicho caso, una proporción de FGF-23 a vitamina D que es esencialmente idéntica o que es mayor que la proporción de referencia indica que el sujeto presenta un riesgo elevado de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular.

Adicional o alternativamente, la proporción de referencia de FGF-23 a vitamina D puede obtenerse preferentemente de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que presenta un riesgo reducido de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular. En dicho caso, una proporción FGF-23 a vitamina D en la muestra de ensayo que es esencialmente idéntica o que es más baja que la proporción de referencia indica que el sujeto presenta un riesgo reducido de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular.

Método para el diagnóstico de un estadio temprano de hipertrofia ventricular izquierda (HVI)

Se ha demostrado en los estudios en los que se basa la presente invención que la determinación combinada de endostatina y un péptido de tipo PNC (tal como NT-proPNC y/o PNC) o la determinación combinada de endostatina y una troponina cardíaca, permite la identificación fiable de sujetos que se encuentran en un estadio temprano de hipertrofia ventricular izquierda. La determinación combinada de dichos marcadores resulta en un diagnóstico mejorado ya que la determinación de endostatina por una parte y de un péptido de tipo PNC o de una troponina cardíaca, por otra parte, permite la identificación de diferentes subgrupos de sujetos que se encuentran en un estadio temprano de HVI. Una cantidad incrementada de uno de los marcadores o una cantidad incrementada de dos marcadores es indicativa de un estadio temprano de HVI. En el caso de que sólo se determine la cantidad de un marcador, algunos pacientes que se encuentran en un estadio temprano de HVI podrían no ser identificados.

La determinación combinada de los marcadores resulta ventajosa, en particular, en sujetos que presentan una fracción de eyección izquierda conservada, ya que considera el fenotipo intermedio en la progresión de hipertensión a disfunción sistólica o diastólica antes de que la HVI se torne más acusada.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se da a conocer un método de diagnóstico de un estadio temprano de la hipertrofia ventricular izquierda en un sujeto que presenta una fracción de eyección ventricular izquierda conservada, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) determinar la cantidad de endostatina en una muestra del sujeto, y
- b) determinar la cantidad de un péptido de tipo PNC y/o de una troponina cardíaca en una muestra del sujeto, y

c) comparar las cantidades determinadas en la etapa a) y b) con las cantidades de referencia, de manera que se diagnostica un estadio temprano de hipertrofia ventricular izquierda.

Preferentemente, el estadio temprano de hipertrofia ventricular izquierda se diagnostica llevando a cabo la etapa adicional de d) diagnóstico de si el sujeto se encuentra en un estadio temprano de hipertrofia ventricular izquierda o no basándose en los resultados de la comparación llevada a cabo en la etapa c).

Las cantidades de los marcadores en las etapas a) y b) pueden determinarse en la misma muestra del sujeto o en diferentes muestras del sujeto.

El término "diagnosticar" tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente se refiere a evaluar si un sujeto tal como se utiliza en la presente memoria en el contexto del método anteriormente mencionado sufre de un estadio temprano de HVI o no. 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 diagnosticados. 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 o no puede ser determinado sin más por el experto en la materia utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidos, 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.

En el contexto del método, debe diagnosticarse si un sujeto se encuentra en un estadio temprano de hipertrofia ventricular izquierda (HVI) o no. La expresión "estadio temprano de hipertrofia ventricular izquierda" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cambios estructurales sutiles del miocardio que tienen lugar en la progresión de hipertensión a insuficiencia cardíaca. De acuerdo con lo anterior, mediante la realización de las etapas del método anteriormente mencionado resulta posible diagnosticar un fenotipo intermedio en la progresión de hipertensión a insuficiencia cardíaca. De acuerdo con lo anterior, la expresión "estadio temprano de hipertrofia ventricular izquierda" preferentemente comprende el estadio de HVI en el que la masa del ventrículo izquierdo se encuentra ligeramente incrementado. Preferentemente, la masa del ventrículo izquierdo se encuentra ligeramente incrementada en el caso de que el sujeto presente un IMVI tal como se indica posteriormente en la presente memoria.

Preferentemente, en el caso de que el sujeto sea masculino, la expresión "estadio temprano de HVI" comprende el estadio de HVI en el que el índice de masa ventricular izquierda (y, de esta manera, la proporción de masa ventricular izquierda a superficie corporal, abreviadamente IVMI) se encuentra comprendido en el intervalo de 116 g/m² a 149 g/m², más preferentemente en el intervalo de 116 g/m² a 135 g/m², todavía más preferentemente en el intervalo de 116 g/m² a 130 g/m², y lo más preferentemente, en el intervalo de 116 g/m² a 125 g/m².

Preferentemente, en el caso de que el sujeto sea femenino, la expresión "estadio temprano de HVI" comprende el estadio de HVI en el que el índice de masa ventricular izquierda (y, de esta manera, la proporción de masa ventricular izquierda a superficie corporal, abreviadamente IVMI) se encuentra comprendido en el intervalo de 96 g/m² a 125 g/m², más preferentemente en el intervalo de 96 g/m² a 120 g/m², todavía más preferentemente en el intervalo de 96 g/m² a 115 g/m², y lo más preferentemente, en el intervalo de 96 g/m² a 108 g/m².

De acuerdo con lo anterior, llevando a cabo el método puede diagnosticarse si el sujeto que debe someterse a ensayo presenta un índice de masa ventricular izquierda tal como se ha indicado anteriormente o no.

Preferentemente, los valores de IVMI proporcionados en la presente memoria se basan en el método para evaluar la HVI dado a conocer por Lang et al. (*Recommendations for chamber quantification*. Eur. J. Echocardiogr. 7:79-108, 2006).

Se infiere a partir de lo anterior que el sujeto que debe someterse a ensayo no sufre de una forma pronunciada de HVI. Preferentemente, en el caso de que el sujeto sea masculino, el IVMI es más bajo (y, de esta manera, no superior) que 149 g/m², 135 g/m², 130 g/m² o 125 g/m². Preferentemente, en el caso de que el sujeto sea femenino, el IVMI es más bajo (y, de esta manera, no superior) que 125 g/m², 120 g/m², 115 g/m² o 108 g/m².

El término "sujeto" en relación al método anteriormente mencionado se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y más preferentemente, seres humanos. En una realización preferente, el sujeto es masculino. En otro ejemplo preferente, el sujeto es femenino. Además, el sujeto puede tener más de 65 años de edad.

El sujeto en el contexto del método anteriormente mencionado de la presente invención preferentemente no sufre de insuficiencia cardíaca y/o no muestra síntomas evidentes de insuficiencia cardíaca (ver las explicaciones, anteriormente). De acuerdo con lo anterior, el sujeto no sufre de insuficiencia cardíaca clasificada como estadio C o D según la clasificación de ACC/AHA.

Tal como se ha indicado anteriormente, un sujeto que no muestra síntomas evidentes de insuficiencia cardíaca puede sufrir de insuficiencia cardíaca estadio A o B según la clasificación de ACC/AHA indicada anteriormente. En relación al método anteriormente mencionado de la presente invención, el sujeto de esta manera preferentemente sufre de insuficiencia cardíaca clasificada como de estadio A o, más preferentemente, de insuficiencia cardíaca de estadio B según la clasificación de ACC/AHA (ver J. Am. Coll. Cardiol. 38:2101-2113, 2001, actualizada en 2005, ver J. Am. Coll. Cardiol. 46:e1-e82, 2005).

En otra realización preferente del método anteriormente indicado, el sujeto es sano con respecto a enfermedades y trastornos cardíacos. Un sujeto que es sano con respecto a enfermedades y trastornos cardíacos se considera un sujeto que no sufre de enfermedades y trastornos cardíacos.

El sujeto en el contexto del método anteriormente mencionado presentar una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) conservada. De acuerdo con lo anterior, el sujeto que debe someterse a ensayo presentará una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) preferentemente superior a 55%, más preferentemente superior a 60% y, lo más preferentemente, superior a 65%. De acuerdo con lo anterior, el sujeto preferentemente no sufre de insuficiencia cardíaca sistólica o de disfunción sistólica. Se ha proporcionado anteriormente una definición de la expresión "insuficiencia cardíaca sistólica".

La presente invención resulta ventajosa, en particular, en sujetos que sufren de hipertensión, ya que la determinación combinada de los marcadores endostatina y/o troponina cardíaca permite diagnosticar cambios estructurales sutiles del miocardio que tienen lugar durante la progresión de hipertensión a insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, el sujeto preferentemente sufre de hipertensión, en particular de hipertensión arterial (para una explicación de este término, ver en otro sitio de la presente memoria).

Además, se encuentra contemplado que el sujeto no sufra de SCA y/o de enfermedad arterial coronaria. Además, el sujeto no debe presentar función renal deteriorada. (para una definición de dichos términos, ver anteriormente). Además, la sujeto no debe encontrarse embarazada. También preferentemente, el sujeto no es un atleta.

Los términos "muestra", "determinar", "cantidad", "comparar" y "cantidad de referencia" se han definido anteriormente. Las definiciones también se aplican al método anteriormente mencionado.

Además, una definición de las expresiones "troponina cardíaca" y "péptidos de tipo PNC" que deben determinarse en el contexto del método de la presente invención también pueden encontrarse anteriormente. Las troponinas cardíacas preferentes son la troponina T y la troponina I. Los péptidos de tipo PNC preferentes son NT-proPNC y PNC.

