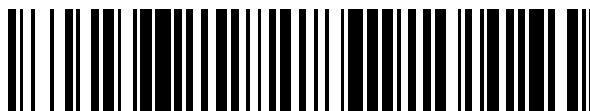


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 098**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2013 PCT/EP2013/066697**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023820**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2013 E 13747847 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2883057**

54 Título: **Diagnóstico de insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

**09.08.2012 EP 12305988**

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

**17.05.2019**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (33.3%) y  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ROUET, PHILIPPE;  
SMIH-ROUET, FATIMA;  
DESMOULIN, FRANCK y  
GALINIER, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 713 098 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

Diagnóstico de insuficiencia cardíaca

### 5 Sector de la técnica

La invención se refiere a a) un método para clasificar insuficiencia cardíaca en un paciente de acuerdo con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA, en el que dicho método comprende las etapas de medir la concentración de IGFBP2 en una muestra de plasma u orina obtenida de dicho paciente, en el que la concentración de IGFBP2 se correlaciona con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA, y b) un método para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca en un paciente que comprende: i. determinar la concentración de IGFBP2 en una muestra de plasma u orina obtenida de dicho paciente; y ii. comparar dicha concentración con un valor de control.

### 15 Estado de la técnica

La prevalencia de insuficiencia cardíaca (IC) está creciendo debido al envejecimiento y los factores de riesgo cardiovascular en la población general [Delahaye, F. et al., 2001]. El diagnóstico de la IC sigue siendo demasiado complicado debido a la presentación atípica y la necesidad de acceso a atención especializada. Para ayudar a los médicos a diagnosticar la insuficiencia cardíaca, se han propuesto biomarcadores sanguíneos de IC, como los péptidos natriuréticos (NP). Sin embargo, los NP tienen limitaciones que sostienen la necesidad de biomarcadores más específicos y más precisos que permitan la realización de cribados de IC a gran escala. Además, el 30 % de los pacientes ingresados en atención de emergencia para la disnea aguda tienen una concentración de péptidos natriuréticos cerebrales (BNP) en una "zona gris" que no permite el diagnóstico. En estos casos, el diagnóstico de IC requerirá exámenes costosos y lentos. Sin embargo, se reconoce que un diagnóstico rápido y la atención médica temprana del paciente tienen un impacto positivo sobre la salud del paciente y también reducen el coste del tratamiento.

El artículo de Hassfeld S. et al 2007 desvela el uso de IGFBP2 como un biomarcador para el pronóstico de pacientes con cardiomiopatía dilatada que representan un subconjunto etiológico de pacientes con IC y no desvela el uso de IGFBP2 para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca.

### Objeto de la invención

Los inventores lanzaron un estudio de casos y controles, monocéntrico, prospectivo e investigaron los polipéptidos urinarios específicos para insuficiencia cardíaca aguda (ICA) o crónica (ICC) con estrategia analítica holística usando la técnica de electroforesis capilar-espectroscopía de masas (CE-MS). Descubrieron que la concentración de IGFBP2 puede usarse como biomarcador de insuficiencia cardíaca, como un biomarcador para clasificar a los pacientes con insuficiencia cardíaca.

Por tanto, la invención se refiere a un método para clasificar insuficiencia cardíaca en un paciente de acuerdo con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA, en el que dicho método comprende las etapas de medir la concentración de IGFBP2 en una muestra de plasma u orina obtenida de dicho paciente, en el que la concentración de IGFBP2 se correlaciona con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA.

### Descripción detallada de la invención:

#### *Método de clasificación y diagnóstico*

La invención se refiere a un método para clasificar a un paciente con riesgo de insuficiencia cardíaca, en el que dicho método comprende medir la concentración de IGFBP2 en una muestra obtenida de dicho paciente.

En una realización particular, dicho método comprende además las etapas de:

(i) medir la concentración de IGFBP2 en una muestra obtenida de dicho paciente,  
 (ii) comparar la concentración de IGFBP2 medida en la etapa (i) con un valor umbral derivado de la concentración de IGFBP2 en muestras de pacientes que están en fases particulares de insuficiencia cardíaca y/o un valor umbral derivado de la concentración de IGFBP2 en muestras de pacientes sanos.

La invención también se refiere a un método para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca en un paciente que comprende las etapas que consisten en i) determinar la concentración de IGFBP2 en una muestra obtenida de dicho paciente; y ii) comparar dicha concentración con un valor de control.

En un ejemplo particular, el paciente tiene condiciones comórbidas significativas, que incluyen hipertensión, cardiopatía coronaria y diabetes, por ejemplo diabetes mellitus.

En otro ejemplo particular, el paciente está recibiendo diuréticos o agentes antiplaquetarios.

En otro ejemplo particular, el paciente tiene más de 50 años. En otra realización particular, el paciente tiene más de 60 años.

5 En una realización, la insuficiencia cardíaca puede ser una insuficiencia cardíaca asintomática, una insuficiencia cardíaca crónica o una insuficiencia cardíaca aguda.

Normalmente, la muestra de acuerdo con la invención puede ser plasma u orina.

10 Como se usa en el presente documento, el término "IGFBP2" para "proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide" indica una proteína que sirve como proteína portadora para el factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF I) o el factor de crecimiento insulinoide 2 (IGF II). Como se usa en el presente documento, el término "IGFBP2" indica también fragmentos de IGFBP2. Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmentos de IGFBP2" indica péptidos más cortos que proceden de hidrólisis química o bioquímica de IGFBP2.