El marcador endostatina es bien conocido de la técnica. La endostatina fue originalmente aislada a partir de un hemangioendoteloma 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 cathepsinas 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 expresión "cantidad de referencia" ha sido definida en otro sitio en la presente memoria. Tal como se ha indicado anteriormente, la cantidad de referencia puede ser una cantidad de referencia calculada. Preferentemente, las cantidades de referencia calculadas permiten diferenciar entre un sujeto que se encuentra en un estadio temprano de HVI y un sujeto que no se encuentra en un estadio temprano de HVI.

En principio, se aplica lo siguiente como algoritmo diagnóstico: Preferentemente, el sujeto de ensayo se encuentra en un estadio temprano de HVI en el caso de que (i) una cantidad de uno de los marcadores determinados (p.ej. de endostatina o un péptido natriurético cerebral, o de endostatina o una troponina cardíaca) es superior a la cantidad de referencia, o en el caso de que (ii) las cantidades de ambos marcadores sean superiores a las cantidades de

referencia. Preferentemente, el sujeto de ensayo no se encuentra en un estadio temprano de HVI en el caso de que las cantidades de ambos marcadores sean inferiores a las cantidades de referencia.

Las cantidades de referencia adecuadas que permiten el diagnóstico de si un sujeto se encuentra en un estadio temprano de HVI o no, podrán ser determinadas por el experto en la materia. La cantidad de referencia de un biomarcador tal como se indica en la presente memoria en relación al método anteriormente mencionado debe ser una cantidad que permite la asignación de un sujeto a un grupo de sujetos que se encuentra en un estadio temprano de hipertrofia ventricular izquierda y/o en un grupo de sujetos que no se encuentra en un estadio temprano de HVI. Una cantidad umbral adecuada que separa los dos grupos puede calcularse sin más mediante las pruebas estadísticas a las que se hace referencia en otros sitios de la presente memoria basándose en cantidades del marcador al que se hace referencia en la presente memoria de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que sufren de un estadio temprano de HVI o a un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que no se encuentra en un estadio temprano de HVI.

Tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, las cantidades de referencia de los biomarcadores puede derivarse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que se encuentra en un estadio temprano de HVI. En este caso, una cantidad de por lo menos uno de los marcadores determinados que es esencialmente idéntica o que es superior a la cantidad de referencia indica que el sujeto se encuentra en un estadio temprano de HVI. De acuerdo con lo anterior, un estadio temprano de HVI puede ser diagnosticado en el caso de que la cantidad de un marcador sea esencialmente idéntica o superior a la cantidad de referencia.

Tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, las cantidades de referencia de los biomarcadores puede derivarse de un sujeto o grupo de sujetos que es conocido que se encuentra en un estadio temprano de HVI. En este caso, las cantidades de todos los marcadores (es decir, en el caso de que se determinen dos marcadores, o ambos marcadores) que son esencialmente idénticas y/o que son inferiores a las cantidades de referencia indican que el sujeto no se encuentra en un estadio temprano de HVI. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el sujeto no se encuentra en un estadio temprano de HVI, en el caso de que la cantidad de ambos marcadores sean esencialmente idénticos y/o superiores a las cantidades de referencia.

Una cantidad de referencia preferente se encuentra comprendida en el intervalo de entre 180 y 200 ng/ml para la endostatina. Una cantidad de referencia particularmente preferente es 190 ng/ml.

Una cantidad de referencia preferente para NT-proPNC se encuentra comprendida en el intervalo de entre 180 y 250 pg/ml. Una cantidad de referencia particularmente preferente es aproximadamente 200 pg/ml.

Una cantidad de referencia preferente para la troponina T se encuentra comprendida en el intervalo de entre 5 y 10 pg/ml. Preferentemente, la cantidad de referencia es 8 pg/ml.

En un ejemplo, el método comprende además la etapa de recomendar una terapia, en el caso de que el sujeto que debe someterse a ensayo se encuentre en un estadio temprano de HVI. Se dan a conocer terapias preferentes en el contexto del método de diagnóstico de MFS anormal.

En un ejemplo preferente, el método comprende además la determinación de la cantidad de por lo menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en mimecán, factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF-15), FGF-23 y vitamina D en la muestra del sujeto y la comparación de la cantidad (o cantidades) determinadas de esta manera de dicho por lo menos un marcador adicional con una cantidad de referencia (cantidades de referencia) de dicho por lo menos un marcador adicional. En el caso de que se determinen las cantidades de FGF-23 y/o de vitamina D, puede calcularse la proporción de FGF-23 a vitamina D (o viceversa) y compararse con una proporción de referencia. Una combinación preferente es de troponina cardíaca, endostatina y FGF-23:vitamina D.

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 fibrillogénesis 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 anomalías en las fibrillas de colágeno (Tasheva E.S. et al., Mol. Vis. 8:407-415, 2002).

El mimecán 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 fibrillogénesis 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. Se encuentra contemplado un método para establecer una ayuda para evaluar si un sujeto se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes o para evaluar si un sujeto sufre de MFS anormal, comprendiendo dicho método:

- a) determinar la cantidad de por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste en una troponina cardíaca y/o FGF-23, vitamina D mediante (i) la puesta en contacto de la muestra con un agente de detección que se une específicamente a dicha troponina cardíaca durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de dicho agente de detección y dicha troponina cardíaca y/o la puesta en contacto de la muestra con un agente de detección que se une específicamente a FGF-23 durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de dicho agente de detección y FGF-23, (ii) medir la cantidad o cantidades del complejo o complejos formados, en el que dicha cantidad o cantidades del complejo o complejos formados son proporcionales a la cantidad o cantidades de la troponina cardíaca y/o de FGF-23, e (iii) transformación de la cantidad o cantidades del complejo o complejos formados en una cantidad (o cantidades) de troponina cardíaca y/o FGF-23 que reflejan la cantidad o cantidades de troponina cardíaca y/o FGF-23 presentes en la muestra,
- b) comparar dicha cantidad o cantidades con una referencia (o referencias), y
- c) establecer una ayuda para evaluar si un sujeto se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes o para diagnosticar MFS anormal basándose en el resultado de la comparación realizada en la etapa b).

En otro aspecto, se encuentra contemplado un sistema para establecer una ayuda para evaluar si un sujeto se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes o para diagnosticar MFS anormal, que comprende:

- a) una unidad analizadora configurada para poner la muestra en contacto con un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de dicho agente de detección y troponina cardíaca de la muestra y/o con un agente de detección que se une específicamente a FGF-23 durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de dicho agente de detección y FGF-23 de la muestra (y, opcionalmente, en el caso de que se determine FGF-23, con un agente de detección que se une específicamente a vitamina D durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de dicho agente de detección y vitamina D de la muestra,
- b) una unidad analizadora configurada para medir la cantidad o cantidades del complejo o complejos formados, en el que dicha cantidad o cantidades del complejo o complejos formados son proporcionales a la cantidad o cantidades de troponina cardíaca y/o FGF-23 (y, opcionalmente, de vitamina D),
- c) un dispositivo informático que presenta un procesador en comunicación operable con dichas unidades de análisis, y
- d) un medio legible por máquina no transitorio que incluye una pluralidad de instrucciones ejecutables por el procesador; las instrucciones, al ser ejecutadas, transforman la cantidad del complejo o complejos formados en una cantidad (o cantidades) de la troponina cardíaca y/o FGF-23 (y, opcionalmente, de vitamina D) que reflejan la cantidad o cantidades de troponina cardíaca y/o FGF-23 (y, opcionalmente, de vitamina D) en la muestra; comparar dicha cantidad o cantidades con una referencia (o referencias) y establecer una ayuda a la evaluación de un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes o para diagnosticar MFS anormal basada en el resultado de dicha comparación con dicha referencia o referencias.

Un agente de detección adecuado puede ser, en un aspecto, un anticuerpo que se une específicamente al marcador, es decir, un anticuerpo que se une específicamente a una troponina cardíaca o a un anticuerpo que se une específicamente a FGF-23, en una muestra de un sujeto que debe investigarse mediante el método de la invención. Otro agente de detección que puede aplicarse, en un aspecto, puede ser un aptámero que se une específicamente a la troponina cardíaca o a FGF-23. 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 detección 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 una cantidad de por lo menos un marcador que refleja la cantidad presente efectivamente en la muestra. Dicha cantidad, en un aspecto, puede ser esencialmente la cantidad presente en la muestra o puede ser, en otro aspecto, una cantidad que es una determinada proporción de la misma debido a la relación entre el complejo formado y la cantidad presente en la muestra original.

En todavía otro aspecto del método anteriormente mencionado, la etapa a) puede ser llevada a cabo por una unidad analizadora; en un aspecto, una unidad analizadora tal como se define en otro sitio en la presente memoria.

En un aspecto del método, la cantidad o cantidades determinadas en la etapa a) se comparan con una referencia. En un aspecto, la referencia es una referencia tal como se define en otros sitios en la presente memoria. En todavía otro aspecto, la referencia considera la relación proporcional entre la cantidad medida de complejo y la cantidad presente en la muestra original. De esta manera, las referencias aplicadas en un aspecto del método son referencias artificiales que se adoptan para reflejar las limitaciones del agente de detección que se ha utilizado. En otro aspecto, dicha relación también puede considerarse al llevar a cabo la comparación, p.ej. mediante la inclusión de una etapa de normalización y/o de cálculo de corrección para la cantidad determinada antes de finalmente comparar el valor de la cantidad determinada y la referencia. Nuevamente, la etapa de normalización y/o cálculo de corrección para la cantidad determinada adopta la etapa de comparación de manera que se reflejan correctamente las limitaciones del agente de detección que se ha utilizado. En un aspecto, la comparación se lleva a cabo automáticamente, p.ej. Asistida por un sistema informático o similar.

La ayuda para evaluar si un sujeto será sometido a una evaluación basada en la obtención de imágenes se establece basándose en la comparación realizada en la etapa b) mediante la asignación del sujeto a un grupo de sujetos que serán sometidos a dicha evaluación o a un grupo de sujetos que no serán sometidos a dicha evaluación. La ayuda al diagnóstico de MFS anormal se establece basándose en la comparación realizada en la etapa b), mediante la asignación del sujeto a un grupo de sujetos que sufre de MFS anormal o a un grupo de sujetos que no sufre de MFS anormal. Tal como se comenta en otros sitios en la presente memoria, la asignación del sujeto investigado no debe ser correcta en el 100% de los casos investigados. Además, los grupos de sujetos a los que se asigna el sujeto investigado son grupos artificiales en el aspecto de que se establecen basándose en consideraciones estadísticas, es decir, un determinado grado de probabilidad preseleccionado basándose en el cual actúa el método de la invención. En un aspecto de la invención, la ayuda se establece automáticamente, p.ej. asistida por un dispositivo informático o similar, tal como se indica y da a conocer en la presente memoria.

En un aspecto del método, dicho método comprende además una etapa de recomendación y/o gestión del sujeto según el resultado establecido en la etapa c).

En un aspecto del método anteriormente mencionado, las etapas b) y/o c) son llevadas a cabo por una o más unidades analizadores, tal como se indica en otros sitios en la presente memoria.

La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) una troponina cardíaca y/o FGF-23, o ii) un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca y/o de un agente de detección que se une específicamente a FGF-23, en una muestra de un sujeto, para evaluar si un sujeto será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

En el caso de que se utilice FGF-23, la utilización puede comprender además la utilización de vitamina D. En el caso de que un agente de detección se una específicamente a FGF-23, la utilización puede comprender además la utilización de un agente de detección que se une específicamente a vitamina D. Además, puede calcularse una proporción entre FGF-23 y vitamina D.

La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) una troponina cardíaca y/o FGF-23 (y, opcionalmente, vitamina D) o ii) de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca y/o de un agente de detección que se une específicamente a FGF-23 (y, opcionalmente, de un agente de detección que se une específicamente a vitamina D) para la preparación de una composición farmacéutica o diagnóstica para evaluar si un sujeto será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) una troponina cardíaca y/o FGF-23, o ii) de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca y/o de un agente de detección que se une específicamente a FGF-23, en una muestra de un sujeto para el diagnóstico de MFS anormal.

La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) una troponina cardíaca y/o FGF-23 (y, opcionalmente, vitamina D) o ii) de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca y/o de un agente de detección que se une específicamente a FGF-23 (y, opcionalmente, de un agente de detección que se une

específicamente a vitamina D) para la preparación de una composición farmacéutica o diagnóstica para evaluar si un sujeto sufre de MFS anormal. Un agente preferente es un anticuerpo que se une específicamente al biomarcador que debe medirse.

5 En el caso de que se utilice FGF-23, la utilización puede comprender además la utilización de vitamina D. En el caso de que un agente de detección se una específicamente a FGF-23, la utilización puede comprender además la utilización de un agente de detección que se une específicamente a vitamina D. Además, puede calcularse una proporción entre FGF-23 y vitamina D.

10 La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) FGF-23 y/o IGFBP7 (y opcionalmente de una troponina cardíaca y/o de un péptido natriurético cerebral) o ii) de un agente de detección que se une específicamente a FGF-23 y/o de un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7 (y opcionalmente un agente de detección que se une específicamente a troponina cardíaca y un agente de detección que se une específicamente a un péptido natriurético cerebral) en una muestra de un sujeto para predecir el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular.

15 La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) FGF-23 y/o IGFBP7 (y opcionalmente de una troponina cardíaca y/o de un péptido natriurético cerebral) o ii) de un agente de detección que se une específicamente a FGF-23 y/o de un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7 (y opcionalmente un agente de detección que se une específicamente a troponina cardíaca y un agente de detección que se une específicamente a un péptido natriurético cerebral) para la preparación de una composición farmacéutica o diagnóstica para predecir el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular.

20 En el caso de que se utilice FGF-23, la utilización puede comprender además la utilización de vitamina D. En el caso de que un agente de detección se una específicamente a FGF-23, la utilización puede comprender además la utilización de un agente de detección que se une específicamente a vitamina D. Además, puede calcularse una proporción entre FGF-23 y vitamina D.

25 La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) endostatina y un péptido de tipo PNC, o ii) un agente de detección que se une específicamente a endostatina y/o de un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo PNC, en una muestra de un sujeto que presenta una fracción de eyección ventricular izquierda conservada para el diagnóstico de un estadio temprano de HVI.

30 La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) endostatina y un péptido de tipo PNC, o ii) un agente de detección que se une específicamente a endostatina y/o de un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo PNC para la preparación de una composición farmacéutica o diagnóstica para el diagnóstico de si un sujeto que presenta una fracción de eyección ventricular izquierda conservada presenta un estadio temprano de HVI. Un agente de detección preferente es un anticuerpo que se une específicamente al marcador que debe medirse.

35 La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) endostatina y una troponina cardíaca, o ii) un agente de detección que se une específicamente a endostatina y/o de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca, en una muestra de un sujeto que presenta una fracción de eyección ventricular izquierda conservada para el diagnóstico de un estadio temprano de HVI.

40 La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) endostatina y una troponina cardíaca, o ii) de un agente de detección que se une específicamente a endostatina y de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca, para la preparación de una composición farmacéutica o diagnóstica para el diagnóstico de un estadio temprano de HVI en un sujeto que presenta una fracción de eyección ventricular izquierda conservada. Un agente de detección preferente es un anticuerpo que se une específicamente al marcador que debe medirse.

45 La presente exposición se refiere además a la utilización de: i) endostatina, un péptido natriurético cerebral y una troponina cardíaca, o ii) un agente de detección que se une específicamente a endostatina, de un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo PCN y de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca, en una muestra de un sujeto que presenta una fracción de eyección ventricular izquierda conservada para el diagnóstico de un estadio temprano de HVI.

50 La expresión "agente de detección" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un agente que es capaz de reconocer y unirse específicamente al polipéptido o polipéptidos biomarcadores presentes en una muestra. La expresión se utiliza intercambiamente con el término "ligando" en la presente memoria. Además, dicho agente permite la detección directa o indirecta del complejo formado entre dicho agente y el biomarcador. La detección directa puede conseguirse mediante la inclusión en el agente de un marcaje detectable. El marcaje indirecto puede conseguirse con un agente adicional que se une específicamente al complejo que comprende el biomarcador y el agente de detección, en el que dicho agente adicional entonces es capaz de generar una señal detectable. Los compuestos adecuados que pueden utilizarse como agentes de detección son bien conocidos de la técnica.

Preferentemente, el agente de detección es un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal, o aptámero que se une específicamente al biomarcador tal como se indica en la presente memoria. El término "anticuerpo" ha sido descrito en otro sitio en la presente memoria.

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

- 10 a) una unidad analizadora que comprende un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7 (y opcionalmente un agente de detección que se une específicamente a troponina cardíaca y/o a un agente de detección que se une específicamente a un péptido natriurético cerebral), estando adaptada dicha unidad a la determinación de la cantidad o cantidades del marcador o marcadores en una muestra de un sujeto, y
- 15 b) una unidad analizadora para comparar la cantidad o cantidades determinadas con una o más cantidades de referencia, de manera que se predice el riesgo de mortalidad y/o de un accidente cardiovascular, comprendiendo dicha unidad una base de datos con una cantidad (o cantidades) de referencia y un algoritmo implementado por ordenador para llevar a cabo la comparación.

Las cantidades de referencia y algoritmos preferentes se dan a conocer en otros sitios en la presente memoria.

20 En el caso de que se determinen FGF-23 y vitamina D, se calcula una proporción tal como se indica en otros sitios en la presente memoria y se compara con una proporción de referencia. En este caso, la unidad analizadora tal como se indica en el contexto de los dispositivos anteriormente mencionados permitirá (además) calcular una proporción entre FGF-23 y vitamina D. Además, la base de datos comprenderá valores de las proporciones de referencia.

25 Una realización preferente de la presente exposición incluye un sistema para evaluar si un sujeto se someterá a una evaluación basada en la obtención de imágenes o para el diagnóstico de MFS anormal tal como se indica en otros sitios en la presente memoria. Entre los ejemplos de sistemas se incluyen analizadores de química clínica, analizadores de química de la coagulación, analizadores de inmunoquímica, analizadores de orina, analizadores de ácidos nucleicos, utilizados para detectar el resultado de reacciones químicas o biológicas o para monitorizar el

30 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 Access™ Analyzers, o similares.