15 Por tanto, en un ejemplo particular, la divulgación se refiere a un método para clasificar a un paciente con riesgo de insuficiencia cardíaca o a un método para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca en un paciente de acuerdo con el paciente, determinando la concentración de fragmentos de IGFBP2.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "insuficiencia cardíaca" indica la incapacidad del corazón para suministrar suficiente flujo sanguíneo para satisfacer las necesidades del cuerpo y esta patología está bien descrita en la práctica de la medicina. Esta expresión abarca insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio, angina inestable, disfunción diastólica, disfunción sistólica y cardiomiopatía diabética.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "insuficiencia cardíaca crónica" indica una situación a largo plazo, habitualmente con sintomatología tratada estable.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "insuficiencia cardíaca aguda" indica insuficiencia cardíaca de aparición repentina, así como insuficiencia cardíaca aguda "exacerbada" o "descompensada", en referencia a episodios en los que un paciente con insuficiencia cardíaca crónica conocida o carente de insuficiencia cardíaca crónica de repente desarrolla empeoramiento de los síntomas y requiere hospitalización. Los síntomas comunes de las complicaciones debidas a insuficiencia cardíaca aguda incluyen, pero sin limitación, disnea debida a congestión pulmonar o choque cardíogeno debido al bajo gasto cardíaco, fatigabilidad fácil (intolerancia al ejercicio), edema periférico, anasarca (edema generalizado pronunciado), nicturia (micción nocturna frecuente), bradicardia, bloqueo cardíaco, hipotensión, mareos, síncope, diabetes, oliguria o anuria, hipopotasemia, broncoespasmo, sudor frío y asma.

35 Un paciente con insuficiencia cardíaca se clasifica de acuerdo con una graduación internacional, concretamente, la clasificación funcional de la New York Heart Association (NYHA). La clasificación funcional de insuficiencia cardíaca generalmente se realiza mediante la clasificación funcional de la New York Heart Association (Criteria Committee, New York Heart Association. Diseases of the heart and blood vessels). Nomenclature and criteria for diagnosis, 6ª ed. Boston: Little, Brown and co, 1964; 114). Esta clasificación clasifica la gravedad de la insuficiencia cardíaca en 4 clases (I-IV).

40 Un paciente con cardiopatía pero que no produce limitación de actividad física se clasifica como una clase I de la NYHA. La actividad física normal no causa fatiga indebida, palpitaciones, disnea o dolor anginoso. Un paciente asintomático se clasifica como una clase I de la NYHA.

45 Un paciente con cardiopatía que produce una ligera limitación de la actividad física se clasifica como una clase II de la NYHA. La actividad física ordinaria produce fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso. Se sienten cómodos en reposo.

50 Un paciente con cardiopatía que produce una marcada limitación de la actividad física se clasifica como una clase III de la NYHA. Una actividad inferior a la ordinaria causa fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso. Se sienten cómodos en reposo.

55 Un paciente con cardiopatía que no puede realizar ninguna actividad física sin molestias se clasifica como una clase IV de la NYHA. Los síntomas de insuficiencia cardíaca o del síndrome anginoso pueden estar presentes incluso en reposo. Si se realiza alguna actividad física, aumentan las molestias.

60 De acuerdo con el método para clasificar a un paciente con riesgo de insuficiencia cardíaca, cuanto más alta concentración de IGFBP2 tenga un paciente, más grave será su insuficiencia cardíaca.

65 Por ejemplo, y de acuerdo con un valor umbral determinado por los inventores, un paciente con una alta concentración de IGFBP2, por ejemplo, más de 1300 ng/ml en plasma, se clasificará como una insuficiencia

cardíaca de clase IV.

El término "detectar" o "determinar", como se ha usado anteriormente, incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control. Normalmente, las concentraciones de IGFBP2 se pueden medir, por ejemplo, mediante técnica de electroforesis capilar-espectroscopía de masas (CE-MS) o ELISA realizado en la muestra.

Preferentemente, la invención se refiere a un método para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca en un paciente que comprende una etapa a) que consiste en medir la concentración de IGFBP2 en una muestra obtenida de dicho paciente. Preferentemente, el método de la invención comprende además una etapa de comparar la concentración de IGFBP2 obtenida en la etapa a) con un nivel umbral.

El "control" puede ser un sujeto sano, es decir, un sujeto que no padece ninguna insuficiencia cardíaca. El control también puede ser un sujeto que padece insuficiencia cardíaca. Preferentemente, dicho control es un sujeto sano.

La detección de la concentración de IGFBP2 en la muestra también se puede realizar midiendo el nivel de proteína IGFBP2. En la presente solicitud, el "nivel de proteína IGFBP2" significa la cantidad o concentración de dicha proteína IGFBP2. En otra realización, el "nivel de IGFBP2" significa el nivel de fragmentos de IGFBP2.

Dichos métodos comprenden poner en contacto una muestra con un socio de unión capaz de interactuar selectivamente con los péptidos de proteína IGFBP2 presentes en la muestra. El socio de unión es, generalmente, un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal.

La presencia de la proteína se puede detectar usando técnicas electroforéticas e inmunodiagnósticas estándar, incluyendo inmunoensayos tales como ensayos de competición, reacción directa o de tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, transferencias de Western; ensayos de aglutinación; inmunoensayos etiquetados y mediados con enzimas, tales como los ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación, técnica de electroforesis capilar-espectroscopía de masas (CE-MS), etc. Las reacciones generalmente incluyen revelar etiquetas tales como etiquetas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, enzimáticas o moléculas colorantes, u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos que reaccionan con el mismo.

Los ensayos mencionados anteriormente generalmente implican la separación de proteínas no unidas en una fase líquida de un soporte de fase sólida al que se unen los complejos antígeno-anticuerpo. Los soportes sólidos que pueden usarse en la puesta en práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o placa de microtitulación); cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilidina; papel diazotizado; membranas de nylon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles, y similares.

Más particularmente, se puede usar un método ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación están recubiertos con un conjunto de anticuerpos contra las proteínas a analizar. Después se añade una muestra que contiene o se sospecha que contiene la proteína marcadora a los pocillos recubiertos. Después de un período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos antígeno-anticuerpo, la placa o placas pueden lavarse para eliminar los restos no unidos y se añade una molécula de unión secundaria etiquetada de manera detectable. La molécula de unión secundaria se deja reaccionar con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, la placa se lava y la presencia de la molécula de unión secundaria se detecta usando métodos bien conocidos en la técnica.

Los métodos pueden comprender una etapa que consiste en comparar la proteína IGFBP2 y la concentración de fragmentos en células en circulación con un valor de control. Como se usa en el presente documento, "concentración de IGFBP2" se refiere a una cantidad o una concentración de un producto de transcripción, por ejemplo, la proteína IGFBP2. Normalmente, un nivel de una proteína puede expresarse como nanogramos por microgramo de tejido o nanogramos por mililitro de un medio de cultivo, por ejemplo. Como alternativa, pueden emplearse unidades relativas para describir una concentración. En un ejemplo particular, "concentración de IGFBP2" puede referirse a fragmentos de IGBP2. Por tanto, los fragmentos de IGFBP2 también pueden medirse.

En una realización, la invención se refiere a un método para clasificar a un paciente con riesgo de insuficiencia cardíaca, en el que dicho método comprende medir la concentración de IGFBP2 en una muestra obtenida de dicho paciente. Como ya se ha explicado, cuanto más alta sea concentración de IGFBP2 que tiene un paciente, más grave será su insuficiencia cardíaca.

Los inventores han establecido valores de umbral que pueden clasificar al paciente con insuficiencia cardíaca.

Cuando la medida de la concentración de IGFBP2 se realiza mediante el método de Elisa en plasma, un paciente con una concentración de IGFBP2 con menos de 600 ng/ml, preferentemente menos de 500 ng/ml, incluso preferentemente menos de 400 ng/ml, más preferentemente menos de 300 ng/ml es indicativo de una insuficiencia

cardíaca de fase I de acuerdo con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA.

5 Cuando la medida de la concentración de IGFBP2 se realiza mediante el método de Elisa en plasma, un paciente con una concentración de IGFBP2 comprendida entre aproximadamente 600 ng/ml y aproximadamente 1100 ng/ml, preferentemente entre aproximadamente 800 ng/ml y aproximadamente 1050 ng/ml, preferentemente entre aproximadamente 900 ng/ml y aproximadamente 1000 ng/ml, de la forma más preferente entre aproximadamente 925 ng/ml y aproximadamente 975 ng/ml es indicativo de una insuficiencia cardíaca de fase II de acuerdo con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA.

10 Cuando la medida de la concentración de IGFBP2 se realiza mediante el método de Elisa en plasma, un paciente con una concentración de IGFBP2 comprendida entre aproximadamente 1100 ng/ml y aproximadamente 1300 ng/ml, preferentemente entre aproximadamente 1150 ng/ml y aproximadamente 1250 ng/ml, de la forma más preferente entre aproximadamente 1175 ng/ml y aproximadamente 1225 ng/ml es indicativo de una insuficiencia cardíaca de fase III de acuerdo con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA.

15 Cuando la medida de la concentración de IGFBP2 se realiza mediante el método de Elisa, se realiza mediante técnica de electroforesis capilar-espectroscopía de masas (CE-MS) en plasma, un paciente con una concentración de IGFBP2 de más de 1300 ng/ml, preferentemente más de 1350 ng/ml, incluso preferentemente más de 1400 ng/ml, de la forma más preferente más de 1450 ng/ml es indicativo de una insuficiencia cardíaca de fase IV de acuerdo con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA.

20 En otra realización, la invención se refiere a un método para diagnosticar insuficiencia cardíaca en un paciente que comprende determinar la concentración de IGFBP2 en una muestra obtenida de dicho paciente y comparar dicha concentración con un valor umbral.

25 Cuando la medida de la proteína IGFBP2 se realiza mediante el método Elisa, el nivel de IGFBP2 en un paciente que padece insuficiencia cardíaca aumenta en al menos un 50 %, preferentemente en al menos un 70 %, preferentemente en al menos un 100 %; preferentemente en al menos un 150 %, preferentemente en al menos un 200 %, preferentemente en al menos un 250 %, más preferentemente en al menos un 300 %, incluso más al menos un 400 % en comparación con una referencia de control. En otras palabras, preferentemente, cuando la proteína IGFBP2 se mide mediante el método Elisa, la cantidad de proteína IGFBP2 en un paciente que padece insuficiencia cardíaca aumenta en al menos un 50 %, preferentemente en al menos un 70 %, preferentemente en al menos un 100 %; preferentemente en al menos un 150 %, preferentemente en al menos un 200 %, preferentemente en al menos un 250 %, más preferentemente en al menos un 300 %, incluso más al menos un 400 % en comparación con una referencia de control.

30 La concentración de IGFBP2 en plasma se ha medido mediante la técnica de Elisa. Los inventores han establecido un valor umbral para la concentración de IGFBP2 para diagnosticar fácilmente insuficiencia cardíaca. Preferentemente, este valor umbral es más de 150 ng/ml, preferentemente más de 200 ng/ml, incluso lo más preferible más de 250 ng/ml, de la forma más preferente dicho valor umbral es más de 300 ng/ml.

35 La concentración de IGFBP2 en orina se ha medido mediante la técnica de Elisa en orina. Los inventores han establecido un valor umbral para la concentración de IGFBP2 para diagnosticar fácilmente insuficiencia cardíaca. Preferentemente, este valor umbral es más de 2,5 ng/ml, de la forma más preferente dicho valor umbral es más de 3 ng/ml.

40 Normalmente, un "valor umbral", "nivel umbral" o "valor de corte" se puede determinar experimentalmente, empíricamente o teóricamente. Un valor umbral también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como lo reconocería un experto en la materia. Preferentemente, el experto en la materia puede comparar la concentración de IGFBP2 obtenida de acuerdo con el método de la invención con un valor umbral definido.

45 Preferentemente, dicho valor umbral es la concentración media de IGFBP2 de una población de individuos sanos. Como se usa en el presente documento, la expresión "individuo sano" indica un ser humano que se sabe que está sano, es decir, que no padece insuficiencia cardíaca, nunca ha estado sujeto a dicha insuficiencia cardíaca crónica y no necesita atención médica.

50 Preferentemente, dicho valor umbral es la concentración media de IGFBP2 de una población de individuos enfermos. Como se usa en el presente documento, la expresión "individuo enfermo" indica un ser humano que se sabe que está enfermo, es decir, que padece una insuficiencia cardíaca en cualquier fase de la insuficiencia cardíaca de acuerdo con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA.