35 Las realizaciones del sistema pueden incluir una o más unidades analizadoras para la práctica de la presente exposición. Las unidades analizadoras del sistema 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

40 más grande, que lleva a cabo uno o ambos de entre la detección, p.ej. la evaluación cualitativa y/o 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

45 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.

50 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

55 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,

60 puede contener electrónica adicional de acondicionamiento o procesamiento de la señal. Por ejemplo, un detector óptico puede incluir por lo menos un preamplificador, filtro electrónico o circuito integrado. Entre los preamplificadores adecuados se incluyen, por ejemplo, preamplificadores integrados, transimpedancia y de ganancia de corriente (espejo de corriente).

65 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).

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.

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.

Se infiere a partir 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. 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, casetes 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 se concibe de manera general como una secuencia de etapas 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 una cantidad determinada 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, el dispositivo informático de un sistema dado a conocer en la presente memoria puede proporcionar un "diagnóstico" basándose en dicha comparación de la "cantidad" calculada 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 de un diagnóstico particular.

El dispositivo informático 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 exposición se refiere a un kit adaptado para llevar a cabo un método de la presente invención, que comprende un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca y/o a un agente de detección que se une específicamente a FGF-23, estándares de referencia así como instrucciones para llevar a cabo dicho método. El kit puede comprender además un agente de detección que se une específicamente a la vitamina D.

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 comprenderá por lo menos un estándar de una referencia tal como se ha definido anteriormente 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 del 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.

A continuación, se proporcionan ejemplos preferentes. Las definiciones y explicaciones proporcionadas en la presente memoria se aplican por analogía.

1. Un método para evaluar si un sujeto se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes, que comprende las etapas de:

- a) determinar la cantidad o cantidades de una troponina cardíaca y/o factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) en una muestra del sujeto y
- b) comparar la cantidad o cantidades determinadas de esta manera con una cantidad de referencia (o cantidades de referencia), de manera que se evalúa si el sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

2. El método según la realización 1, en el que el sujeto sufre de hipertensión.

3. El método según las realizaciones 1 y 2, en el que el sujeto no sufre de hipertrofia ventricular izquierda, en particular en el que el sujeto presenta una masa ventricular izquierda normal.

4. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en el que la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes es la obtención de imágenes de ecocardiografía o de resonancia magnética.

5. El método según cualquiera de las realizaciones 1 y 4, en el que la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes es para el diagnóstico de la disfunción diastólica y/o sistólica, en particular para el diagnóstico de la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal.

6. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que una cantidad incrementada en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia indica que el sujeto se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

7. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en el que una cantidad reducida en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia indica que el sujeto no se someterá a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

8. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en el que la cantidad de referencia es una cantidad de referencia calculada.

9. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en el que la cantidad de referencia es la cantidad de una troponina cardíaca y/o de FGF-23 en una primera muestra que ha sido obtenida del sujeto antes de la muestra indicada en la etapa a) de la realización 1 ("segunda muestra").

10. El método según la realización 9, en el que la primera muestra ha sido obtenida 6 a 18 meses antes de la segunda muestra.

11. El método según la realización 9 o 10, en el que una cantidad de una troponina cardíaca, en particular de la troponina T, en la segunda muestra que es por lo menos 10% o, en particular, por lo menos 25% superior a la cantidad en la primera muestra, y/o en el que una cantidad de FGF-23 en la segunda muestra que es por lo menos 5% o, en particular, por lo menos 10% superior a la cantidad en la primera muestra es indicativa de que un sujeto que será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

12. El método según cualquiera de las realizaciones 9 a 11, en el que el sujeto no sufría de MFS anormal en el tiempo en el que se obtuvo la primera muestra.

13. El método según cualquiera de las realizaciones 9 a 12, en el que el sujeto sufría de hipertensión en el tiempo en el que se obtuvo la primera muestra.

14. Un método para el diagnóstico de la fracción de acortamiento de la pared miocárdica media (MFS) anormal en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a) determinar la cantidad de una troponina cardíaca y/o factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) en una muestra del sujeto y
- b) comparar la cantidad determinada de esta manera con una cantidad de referencia, de manera que se diagnostica una fracción de acortamiento de la pared miocárdica media anormal.

15. El método según la realización 14, en el que el sujeto no sufre de hipertrofia ventricular izquierda, en particular en el que el sujeto presenta una masa ventricular izquierda normal.

16. El método según las realizaciones 14 y 15, en el que una cantidad incrementada en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia indica que el sujeto sufre de MFS anormal y en el que una cantidad reducida en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia indica que el sujeto no sufre de MFS anormal.

17. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 16, en el que la muestra es una muestra de sangre, suero o plasma.

18. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 17, en el que se determinan las cantidades de tanto una troponina cardíaca como de FGF-23.

19. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 18, en el que, en el caso de que se determine la cantidad de FGF-23, el método comprende la determinación de la cantidad de vitamina D en la etapa a) además de la determinación de FGF-23, el cálculo de una proporción entre la cantidad de FGF-23 y la cantidad de vitamina D en una etapa adicional a1) y la comparación de la proporción calculada de esta manera con una proporción de referencia.

20. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 19, en el que el sujeto no sufre de función renal deteriorada.

21. El método según cualquiera de las realizaciones 1 a 20, en el que el sujeto no presenta niveles incrementados de NT-proPNC, en particular en una muestra de sangre, suero o plasma.

22. Utilización de: i) una troponina cardíaca y/o FGF-23, o ii) un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca y/o de un agente de detección que se une específicamente a FGF-23, en una muestra de un sujeto, para evaluar si un sujeto será sometido a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

23. Un dispositivo adaptado para llevar a cabo el método según las realizaciones 1 a 13, que comprende:

a) una unidad analizadora que comprende un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca y/o un agente de detección que se une específicamente a FGF-23 (y, opcionalmente, en el caso de que se determine FGF-23, un agente de detección que se une específicamente a la vitamina D), estando adaptada dicha unidad a la determinación de la cantidad o cantidades de uno o más marcadores en una muestra de un sujeto, y

b) una unidad analizadora para comparar la cantidad o cantidades determinadas con una o más cantidades de referencia, de manera que se evalúa si el sujeto se someterá a una evaluación basada en la obtención de imágenes, comprendiendo dicha unidad una base de datos con una cantidad (o cantidades) de referencia y un algoritmo implementado por ordenador para llevar a cabo la comparación.

Las figuras muestran:

Figura 1A: niveles de endostatina y de NT-proPNC en sujetos femeninos con HVI límite / masas del VI moderadamente elevadas.

Figura 1B: niveles de endostatina y de cTnT en sujetos femeninos con HVI límite / masas del VI moderadamente elevadas.

Figura 2A: niveles de endostatina y de cTnT en sujetos masculinos con HVI límite / masas del VI moderadamente elevadas.

Figura 2B: niveles de endostatina y de NT-proPNC en sujetos masculinos con HVI límite / masas del VI moderadamente elevadas.

Los Ejemplos a continuación se proporcionan a título meramente ilustrativo de la invención. No deben interpretarse, en modo alguno, como limitativos del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Cohorte de pacientes

Se examinó la relación entre los niveles plasmáticos de FGF-23 (ELISA, Immotopics), 25-hidroxivitamina D total (ECLIA, Roche Diagnostics), IFGBP7, endostatina, mimecán y 2 marcadores cardíacos (hs-cTnT y NT-proPNC, ensayos de Roche Elecsys) y masa del VI elevada/ASC ($>95 \text{ g/m}^2$ para mujeres, >115 para hombres), fracción de acortamiento de la pared miocárdica media subnormal (MFS $<15\%$) y mortalidad en 2.001 personas de edad avanzada (edad promedio 73 ± 5 años, 48% mujeres), residentes en el centro de Italia (estudio PREDICTOR). Los sujetos fueron divididos en 4 categorías según los valores normales del índice de masa del VI y MF. Se determinaron los marcadores en muestras de plasma. Se encontraban disponibles los datos de mortalidad por todas las causas para un subgrupo de 1.200 sujetos tras una mediana de seguimiento de 47 meses (86 muertes).

Se examinaron tres marcadores (endostatina, IGFBP7, mimecán/osteoglicina) en 550 sujetos de edad avanzada seleccionados de entre los 2.001 sujetos de edades entre 65 y 84 años del estudio epidemiológico PREDICTOR. Esta subcohorte comprendía 50 sujetos normales, 150 sujetos en el estadio A de AHA/ACC y 300 sujetos en el estadio B. La mediana de seguimiento fue de 47 meses (21 muertes).

Los sujetos fueron divididos en 4 categorías según los valores normales del índice de masa del VI y MFS.

a) sujetos con índice de masa del VI normal (masa del VI/ASC $\leq 95 \text{ g/m}^2$ para mujeres y $\leq 115 \text{ g/m}^2$ para hombres) Y MFS normal ($\geq 15\%$)

b) sujetos con índice de masa del VI normal (masa del VI/ASC $\leq 95 \text{ g/m}^2$ para mujeres y $\leq 115 \text{ g/m}^2$ para hombres) Y MFS anormal ($< 15\%$)

- c) sujetos con índice de masa del VI elevada (masa del VI/ASC > 95 g/m² para mujeres y >115 g/m² para hombres) Y MFS normal (≥ 15%)
 d) sujetos con índice de masa del VI elevada (masa del VI/ASC > 95 g/m² para mujeres y >115 g/m² para hombres) Y MFS normal (< 15%)

Ejemplo 2: Ensayos

Se determinó la troponina T utilizando el ensayo ELISA de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia de Roche, ensayo Elecsys Troponin T hs (por sus siglas en inglés, alta sensibilidad) STAT (tiempo de ejecución corto). El ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra la troponina cardíaca T humana. Los anticuerpos reconocen dos epítomos (posiciones aminoácidas 125 a 131 y 136 a 147) situados en la parte central de la proteína troponina T cardíaca, que consiste en 288 aminoácidos. El ensayo hs-TnT permite una medición de los niveles de troponina T en el intervalo de 3 a 10.000 pg/ml.