55 Normalmente, el experto en la materia puede determinar la concentración de IGFBP2 en una muestra biológica, preferentemente plasma u orina, de 100 individuos que se sabe están sanos o enfermos. El valor medio de las concentraciones obtenidas se determina a continuación, de acuerdo con un análisis estadístico bien conocido, para obtener la concentración media de IGFBP2. Dicho valor se considera, entonces, normal y, por tanto, constituye un

valor umbral. Comparando las concentraciones de IGFBP2 con este valor umbral, el médico puede diagnosticar entonces insuficiencia cardíaca o clasificar a los pacientes. De hecho, comparando las concentraciones de IGFBP2 obtenidas en una muestra biológica, preferentemente plasma u orina, de un sujeto dado con un valor umbral, se puede determinar fácilmente si dicho sujeto padece o no insuficiencia cardíaca o se puede determinar fácilmente la fase de la insuficiencia cardíaca de acuerdo con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA.

Por consiguiente, el médico sería capaz de adaptar y optimizar la atención médica apropiada de un sujeto en un estado crítico y potencialmente mortal que padece insuficiencia cardíaca. La determinación de dicho pronóstico es altamente apropiada para la atención de seguimiento y la toma de decisiones clínicas.

Por lo tanto, la invención se basa en un método para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca en un paciente o para clasificar a un paciente con riesgo de insuficiencia cardíaca, que comprende las siguientes etapas:

- a) determinar la concentración de IGFBP2 en una muestra obtenida de dicho paciente;
- b) determinar la concentración media de IGFBP2 en una muestra biológica de una población de individuos sanos o enfermos, preferentemente 100 individuos sanos; y
- c) una etapa de comparar la concentración de IGFBP2 obtenida de a) con la concentración media de IGFBP2 obtenida en b).

En un ejemplo adicional, los métodos de la invención comprenden medir la concentración de al menos un biomarcador adicional.

El término "biomarcador", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una molécula, cuya expresión en una muestra de un paciente puede detectarse mediante métodos estándar en la técnica (así como los desvelados en el presente documento), y es predictivo o indica un estado del sujeto del que se obtuvo.

Por ejemplo, el otro biomarcador puede seleccionarse del grupo de biomarcadores de insuficiencia cardíaca que consiste en péptido natriurético cerebral (BNP), pro-péptido natriurético cerebral amino-terminal (NT-pro BNP), norepinefrina, troponina, proteína de unión a ácidos grasos de tipo cardíaco, cadena ligera-1 de miosina, metaloproteínasa de matriz, inhibidor tisular de metaloproteínasa de matriz, proteína C reactiva (CRP), TNFalfa, receptor 1 del factor de necrosis tumoral soluble (sTNFR1), receptor TNFR2 soluble, receptor de IL-2 soluble, CD40-CD154, CCAM-I, P-selectina, factor tisular y factor de von Willebrand, urocortina, mieloperoxidasa y ácido úrico.

En un ejemplo preferido, el biomarcador adicional de insuficiencia cardíaca es BNP o NT-pro BNP.

Otro objeto más se refiere a un kit para realizar un método de la invención, comprendiendo dicho kit medios para medir la concentración de IGFBP2 en una muestra obtenida de un paciente. El kit puede incluir un anticuerpo, o un conjunto de anticuerpos como se ha descrito anteriormente. En un ejemplo particular, el anticuerpo o el conjunto de anticuerpos se etiquetan como se ha descrito anteriormente. El kit también puede contener otros reactivos y materiales adecuadamente envasados necesarios para el protocolo de detección particular, incluyendo matrices de fase sólida, si es aplicable, y estándares. El kit también puede contener uno o más medios para la detección de un biomarcador adicional. Normalmente, el kit también puede contener medios para la detección de uno o más biomarcadores de insuficiencia cardíaca seleccionados del grupo que consiste en péptido natriurético cerebral (BNP), pro-péptido natriurético cerebral amino-terminal (NT-pro BNP), norepinefrina, troponina, proteína de unión a ácidos grasos de tipo cardíaco, cadena ligera-1 de miosina, metaloproteínasa de matriz, inhibidor tisular de metaloproteínasa de matriz, proteína C reactiva (CRP), TNFalfa, receptor 1 del factor de necrosis tumoral soluble (sTNFR1), receptor TNFR2 soluble, receptor de IL-2 soluble, CD40-CD154, CCAM-I, P-selectina, factor tisular y factor de von Willebrand, urocortina, mieloperoxidasa y ácido úrico.

En un ejemplo, el kit comprende medios para medir la concentración de IGFBP2 y medios para medir la concentración de BNP o NT-pro BNP.

Un objeto adicional de la invención se refiere al uso de IGFBP2 como biomarcador para insuficiencia cardíaca.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

### Descripción de las figuras

**Figura 1:** análisis de la curva ROC de los niveles de IGFBP2 de pacientes con ICC e ICA (n=80) frente a sujetos de control (n=50).

**Figura 2:** concentración plasmática de IGFBP2 (ng/ml) en pacientes de control; con insuficiencia cardíaca crónica (ICC) y con insuficiencia cardíaca aguda (ICA). Se realizó una comparación múltiple con Anova y prueba post hoc de Bonferroni (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

**Figura 3:** concentración en orina de IGFBP2 (ng/ml). Control, n=21; Insuficiencia cardíaca crónica (ICC), n=19. Las comparaciones se realizaron usando la prueba de la t de Student donde \* es para p<0,001.

5 **Figura 4:** concentración plasmática de IGFBP2 de acuerdo con la clasificación de la NYHA de la fase de insuficiencia cardíaca. La comparación múltiple se realizó con Anova y prueba post hoc de Bonferroni (\* p<0,01).

**Figura 5:** diagrama de dispersión de IGFBP2 frente a la concentración de BNP en plasma. La línea de regresión estimada se traza incluyendo su intervalo de confianza al 95 % (líneas discontinuas).

10 **Figura 6:** la concentración plasmática de IGFBP2 y las fracciones de expulsión del ventrículo izquierdo están correlacionadas. La concentración plasmática de IGFBP2 se midió mediante ELISA y la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (FEVI) mediante ecocardiografía transtorácica.

15 **Figura 7:** niveles de IGFBP2 y BNP en plasma del conjunto de descubrimiento-ensayo. Las mediciones de los biomarcadores se realizaron con plasma de pacientes de control con factores de riesgo cardiovascular (FRC) o con insuficiencia cardíaca (IC) (aguda y crónica, véase la figura 1). \* Diferencia significativa; p <0,05.

20 **Figura 8:** niveles de IGFBP2 y BNP en plasma del conjunto de validación.  
(A) Los niveles de IGFBP2 y BNP se evaluaron en pacientes con factor de riesgo cardiovascular (FRC), disnea no cardíaca (DNC), insuficiencia cardíaca crónica (ICC) y pacientes con insuficiencia cardíaca aguda (ICA). \* Diferencia significativa; p<0,05. La línea discontinua horizontal corresponde al punto de corte óptimo a 556 ng/ml.

25 **Figura 9:** niveles de IGFBP2 y BNP en plasma de pacientes con DNC e ICA del conjunto de validación. El análisis de la curva ROC para pacientes con DNC (n=17) frente a ICA (n=24) con un BNP comprenden entre 100 y 600 pg/ml. Las AUC fueron 0,838 (IC 95 %: 0,690 - 0,934) para IGFBP2 significativamente diferentes de AUC=0,5 p<0,0001 y 0,653 (IC 95 %: 0,895-0,969) no significativamente diferentes de AUC=0,5 p=0,109 para BNP. \* La comparación por pares de la curva ROC fue significativa entre BNP e IGFBP2 con p=0,034.

30 **Figura 10:** análisis de un modelo en rata para insuficiencia cardíaca isquémica.  
(A) Análisis ecocardiográfico. (B) Análisis por qPCR de los niveles de ARNm de IGFBP2 en corazones e hígados de rata. N=5 por grupo. \* p<0,05. Las ratas se sometieron a cirugía el día 14 y los tejidos para el análisis de ARNm se recogieron el día 70.

35 **Tabla 1:** características demográficas y clínicas del conjunto de descubrimiento-ensayo. Este conjunto estaba constituido por 28 pacientes con factores de riesgo cardiovascular (FRC) como "controles" que se compararon con 12 pacientes con insuficiencia cardíaca aguda (ICA) y 9 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (ICC) como "casos". FEVI: fracción de expulsión del ventrículo izquierdo.

	FRC	IC	
	(n= 28)	(n=21)	P
Edad, años	53 ± 12	70 ± 15	<0,001
Sexo, femenino, % (F/M)	36 (10/18)	52 (11/10)	0,262
IMC	28,0 ± 4,6	25,2 ± 5,8	0,076
<b>Factores de riesgo cardiovascular</b>			
Hipertenso, % (n)	50 (14)	52 (11)	1,000
Diabetes T2, % (n)	14 (5)	38 (8)	0,190
Dislipedemia, % (n)	79 (22)	62 (13)	0,222
Obesidad, % (n)	28 (8)	24 (5)	0,528
Tabaquismo, % (n)	14 (1)	19 (4)	0,150
<b>Antecedentes cardiovasculares</b>			
Arteriopatía coronaria, % (n)	0 (0)	43 (9)	< 0,001
CMH hipertensiva, % (n)	0 (0)	14 (3)	0,072
CMH hereditaria, % (n)	0 (0)	5 (1)	0,428
Cardiopatía valvular, % (n)	0 (0)	9 (2)	0,178
Cardiomiopatía dilatada, % (n)	0 (0)	20 (4)	0,028
Cardiomiopatía tóxica, % (n)	0 (0)	20 (4)	0,028

	FRC	IC	
	(n= 28)	(n=21)	P
<b>Medicamento</b>			
Inhibidor de ACE, % (n)	4 (1)	38 (8)	0,003
ARAI, % (n)	14 (4)	20 (4)	0,710
Betabloqueante, % (n)	7 (2)	52 (11)	< 0,001
Diurético, %(n)	4 (1)	90 (19)	< 0,001
Antagonista de la vitamina K, % (n)	0 (0)	28 (6)	0,003
Agente antiplaquetario, % (n)	10 (3)	67 (14)	< 0,001
Estatina, % (n)	32 (9)	52 (11)	0,147
<b>Análítica al ingresar</b>			
BNP, pmol/ml	30 [21-57]	595 [333-1063]	< 0,001
Aclaramiento de creatinina, ml/min	102 [87-122]	56 [45-60]	< 0,001
Proteína C reactiva, mg/l	1,9 [1,4-2,3]	31,0 [12,9-63,3]	< 0,001
Na <sup>+</sup> , mM	140 ± 1	135 ± 6	< 0,001
ALT, U/ml	30 [26-40]	40 [23-66]	0,281
<b>Signos vitales al ingresar</b>			
Tensión arterial media, mmHg	101 ± 11	83 ± 20	<0,001
Frecuencia cardíaca, lpm	70 [68-75]	85 [81-104]	<0,001
<b>Ecocardiografía</b>			
FEVI, %	70 ± 9	31 ± 12	<0,001
FEVI < 40%, % (n)	0 (0)	81 (17)	<0,001

**Tabla 2:** polipéptidos representados de forma diferencial determinados mediante CE-MS.

Polipéptido	Wilcox-valor p no ajust.	Bonferroni ajust.	BH ajust.	AUC
x64054	6,40e-09	1,39e-05	1,39e-05	0,988
x53078	6,05e-08	1,32e-04	4,39e-05	0,947
x102021	1,19e-07	2,58e-04	5,17e-05	0,945
x69979	2,62e-07	5,69e-04	6,44e-05	0,934
x52446	3,35e-07	7,28e-04	6,44e-05	0,929
x13188	1,54e-08	3,35e-05	1,67e-05	0,929
x3806	4,15e-07	9,02e-04	6,44e-05	0,925
x140665	3,62e-07	7,86e-04	6,44e-05	0,925
x91463	1,15e-07	2,49e-04	5,17e-05	0,923

Las áreas bajo la curva (AUC) están indicadas para los 9 polipéptidos que son mejores predictores de IC. Los valores de "p" no ajustados y después del ajuste de Bonferroni o Benjamini Hochberg (BH).

**Tabla 3:** características demográficas y clínicas del conjunto de validación, se reclutaron pacientes con factores de riesgo cardiovascular (FRC); disnea no cardíaca (DNC), insuficiencia cardíaca crónica (ICC) e insuficiencia cardíaca aguda (ICA). FEVI: fracción de expulsión del ventrículo izquierdo.