Se determinó NT-proPNC utilizando el ensayo ELISA de electroquimioluminiscencia de Roche llamado Elecsys proBNP II STAT (por sus siglas en inglés, tiempo de ejecución corto). El ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos situados en la parte N-terminal (1-76) de proPNO (1-108).

Se determinó la FGF-23 humana mediante la utilización del kit ELISA (C-term) de Immutopics Inc., nº de cat. 60-6100, ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) de segunda generación para la determinación de los niveles de factor de crecimiento fibroblástico 23 humano en plasma o medio de cultivo celular. Dicho kit ELISA (C-term) de FGF-23 humano de 2a generación es un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) de dos sitios para la medición de FGF-23 en plasma o en medios de cultivo celular. Se seleccionaron dos anticuerpos policlonales de cabra purificadas por afinidad para detectar epítomos en la parte carboxilo-terminal (C-term) de FGF-23. Un anticuerpo se encontraba biotinilado para la captura y el otro anticuerpo se conjugó con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) para la detección. Dichos anticuerpos se unen tanto a la molécula intacta como a fragmentos carboxilo-terminales grandes de FGF-23 humano. Se incubó una muestra que contenía FGF-23 humano simultáneamente con el anticuerpo de captura biotinilado y el anticuerpo conjugado con HRP en un pocillo de microtitulación recubierto con estreptavidina. FGF-23 dentro de la muestra se unió inmunológicamente al anticuerpo de captura y al anticuerpo de detección formando un complejo "de tipo sándwich". Al final de dicho periodo de incubación se lavó el pocillo para eliminar cualquier anticuerpo no unido y otros componentes. El enzima unido al pocillo se incubó con una solución de sustrato en una reacción cronometrada y después se midió en un lector espectrofotométrico de placas de microtitulación. La actividad enzimática del complejo de anticuerpo unido al pocillo es directamente proporcional a la cantidad de FGF-23 en la muestra. Se generó una curva estándar mediante la representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración respectiva de FGF-23 para cada estándar en escalas lineales o logarítmicas. Se determinó la concentración de FGF-23 humano en las muestras directamente a partir de dicha curva.

Para la detección de mímecán en suero o plasma humano, se utilizó un ELISA de tipo sándwich. Para la captura y detección del antígeno, se conjugaron alícuotas de un anticuerpo policlonal anti-mímecán de R&D Systems (número de catálogo AF 2660) con biotina y digoxigenina, respectivamente. Las placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina se recubrieron con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-mímecán biotinilado durante 60 min a razón de 0,2 µg/ml en 1x solución de PBS. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%, se bloquearon con PBS + BSA al 2% (albúmina de suero bovino) durante 45 min y después se lavaron nuevamente tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%. A continuación, los pocillos se incubaron durante 1 h con 100 µl de una dilución en serie de mímecán recombinante como antígeno estándar o con muestras de suero o plasma diluido (1:5 en 1x PBS + BSA al 1%) procedentes de pacientes o individuos de control, respectivamente. Tras la unión del mímecán, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%. Para la detección específica del mímecán unido, los pocillos se incubaron con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-mímecán digoxigenilado durante 45 min a una concentración de 0,2 µg/ml en 1x PBS + BSA al 1%. Después, las placas se lavaron tres veces para eliminar el anticuerpo no unido. En una etapa siguiente, los pocillos se incubaron con 100 µl de 75 mU/ml de conjugados de anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 1633716) durante 30 min en 1x PBS + BSA al 1%. Las placas seguidamente se lavaron seis veces con el mismo tampón de lavado que anteriormente. Para la detección de los complejos de antígeno-anticuerpo, los pocillos se incubaron con 100 µl de solución de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11685767) y se midió la densidad óptica (DO) tras 15 minutos a 405 nm y 492 nm con un lector de ELISA.

Para la medición de la endostatina en suero o plasma humano, se utilizó un ELISA de tipo sándwich disponible comercialmente (inmunoensayo de endostatina humana Quantikine, número de catálogo DNSTO, R&D Systems). Las mediciones se realizaron siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para la detección de IGFBP7 en muestras de suero o plasma humano, se reveló un ELISA de tipo sándwich. Para la captura y detección del antígeno, se conjugaron alícuotas de un anticuerpo policlonal anti-IGFBP7 de R&D Systems (número de catálogo AF 1334) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

Ejemplo 3: ResultadosAlteraciones sutiles de la geometría del VI - factor de acortamiento de la pared miocárdica media

- 5 Se muestran los resultados en la Tabla 1. Las medianas de concentración de hs-cTnT, NT-proPNC, FGF-23 y vitamina D de promedio eran bajas. Las medianas de concentración de hs-cTnT, NT-proPNC y FGF-23/vitamina D eran más elevadas en sujetos con masa del VI elevada y/o MFS subnormal (para ambos, ajustados para sexo y edad). El FGF-23 y la vitamina D se encontraban significativamente asociadas a la masa del VI con independencia de hs-cTnT.

10

Tabla 1: Categorías de índice de masa del VI / MFS

	Categorías de índice de masa del VI / MFS				P*
	IMVI normal	IMVI normal	IMVI elevada	IMVI elevada	
	MFS normal	MFS anormal	MFS normal	MFS anormal	
N	918 (57,8)	275 (17,3)	189 (11,9)	206 (13)	
Edad (años)	72,1 (4,8)	73,3 (5,2)	72,9 (4,9)	74,3 (5,1)	<0,0001
Mujeres	444 (48,4)	108 (39,3)	130 (68,8)	120 (58,3)	0,0525
masa del VI/ASC (g/m ²)	81,1 (14,1)	88,0 (13,8)	116,0 (18,0)	125,7 (22,8)	<0,0001
MFS (%)	17,4 (1,6)	13,5 (1,2)	16,5 (1,3)	12,8 (2,0)	P
Marcadores					
NT-proPNC	78	80	124	182	<0,0001
Hs-cTnT	4,3	5,9	5,48	8,5	<0,0001
Vitamina D [ng/ml]	13,53	13,71	9,88	10,64	0,0021
FGF-23 [unidades relativas/ml]	69,1	74,0	76,2	84,1	<0,0001
FGF-23/vitamina D [#]	5,3	5,9	6,8	8,3	<0,0001
*P ajustado para sexo y edad. # proporción entre los niveles circulantes de FGF-23 y vitamina D (calculados individualmente para cada sujeto).					

Las medianas de concentración de NT-proPNC no se encontraban incrementadas en sujetos de edad avanzada con índice de masa del VI normal Y MFS subnormal frente a sujetos de edad avanzada con masa del VI normal Y MFS normal.

15

En contraste, las medianas de concentración de hs-cTnT y la proporción de medianas de concentración de FGF-23/vitamina D se encontraban significativamente incrementadas, en 37% y 11%, en sujetos de edad avanzada con índice de masa del VI normal Y MFS subnormal frente a sujetos de edad avanzada con masa del VI normal Y MFS normal.

20

Los niveles de troponina cardíaca y de FGF-23 se encontraban elevados en sujetos de edad avanzada con alteraciones sutiles de la geometría y función del VI (incluso antes de producirse alteraciones detectables de la geometría del VI). De esta manera, la determinación de dichos marcadores ayudará a identificar un fenotipo intermedio en la progresión de hipertensión a disfunción sistólica o diastólica en el que la HVI se vuelve evidente (mediante Ecoc, MRI y ECG). La proporción de FGF-23 / vitamina D puede determinarse adicionalmente. Un nivel incrementado de un marcador seleccionado de entre troponina cardíaca, FGF-23 (preferentemente la proporción FGF-23/vitamina D) respecto al nivel de referencia respectivo indica que el paciente sufre de MFS.

25

Mortalidad/sucesos cardiovasculares

30

Se determinó NT-proPNC, hs-cTnT, vitamina D y FGF-23 en 1.202 sujetos con datos de mortalidad por todas las causas. La mediana de seguimiento fue de 47 meses [Q1-Q3, 39-55]. Se muestran los resultados en la tabla a continuación. Se muestran datos continuos como medias $\pm$ SD, excepto para los biomarcadores circulantes (mediana [Q1-Q3]). Datos categóricos como n (%).