	FRC	DNC		ICC		ICA	
	(n=39)	(n=43)	P	(n=58)	P	(n= 39)	P
Edad, años	57 ± 11	66 ± 16	<b>0,022</b>	62 ± 13	<b>0,022</b>	73 ± 15	<b>&lt;0,001</b>
Sexo, femenino, % (F/M)	41 (16/23)	54 (23/20)	0,364	32 (19/40)	0,498	54 (21/18)	0,364



ES 2 713 098 T3

	FRC	DNC		ICC		ICA	
	(n=39)	(n=43)	P	(n=58)	P	(n= 39)	P
IMC	26,8 ± 4,3	25,0 ± 6,0	0,181	25,6 ± 4,2	0,173	27,4 ± 4,3	0,688
<b>Factores de riesgo cardiovascular</b>							
Hipertenso, % (n)	31 (12)	49 (21)	0,150	38 (22)	0,612	81 (31)	<b>&lt;0,001</b>
Diabetes T2, % (n)	15 (6)	21 (9)	0,717	30 (17)	0,181	24 (9)	0,567
Dislipedemia, % (n)	80 (32)	33 (14)	<b>&lt;0,001</b>	59 (34)	<b>0,027</b>	55 (21)	<b>0,015</b>
Obesidad, % (n)	31(12)	14 (6)	0,116	14 (8)	0,077	20 (8)	0,437
Tabaquismo, % (n)	10 (4)	30 (13)	<b>0,050</b>	14 (8)	0,838	10 (4)	0,709
<b>Antecedentes cardiovasculares</b>							
Arteriopatía coronaria, % (n)	5 (2)	14 (6)	0,331	51 (30)	<b>&lt;0,001</b>	52 (20)	<0,001
CMH hipertensiva, %(n)	0 (0)	9 (4)	0,150	8 (5)	0,157	13 (5)	<b>0,044</b>
CMH hereditaria, % (n)	0 (0)	0 (0)	0,740	8 (5)	0,157	0 (0)	0,740
Cardiopatía valvular, % (n)	0 (0)	9 (4)	0,150	20 (12)	<b>0,007</b>	16 (6)	<b>0,033</b>
Cardiomiopatía dilatada, % (n)	0 (0)	0 (0)	0,740	24 (14)	<b>&lt;0,001</b>	8 (3)	0,239
Cardiomiopatía tóxica, % (n)	0 (0)	0 (0)	0,740	8 (5)	0,157	8 (3)	0,239
<b>Medicamento</b>							
Inhibidor de ACE, % (n)	10 (4)	21 (9)	0,308	64 (37)	<b>&lt;0,001</b>	37 (14)	<b>0,016</b>
ARAI, % (n)	13 (5)	19 (8)	0,679	10 (6)	0,960	21 (8)	0,543
Betabloqueante, % (n)	18 (7)	23 (10)	0,749	73 (42)	<b>&lt;0,001</b>	55 (21)	<b>0,002</b>
Diurético, % (n)	10 (4)	56 (24)	<b>&lt;0,001</b>	74 (43)	<b>&lt;0,001</b>	89 (35)	<b>&lt;0,001</b>
Antagonista de la vitamina K, % (n)	0 (0)	30 (13)	<b>&lt;0,001</b>	46 (27)	<b>&lt;0,001</b>	29 (11)	<b>0,001</b>
Agente antiplaquetario, %(n)	10 (4)	23 (10)	0,205	55 (32)	<b>&lt;0,001</b>	60 (23)	<b>&lt;0,001</b>
Estatina, % (n)	38 (15)	21 (9)	0,134	60 (35)	0,056	37 (14)	1,000
<b>Analítica al ingresar</b>							
BNP, pmol/ml	25 [21-48]	95 [61-169]	<b>&lt;0,001</b>	423 [303-636]	<b>&lt;0,001</b>	686 [370-1207]	<b>&lt;0,001</b>
Aclaramiento de creatinina, ml/min	86 [83-96]	73 [58-87]	<b>0,013</b>	58 [51-72]	<b>&lt;0,001</b>	42 [31-53]	<b>&lt;0,001</b>
Proteína C reactiva, mg/l	1,9 [1,2-2,7] (39)	9,6 [4,6-23,5]	<b>&lt;0,001</b>	8,6 [6,3-13,0]	<b>&lt;0,001</b>	26,0 [19,7-47,3]	<b>&lt;0,001</b>
Na <sup>+</sup> , mM	140 ± 2	138 ± 4,3	<b>0,005</b>	138 ± 3	<b>&lt;0,001</b>	137 ± 6	<b>&lt;0,001</b>
ALT, U/ml	31 [26-38]	23 [19-28]	<b>0,006</b>	30 [25-38]	0,982	38 [24-51]	0,471
<b>Signos vitales al ingresar</b>							
Tensión arterial media, mmHg	98 ± 11	94 ± 14	<b>0,120</b>	85 ± 12	<b>&lt;0,001</b>	89 ± 24	<b>0,037</b>

	FRC	DNC		ICC		ICA	
	(n=39)	(n=43)	P	(n=58)	P	(n= 39)	P
Frecuencia cardíaca, lpm	65 [60-67]	88 [81-95]	<b>0,006</b>	76 [70-84]	<b>&lt;0,001</b>	91 [84-99]	<b>&lt;0,001</b>
<b>Ecocardiografía</b>							
FEVI, %	70 ± 10	64 ± 12	<b>0,010</b>	36 ± 13	<b>&lt;0,001</b>	42 ± 19	<b>&lt;0,001</b>
FEVI < 40%, % (n)	0 (0)	0 (0)	0,740	60 (35)	<b>&lt;0,001</b>	50 (23)	<b>&lt;0,001</b>

**Tabla 4:** correlaciones de los niveles de IGFBP2 y BNP con las características clínicas. Rho: coeficiente de correlación por rangos de Spearman, n=228. Rho >0,5 relación moderada a alta están en negrita.