35

Marcadores según estado de supervivencia (fallecidos vs. vivos)

	Todos los sujetos (con datos de mortalidad disponibles)	Fallecidos (mortalidad por todas las causas)	Supervivientes	P
n°	1202	86	1116	
Biomarcadores (Mediana [Q1-				
hs-cTnT (ng/l)	5,4 [3,0-9,7]	10,0 [5,2-18,6]	5,2 [3,0-9,2]	<0,001
Hs-cTnT > 3ng/l (n,%)	820 (68,6)	70 (81,4)	750 (67,6)	0,008
NT-proPNC (ng/l)	90 [44-186]	192 [108-441]	85 [42 - 174]	<0,001
Vitamina D (ng/ml)	12,8 [7,2-20,5]	8,8 [4,5-17,5]	13,1 [7,4-	<0,001
FGF-23 (UR/ml)	74,9 [58,5 - 100,1]	90,2 [66,4 - 137,0]	74,3 [58 - 97,3]	<0,001

La tabla a continuación proporciona una vista general más completa (e incluye, p.ej., las características clínicas):

	Todos los sujetos (con datos de mortalidad disponibles)	Fallecidos (mortalidad por todas las causas)	Supervivientes	P
Nº (%)	1202	86	1116	
Edad (años, media±SD)	73 (5,0)	75,1 (5,2)	72,8 (5,0)	<0,0001
Mujeres (n, %)	580 (48,3)	36 (41,9)	544 (48,7)	0,218
Normal	134 (11,1)	5 (5,8)	129 (11,6)	<0,0001
A	249 (20,7)	16 (18,6)	233 (20,9)	
B	737 (61,3)	50 (58,1)	687 (61,6)	
C	82 (6,8)	15 (17,4)	67 (6,0)	
Hipertrofia del VI en ECG (n, %)	76 (6,8)	7 (9,9)	69 (6,6)	0,508
MFS (%)	13,7 (6,1)	12,2 (6,4)	13,8 (6,1)	0,018
MFS reducida * (n, %)	296 (29,6)	32 (47,8)	264 (28,3)	0,001
FEVI (n, %)	66,3 (7,4)	63,4 (8,1)	66,5 (7,3)	<0,0001
Prevalencia de IC (n, %)	82 (7,1)	15 (19,0)	67 (6,2)	<0,0001
Prevalencia de disfunción diastólica (n, %)	553 (49,1)	44 (57,9)	509 (48,5)	0,113
hs-cTnT (ng/l)	5,4 [3,0-9,7]	10,0 [5,2-18,6]	5,2 [3,0-9,2]	<0,001
NT-proPNC (ng/l)	90 [44-186]	192 [108 - 441]	85 [42 - 174]	<0,001
Vitamina D (ng/ml)	12,8 [7,2-20,5]	8,8 [4,5 - 17,5]	13,1 [7,4 - 20,7]	<0,001
FGF-23 (UR/ml)	74,9 [58,5 - 100,1]	90,2 [66,4- 137,0]	74,3 [58- 97,3]	<0,001

Tal como puede observarse en la tabla, 86 sujetos (7,1%) fallecieron durante el seguimiento de aproximadamente 4 años. Las concentraciones en plasma de hs-cTnT, NT-proPNC y FGF-23 eran más altas en los fallecidos, mientras que la vitamina D era más baja.

La tabla a continuación proporciona los análisis de Cox univariantes para la asociación entre las concentraciones de los biomarcadores y la mortalidad por todas las causas (CR: cociente de riesgos)

	CR	p
NT-proPNC	1,971	<0,0001
hs-cTnT	2,650	<0,0001
Vitamina D	0,585	<0,0001
FGF-23	2,081	<0,0001

Tal como puede observarse en la tabla, NT-proPNC, hs-cTnT, vitamina D y FGF-23 se encontraban significativamente asociados a la mortalidad por todas las causas en los análisis univariantes.

La tabla a continuación proporciona un análisis de Cox multivariante para la asociación entre las concentraciones de los biomarcadores y la mortalidad por todas las causas después de los ajustes.

	CR	p
NT-proPNC	1,707	<0,0001
hs-cTnT	2,102	<0,0001
Vitamina D	0,684	0,016
FGF-23	1,884	<0,0001

De esta manera, los niveles circulantes más altos de FGF-23 (CR 1,88 [1,40-2,54], $p < 0,0001$) y las concentraciones más bajas de vitamina D (CR 0,68 [0,50-0,93], $p = 0,02$) se encontraban asociados a mortalidad por todas las causas (86 fallecimientos, 7,2%) tras el ajuste para variables demográficas y clínicas y para biomarcadores cardíacos de referencia (NT-proPNC o hs-cTnT).

Además, los marcadores IGFBP7, mimecán y endostatina se sometieron a ensayo en muestras de 550 sujetos de edad avanzada seleccionados del estudio Predictor. Se muestran los resultados en la tabla a continuación. Se muestran datos continuos como medias $\pm$ SD, excepto para los biomarcadores circulantes (mediana [Q1-Q3]). Datos categóricos como n (%).

Marcadores según estado de supervivencia (fallecidos vs. vivos)

	Todos los sujetos (con datos de mortalidad disponibles)	Fallecidos (mortalidad por todas las causas)	Supervivientes	P (fallecidos vs. supervivientes)
nº	511	21	490	
Biomarcadores				

(Mediana [Q1-Q3])				
hs-cTnT (ng/l)	5,8 [3 - 9,5]	14,9 [9,1 - 17,6]	5,5 [3 - 8,9]	<0,001
NT-proPNC (ng/l)	95 [47 - 210]	304 [170 - 959]	90 [46 - 198]	<0,001
IGFBP7 (ng/ml)	99 [85 - 113]	124 [106 - 143]	98 [85 - 112]	<0,001
Mimecán (ng/ml)	72 [55 - 98]	68 [61 - 92]	72 [55 - 98]	0,650
Endostatina (ng/ml)	164 [138 - 201]	158 [150 - 200]	164 [138 - 201]	0,979

La tabla a continuación proporciona una vista general más completa (e incluye, p.ej., las características clínicas):

	Todos los sujetos (con datos de mortalidad disponibles)	Fallecidos (mortalidad por todas las causas)	Supervivientes	P (fallecidos vs. supervivientes)	
Nº (%)	511	21	490		
Edad (años, media±SD)	72,8 (5,1)	76,0 (4,7)	72,7 (5,1)	0,004	
Mujeres (n, %)	248 (48,5)	4 (19,0)	244 (49,8)	0,005	
estadio de ACC/AHA (%)					
Normal	44 (8,6)	0	44 (9,0)	0,060	
A	138 (27,0)	9 (42,9)	129 (26,3)		
B	282 (55,2)	8 (38,1)	274 (55,9)		
C	47 (9,2)	4 (19,0)	43 (8,8)		
Resultados de ecocardiografía / ECG					
Hipertrofia del VI en ECG (n, %)		50 (10,7)	2 (11,1)	48 (10,7)	0,844
MFS (%)		14,0 (5,7)	11,8 (6,8)	14,1 (5,6)	0,082
FEVI (n, %)		65,9 (7,9)	60,9 (10,3)	66,1 (7,8)	0,007
Prevalencia de IC (n, %)		47 (9,6)	4 (22,2)	43 (9,1)	0,084
Prevalencia de disfunción diastólica (n, %)		196 (43,3)	9 (56,3)	187 (42,8)	0,036
IGFBP7 R&D (ng/ml)		99 [85 - 113]	124 [106 - 143]	98 [85 - 112]	<0,001
Mimecán (ng/ml)		72 [55 - 98]	68 [61 - 92]	72 [55 - 98]	0,650
Endostatina (ng/ml)		164 [138 - 201]	158 [150 - 200]	164 [138 - 201]	0,979

- 5 Observación: tal como puede observarse en la tabla, la mediana de FEVI era superior a 65%. De esta manera, los sujetos sometidos a ensayo no sufrían de insuficiencia cardíaca sistólica. 21 sujetos (4,1%) fallecieron durante el seguimiento de aproximadamente 4 años. La mediana de la FEVI de los fallecidos fue >60%. Las concentraciones plasmáticas de todos los biomarcadores IGFBP7 pero no de mimecán y endostatina eran significativamente más altos en los fallecidos.

10 La tabla a continuación proporciona los análisis de Cox univariantes para la asociación entre las concentraciones de los biomarcadores y la mortalidad por todas las causas (CR: cociente de riesgos)

	CR	P
NT-proPNC	2,271	<0,0001
hs-cTnT	4,180	<0,0001
IGFBP7	12,081	<0,0001
Mimecán	0,941	0,882
Endostatina	1,161	0,839

- 15 NT-proPNC, hs-cTnT e IGFBP7 pero no mimecán y endostatina se encontraban asociados significativamente a mortalidad por todas las causas en los análisis univariantes. Cabe destacar que los cocientes de riesgos más altos se observaron para IGFBP7. De esta manera, IGFBP7 es un mejor factor predictivo de riesgo de mortalidad que la troponina T o NT-proPNC.

20 La tabla a continuación proporciona un análisis de Cox multivariante para la asociación entre las concentraciones de los biomarcadores y la mortalidad por todas las causas después de los ajustes.

	CR	P
NT-proPNC	2,122	0,001
hs-cTnT	3,040	0,004
IGFBP7	10,312	0,015
Mimecán	0,829	0,614
Endostatina	0,389	0,261

Tras los ajustes, NT-proPNC, hs-cTnT e IGFBP7 se encontraban significativamente asociados a mortalidad por todas las causas. Los cocientes de riesgos más grandes se observaron para IGFBP7.