	IGFBP2			BNP		
	rho	p	n	rho	p	n
Edad, años (n)	0,397	<0,0001	179	0,331	<0,0001	177
Sexo, femenino, % (F/M)	0,006	0,9358	180	0,053	0,4832	178
IMC (n)	-0,288	0,0002	166	-0,209	0,0071	165
<b>Factores de riesgo cardiovascular</b>						
Hipertenso, % (n)	0,130	0,0839	179	0,081	0,2834	178
Diabetes, % (n)	0,180	0,0161	179	0,090	0,2335	178
Dislipedemia, % (n)	-0,228	0,0021	179	-0,250	0,0007	178
Obesidad, % (n)	-0,243	0,0010	180	-0,158	0,0357	178
Tabaquismo, % (n)	0,011	0,8834	180	0,047	0,5370	178
<b>Antecedentes cardiovasculares</b>						
Arteriopatía coronaria, % (n)	0,381	<0,0001	179	0,371	<0,0001	178
CMH hipertensiva, %(n)	0,156	0,0368	179	0,067	0,3740	178
CMH hereditaria, % (n)	0,141	0,0595	179	0,204	0,0063	178
Cardiopatía valvular, % (n)	0,302	<0,0001	179	0,281	0,0001	178
Cardiomiopatía dilatada, % (n)	0,182	0,0147	179	0,211	0,0046	178
Cardiomiopatía tóxica, % (n)	0,205	0,0060	179	0,184	0,0140	178
<b>Medicamento</b>						
Inhibidor de ACE, % (n)	0,256	0,0005	179	0,245	0,0010	178
ARAI, % (n)	-0,044	0,5616	179	-0,022	0,7736	178
Betabloqueante, % (n)	0,325	<0,0001	179	0,364	<0,0001	178
Diurético, % (n)	<b>0,704</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>179</b>	<b>0,674</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>178</b>
Antagonista de la vitamina K, %(n)	0,268	0,0003	179	0,311	<0,0001	178
Agente antiplaquetario, %(n)	0,380	<0,0001	179	0,311	<0,0001	178
Estatina, % (n)	0,074	0,3232	179	0,061	0,4155	178
<b>Analítica al ingresar</b>						
BNP, pmol/ml (n)	<b>0,773</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>178</b>			
Aclaramiento de creatinina, µmol/l (n)	<b>-0,681</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>178</b>	<b>-0,587</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>177</b>
Proteína C reactiva, mg/l (n)	<b>0,615</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>179</b>	<b>0,614</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>177</b>
Na <sup>+</sup> , mM (N)	-0,331	<0,0001	179	-0,409	<0,0001	178
ALT, U/ml (N)	0,075	0,3245	174	0,115	0,1316	173
Tensión arterial media, mmHg (n)						
Frecuencia cardíaca, lpm (n)	-0,419	<0,0001	169	-0,397	<0,0001	168

	IGFBP2			BNP		
	rho	p	n	rho	p	n
<b>Ecocardiografía</b>	0,410	<0,0001	172	0,452	<0,0001	171
FEVI, % (n)	<b>-0,653</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>178</b>	<b>-0,669</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>176</b>

**Tabla 5:** características demográficas y clínicas de una cohorte de validación externa. FEVI: fracción de expulsión del ventrículo izquierdo.

	EPOC (n= 10)	ICA (n= 30)	P
Edad, años	57 ± 10	73 ± 10	<0,001
Género, femenino, % (F/M)	30 (3/7)	23 (7/23)	0,689
<b>Factores de riesgo cardiovascular</b>			
Hipertenso, % (n)	30 (3)	63 (19)	0,140
Diabetes T2, % (n)	40 (4)	43 (13)	1,000
Dislipedemia, % (n)	30 (3)	47 (14)	0,470
Obesidad, % (n)	10 (1)	6 (2)	1,000
<b>Antecedentes cardiovasculares</b>			
Arteriopatía coronaria, % (n)	10 (1)	43 (13)	0,069
Cardiopatía valvular, % (n)	0 (0)	30 (9)	0,080
<b>Presentación clínica</b>			
Insuficiencia cardíaca aguda	—	30 (9)	—
Insuficiencia cardíaca descompensada de forma aguda, %(n)	—	60 (18)	—
Edema pulmonar, % (n)	—	10(3)	—
<b>Medicamento</b>			
Inhibidor de ACE o ARAII, % (n)	30 (3)	63 (19)	0,140
Betabloqueante, % (n)	0 (0)	57 (17)	0,010
Diurético, % (n)	40 (4)	80 (24)	0,041
Antagonista de la vitamina K, % (n)	10 (1)	47 (14)	0,059
Agente antiplaquetario, % (n)	30 (3)	60 (18)	0,148
Estatina, % (n)	20 (2)	57 (17)	0,691
<b>Analítica al ingresar</b>			
BNP, pmol/ml	14 [10-19]	1782 [1340-2773]	<0,001
Creatinina, µmol/l	80 [65-100]	120 [98-142]	0,015
Proteína C reactiva, mg/l	4,0 [0,0-14,5]	10 [0,7-19,5]	0,209
Na <sup>+</sup> , mM	139 ± 3	136 ± 7	<0,043
<b>Signos vitales al ingresar</b>			
Tensión arterial media, mmHg	98 ± 13	93 ± 17	0,443
Frecuencia cardíaca, lpm	104 ± 28	88 ± 26	0,107
<b>Ecocardiografía</b>			
FEVI, %	—	35 [20-60]	—

**Ejemplos****EJEMPLO 1: análisis del primer paciente**5 **Materiales y métodos****Pacientes:**1. Población:

10 Se realizó un estudio transversal monocéntrico con la inclusión de más de 200 pacientes entre noviembre de 2010 y marzo de 2011 del Hospital Universitario de Toulouse Rangueil. Se constituyeron tres grupos de pacientes: insuficiencia cardíaca crónica (ICC), insuficiencia cardíaca aguda (ICA) y control. Todos los pacientes han firmado un acuerdo de consentimiento y la recogida de muestras biológicas fue aprobada por el ministerio de salud francés, CCTIR, CNIL y el comité de ética (CPP). Se excluyeron los pacientes menores de 18 años que no pudieron entender o firmar el acuerdo, así como pacientes con insuficiencia renal o trasplantados.