Detección de cambios cardíacos sutiles

Se examinaron 7 marcadores (NT-proPNC, hsTnT, endostatina, IGFBP7, mimecán/osteoglicina, FGF-23 y vitamina D) en 550 sujetos de edad avanzada seleccionados del estudio PREDICTOR. Las características clínicas de dicha subcohorta se han indicado anteriormente. Los niveles de troponina cardíaca, FGF-23, IGFBP7, endostatina y mimecán se encontraban elevados, mientras que el nivel de vitamina D se encontraba reducido en sujetos con cambios miocárdicos sutiles, HVI y/o MFS reducido y con fracción de eyección conservada (FEVI>55%). De esta manera, la determinación de dichos marcadores ayudará a identificar un fenotipo intermedio en la progresión de hipertensión a insuficiencia cardíaca. La proporción de FGF-23 / vitamina D puede determinarse adicionalmente. Un nivel incrementado de un marcador seleccionado preferentemente de entre NT-proPNC, endostatina, troponina cardíaca o de entre FGF-23 (preferentemente la proporción FGF-23/vitamina D) y mimecán respecto al nivel de referencia respectivo indica que el paciente sufre de cambios cardíacos sutiles, MFS y/o HVI.

La tabla a continuación proporciona las sensibilidades a una especificidad de 80% de la combinación de NT-proPNC o troponina cardíaca T y endostatina en la detección de muestras de estados tempranos de IC (n=352) en la subcohorta de 550 pacientes del estudio Predictor. Las muestras derivadas de pacientes con HVI límite o masas del VI moderadamente elevadas (mujeres con masas del VI de 96 a 121 g/m²; hombres con masas del VI de 116 a 148 g/m²) o MFS anormal o de estadio C. El grupo de control comprendía muestras de pacientes con estadios de IC 0 o A (n=211).

	Especificidad	Sensibilidad
NT-proPNC	80%	113 (32%)
cTnT hs	80%	141 (40%)
Endostatina	80%	141 (40 %)
NT-proPNC + Endostatina	80%	149 (43%)
cTnThs + Endostatina	80%	166 (47%)

Tal como se deriva de la tabla, la combinación de NT-proPNC o cTnThs con endostatina detecta una proporción más alta de pacientes con cambios cardíacos sutiles, HVI, MFS anormal, insuficiencia cardíaca temprana estadios B y C frente a ambos marcadores solos. Tal como puede deducirse a partir de la tabla, varios pacientes con masa del VI anormal límite leve a moderada (95 a 132 g/m² en el caso de las mujeres y 116 a 149 g/m² en el caso de los hombres) no son detectados con NT-proPNC (239/352) o con cTnT (211/352) o endostatina (211/352) por sí solos a una especificidad de 80% en el grupo de control (211 muestras de estadio 0 o A sin cambios miocárdicos sutiles).

La combinación de dos marcadores resultó en una sensibilidad ligeramente mejorada de 43% (endostatina y NT-proPNC) frente a ambos marcadores por sí solos: 32% (NT-proPNC) y 40% (endostatina) a una especificidad de 80%. La combinación de dos marcadores resultó en una sensibilidad todavía más pronunciada, de 47% (endostatina y cTnThs) frente a ambos marcadores por sí solos, de 40% (cTnThs) y 40% (endostatina) a una especificidad de 80%. La combinación de cTnT y endostatina resulta particularmente preferente para la detección de estadios tempranos de IC con masas del VI moderadamente elevadas o MFS anormales.

Una combinación de marcadores preferente adicional para la detección de cambios miocárdicos sutiles, MFS anormal o masas del VI moderadamente elevadas o HVI límite en muestras de pacientes con estadios tempranos de IC comprende troponina cardíaca altamente sensible, endostatina y la proporción FGF-23 a vitamina D.

Los niveles de los marcadores endostatina, NT-proPNC y cTnT en mujeres u hombres con masas del VI límite o moderadamente elevadas se muestran en las figuras 1 y 2.

Tal como se deduce de las figuras, varias muestras de sujetos con cambios miocárdicos sutiles se encuentran asociadas a niveles de marcador bajos (inferiores a la mediana indicada por la línea). La mediana se refiere a niveles de marcador en el grupo de control (estadio 0 o A sin cambios miocárdicos sutiles). Tal como puede deducirse adicionalmente de los gráficos, se detectan diferentes subgrupos de muestras con los diferentes marcadores. En particular, en sujetos femeninos, una combinación de marcadores de endostatina y NT-proPNC o de endostatina y cTnT resulta preferente para mejorar la sensibilidad.

Estudios de caso

Un paciente femenino de 75 años de edad con insuficiencia cardíaca de clase A presenta un IMC inferior a 30 kg/m² e hipertensión. Se determinó la troponina T y FGF-23 en una muestra de suero obtenida del paciente (con los kits indicados anteriormente). El valor de la troponina T era de 7,1 pg/ml, el valor de FGF-23 era de 93 UR/ml (unidades relativas/ml, Immunotopics), que es indicativo de que debería llevarse a cabo una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Para confirmar la evaluación basada en biomarcadores, se llevó a cabo el ensayo diagnóstico basado en la obtención de imágenes de disfunción diastólica utilizando un algoritmo multiparamétrico derivado de Doppler que incluía índices de tipo Doppler de flujo transmitral y flujo de la vena pulmonar e imágenes Doppler de tejidos del anillo mitral lateral (E/e') como estimación indirecta de presiones de llenado del VI incrementadas. Se diagnosticó que el paciente presentaba disfunción diastólica. Lo anterior confirma que la

detección de troponina T y FGF-23 permite una evaluación fiable de si el sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Un paciente femenino de 71 años de edad con insuficiencia cardíaca de clase A presenta un IMC inferior a 30 kg/m² e hipertensión. Se determinaron los niveles de troponina T y FGF-23 en una muestra de suero obtenida del paciente. El valor de troponina T era inferior a 3,0 pg/ml; el valor de FGF-23 era de 59 UR/ml, que eran indicativos de que no resultaba necesaria la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Para confirmar la evaluación basada en biomarcadores, se llevó a cabo el ensayo diagnóstico basado en la obtención de imágenes de disfunción diastólica utilizando un algoritmo multiparamétrico derivado de Doppler que incluía índices de tipo Doppler de flujo transmitral y flujo de la vena pulmonar e imágenes Doppler de tejidos del anillo mitral lateral (E/e') como estimación indirecta de presiones de llenado del VI incrementadas. Se diagnosticó que el paciente no presentaba disfunción diastólica, confirmando de esta manera que la detección de la troponina T permite una evaluación fiable de si el sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Un paciente femenino de 69 años de edad con insuficiencia cardíaca de clase A presenta un IMC inferior a 30 kg/m² e hipertensión. Se determinaron los niveles de troponina T y FGF-23 en una muestra de suero obtenida de la paciente. El valor de troponina T era de 6,5 pg/ml; el valor de FGF-23 era de 99 UR/ml, que eran indicativos de que resultaba necesaria la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Por lo tanto, se llevaron a cabo ensayos diagnósticos basados en la obtención de imágenes para confirmar la evaluación basada en biomarcadores. Se calculó la función sistólica del VI al nivel de la pared media (fracción de acortamiento de la pared miocárdica media, MFS) utilizando un modelo elipsoidal modificado. Además, se calculó la masa del VI siguiendo las recomendaciones de la Sociedad americana de ecocardiografía y de la Asociación europea de ecocardiografía (AEC). Se diagnosticó que el paciente presentaba un MFS subnormal y masa del VI normal, confirmando de esta manera que la detección de la troponina T permite una evaluación fiable de si un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Un paciente masculino de 76 años de edad con insuficiencia cardíaca de clase A presenta un IMC inferior a 30 kg/m² e hipertensión. Se determinó el nivel de troponina T en una muestra de suero obtenida de la paciente. El valor de troponina T era inferior a 3 pg/ml; el valor de FGF-23 era de 64 UR/ml, que eran indicativos de que no resultaba necesaria la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Se llevó a cabo el diagnóstico de la función sistólica para confirmar la evaluación basada en biomarcadores. Se calculó la función sistólica del VI al nivel de la pared media (fracción de acortamiento de la pared miocárdica media, MFS) utilizando un modelo elipsoidal modificado. Además, se calculó la masa del VI siguiendo las recomendaciones de la Sociedad americana de ecocardiografía y de la Asociación europea de ecocardiografía (AEC). Se diagnosticó que el paciente presentaba un MFS subnormal y masa del VI normal, confirmando de esta manera que la detección de la troponina T permite una evaluación fiable de si un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Un paciente femenino de 66 años de edad con insuficiencia cardíaca de clase A presenta un IMC inferior a 40 kg/m², hipertensión y diabetes. Se determinó el nivel de troponina T en una muestra de suero obtenida de la paciente. El valor de la troponina T era inferior a 3,0 pg/ml, que es indicativo de que no resulta necesaria la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Se informó al paciente de que debía volver a una vista de seguimiento en 12 meses o si se agravaban los síntomas. Tras 12 meses, el paciente volvió para una vista de seguimiento. Se determinó el nivel de troponina T en una muestra de suero obtenida de la paciente. El valor de troponina T era de 3,5 pg/ml, que es indicativo de que resulta necesaria la evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes. Por lo tanto, se llevaron a cabo ensayos diagnósticos basados en la obtención de imágenes para la función sistólica con el fin de confirmar la evaluación basada en la troponina. Se calculó la función sistólica del VI al nivel de la pared media (fracción de acortamiento de la pared miocárdica media, MFS) utilizando un modelo elipsoidal modificado. Además, se calculó la masa del VI siguiendo las recomendaciones de la Sociedad americana de ecocardiografía y de la Asociación europea de ecocardiografía (AEC). Se diagnosticó que el paciente presentaba un MFS subnormal y masa del VI normal, confirmando de esta manera que la detección de la troponina T permite una evaluación fiable de si un sujeto debe someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

Conclusiones:

Conclusiones: los niveles de hs-cTnT y FGF-23 se encuentran elevados en sujetos de edad avanzada con alteraciones sutiles de la geometría y función del VI y podrían ayudar a identificar un fenotipo intermedio temprano en la progresión a insuficiencia cardíaca. En particular, los niveles de hs-cTnT y la proporción de niveles de FGF-23/vitamina D se encuentran elevados en sujetos de edad avanzada con índice de masa del VI normal y MFS anormal.

La aplicación generalizada del cribado ecocardiográfico para la disfunción sistólica/diastólica se ha visto limitada por consideraciones de coste-beneficio. Sin embargo, esta desventaja podría superarse mediante la aplicación del método de la presente invención. Mediante la determinación de la cantidad de una troponina cardíaca y/o de FGF-23, resulta posible evaluar si resultaría necesaria o no una evaluación basada en la obtención de imágenes de la

función cardíaca. De acuerdo con lo anterior, llevando a cabo el método de la presente invención pueden evitarse gastos innecesarios de la atención sanitaria.

5 La detección de cambios miocárdicos tempranos sutiles y/o de HVI temprana puede mejorarse mediante la combinación de biomarcadores seleccionados de entre NT-proPNC, troponina T y endostatina. Además de los marcadores mimecán, puede determinarse FGF23/vitamina D y GDF15 para detectar cambios miocárdicos tempranos sutiles.

10 La detección de los marcadores a los que se hace referencia en la presente memoria permitirá estratificar si un paciente hipertenso con una masa ventricular izquierda normal y que no sufre de hipertrofia ventricular izquierda debería someterse a una evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes para el diagnóstico de una disfunción diastólica o sistólica (preferentemente ecocardiográfica), en el que un nivel incrementado de uno o más marcadores respecto al nivel de referencia respectivo indica que el paciente debería someterse a evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes y en el que cualquier otro nivel del marcador o marcadores indica
15 que el paciente no debería someterse a evaluación diagnóstica basada en la obtención de imágenes.

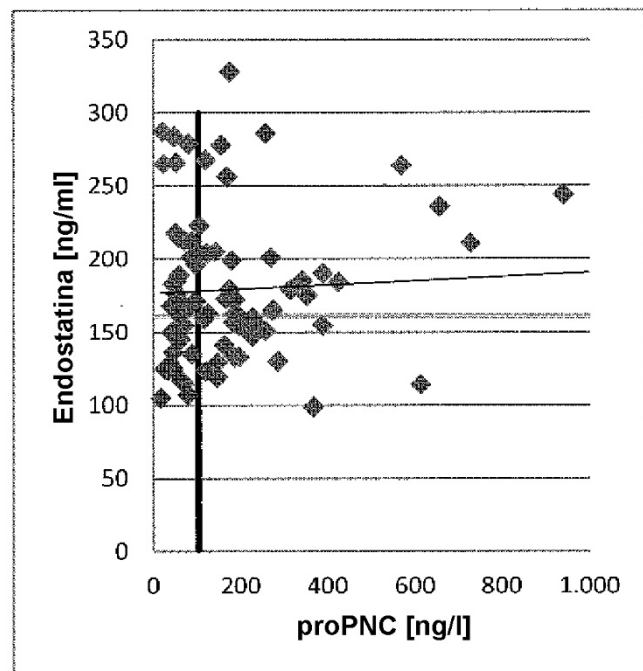
En la presente población de personas de edad avanzada de bajo riesgo, los niveles elevados de FGF-23 y los niveles bajos de vitamina D identifican los individuos con cambios estructurales sutiles y predicen la mortalidad por todas las causas.
20

REIVINDICACIONES

1. La presente invención se refiere a un método para predecir el riesgo de mortalidad en un sujeto que no muestra signos evidentes de insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas de:
5 a) determinar, en una muestra de dicho sujeto, la cantidad de IGFBP7 y
 b) comparar la cantidad según se ha determinado en la etapa a) con una cantidad de referencia, de manera que se predice el riesgo de mortalidad en dicho sujeto.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el sujeto presenta una FEVI (fracción de eyección ventricular izquierda) conservada.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la FEVI es superior a 55% o superior a 60%.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto no presenta una función renal deteriorada.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sujeto presenta una masa normal del ventrículo izquierdo.
20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la determinación de la cantidad de FGF-23 en una muestra del sujeto.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el método comprende la determinación de la cantidad de FGF-23 y en el que el método comprende además la determinación de la cantidad de vitamina D, el cálculo de una proporción entre las cantidades de FGF-23 y de vitamina D, y la comparación de la proporción con una proporción de referencia.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa a) comprende además determinar la cantidad de un péptido natriurético cerebral, en particular PNC o NT-proPNC, y/o la cantidad de una troponina cardíaca, en particular de troponina T o I, en la muestra del sujeto.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sujeto que no muestra signos evidentes de insuficiencia cardíaca sufre de insuficiencia cardíaca clasificado como estadio A o estadio B según la clasificación de ACC/AHA.
35 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el sujeto es sano con respecto a enfermedades y trastornos cardíacos.
- 40 11. Dispositivo adaptado para llevar a cabo el método según las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo dicho dispositivo:
45 a) una unidad analizadora que comprende un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7 y opcionalmente un agente de detección que se une específicamente a troponina cardíaca y/o a agente de detección que se une específicamente a un péptido natriurético cerebral, estando adaptada dicha unidad a la determinación de la cantidad o cantidades de los marcadores en una muestra de un sujeto que no muestra signos evidentes de insuficiencia cardíaca, y
50 b) una unidad analizadora para comparar la cantidad o cantidades determinadas con una o más cantidades de referencia, de manera que se predice el riesgo de mortalidad, comprendiendo dicha unidad una base de datos con una cantidad (o cantidades) de referencia y un algoritmo implementado por ordenador para llevar a cabo la comparación.

Fig 1

A



B

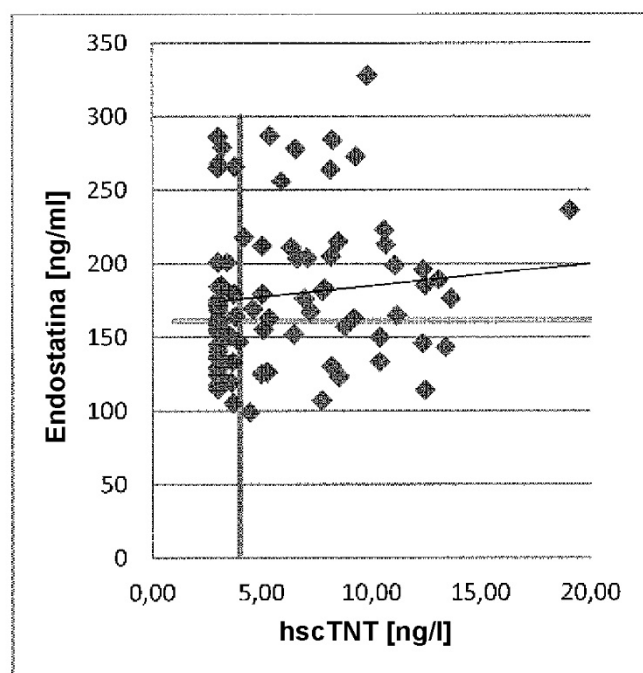
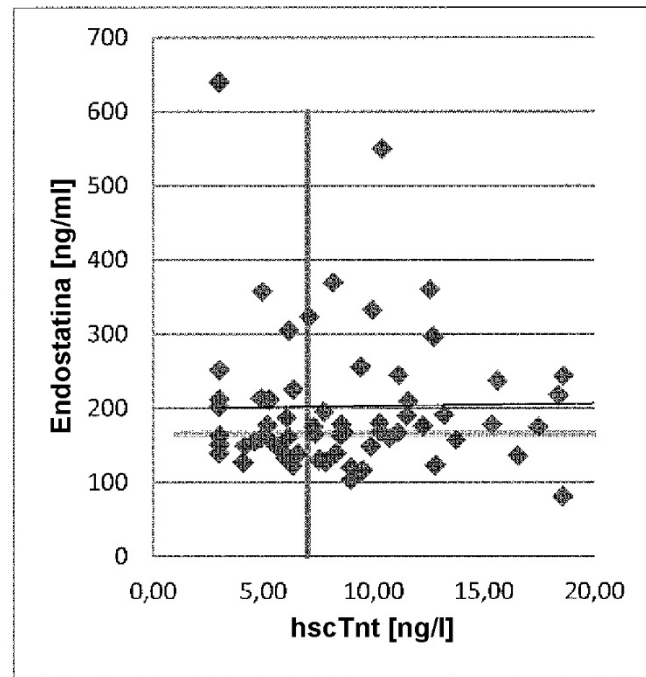


Fig. 2

A



B