*a. Pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (ICC):*

20 Se incluyeron pacientes con una ICC estable conocida (>3 meses sin ninguna descompensación) que varía de fase I a IV según la NYHA con diversas etiologías (cardiopatía isquémica (CMI), valvular (CMV), posthipertensiva (CMH post-HTA), cardiomiopatía genética hipertrófica (Gen CMH), cardiomiopatía dilatada primaria o tóxica (CMD)), displasia arritmógena del ventrículo derecho, cardiomiopatía arritmógena y congénita. La inclusión requirió un diagnóstico claro de insuficiencia cardíaca (clínica, antecedentes de la enfermedad, ecocardiografía transtorácica (ETT) y/o BNP). Estos pacientes fueron ingresados en varios servicios de cardiología (hospitalización, consulta de las unidades Pr Galinier y Pr Carrié) después de su ingreso por insuficiencia cardíaca.

*b. Insuficiencia cardíaca aguda (ICA):*

30 Se incluyeron pacientes ingresados por descompensación cardíaca aguda, independientemente del tipo (izquierda, derecha, mixta, bajo gasto, choque cardiogénico) para poder identificar supuestos biomarcadores de ICC e ICA.

*c. Control:*

35 Los pacientes de control se incluyeron a través del departamento de prevención de arteroesclerosis del Hospital Universitario Rangueil durante la hospitalización de día.

2. Datos clínicos:

40 Para todos los pacientes, se recopilaron datos antropométricos (peso, altura, género), antecedentes clínicos, datos electrocardiográficos y biológicos (sodio plasmático, creatinina, estado hepático, protrombina, CRP, hematocrito y hemoglobina). Se recopilaron datos de niveles de BNP para pacientes con ICC e ICA. Todos estos exámenes fueron solicitados durante el tratamiento por el médico a cargo de los pacientes y se realizaron para monitorizar la fase de insuficiencia cardíaca pero también la función renal y hepática, la hidratación y el nivel inflamatorio. Todos los medicamentos fueron registrados.

3. Ecocardiografía:

50 La ecocardiografía transtorácica (ETT) se realizó para todos los sujetos incluidos por un solo cardiólogo en una máquina dedicada (Kontron), lo que permitió la recopilación de datos durante el procedimiento y el posprocesamiento de los datos usando el software My Lab Desk - Kontron para cada paciente.

55 La ETT permitió la medición sistemática de volúmenes y diámetros, la función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo. Además, se analizó la función del ventrículo derecho así como valvulopatías aórtica, mitral o tricúspide. La ETT se consideró como el "modelo de referencia" para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca que se completó con su etiología de acuerdo con las recomendaciones europeas y estadounidenses actuales.

**Muestras biológicas:**

60 Se recogió orina en tubos estándar de polipropileno y se congeló inmediatamente y se mantuvo a -80 °C. Se recogió plasma en tubos de EDTA, se centrifugó, se dividió en alícuotas en hielo y se congeló inmediatamente a -80 °C.

**Métodos analíticos:**

65 La CE-MS se realizó usando el procedimiento estándar [Mischak, H. et al., 2010]. En resumen, los péptidos se separaron electroforéticamente en un capilar de silicio de 90 cm de largo y 50 µm de diámetro (Beckmann-Coulter,

Fullerton, CA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas ESI-TOF (ionización por electropulverización - tiempo de vuelo) (MicroTOF, Bruker-Daltonic, Bremen, Alemania). El tampón de CE-MS era acetonitrilo al 20 % (v/v) y ácido fórmico 250 mM en agua de HPLC. La separación electroforética se realiza durante 60 minutos bajo un campo eléctrico (+35 a -40 kV), lo que lleva a una intensidad de 13  $\mu$ A. La temperatura del capilar se mantiene a +35 °C durante los desplazamientos.

Enzimoimmunoensayo de adsorción (ELISA) La cuantificación de IGFBP2 se realizó utilizando reactivos R&D SYSTEMS EUROPE LTD de acuerdo con el protocolo de reactivos ELISA del fabricante.

## Resultados

En primer lugar se cribó el proteoma urinario de 50 pacientes (9 con ICC, 13 con ICA, 28 controles sanos emparejados por edad, sexo y factor de riesgo), lo que llevó a revelar un panel de polipéptidos específicos para IC. Un polipéptido (x64054, masa 1878,792 Da; tiempo de electroforesis capilar  $t = 20,72$  minutos) pareció muy relevante porque podría discriminar ICA e ICC con una alta especificidad y sensibilidad basándose en los datos de CE-MS (AUC = 0,99;  $p < 0,0001$ ). Usando el análisis MALDI-TOF, se identificó este supuesto biomarcador como un fragmento de la proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP2).

La validación de IGFBP2 como un supuesto biomarcador se realizó mediante ELISA usando mediciones de concentración de plasma y de orina en 200 pacientes. El análisis de la curva ROC proporcionó un valor de AUC de 0,988,  $p < 0,0001$  (figura 1). Claramente, la concentración plasmática (figura 2) y urinaria (figura 3) de IGFBP2 está fuertemente incrementada en los pacientes con ICC e ICA. Además, la elevación de la concentración de IGFBP2 en plasma dependía de la gravedad de la insuficiencia cardíaca, como lo indica la clasificación de la NYHA (figura 4). Además, se notó que los niveles de IGFBP2 y BNP estaban débilmente correlacionados, lo que daba más importancia a este nuevo biomarcador como un indicador casi independiente (figura 5). Finalmente, se observó que el nivel plasmático de IGFBP2 y la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo se correlacionaron negativamente, lo que indica un vínculo fisiológico entre el nivel de IGFBP2 en el torrente sanguíneo y la función cardíaca y convierte los niveles de IGFBP2 en una posible estimación del estado de la bomba cardíaca (figura 6). Por lo tanto, se propone que la concentración elevada de IGFBP2 podría usarse como un biomarcador de insuficiencia cardíaca.

## EJEMPLO 2: análisis del segundo paciente

### Materiales y métodos

#### Inclusiones de pacientes

Se usaron dos cohortes independientes en este estudio. Una cohorte de descubrimiento-validación con 228 pacientes que fueron reclutados entre noviembre de 2010 y noviembre de 2011 en el Hospital Universitario de Rangueil (Toulouse, Francia) y una cohorte de validación externa con 40 pacientes que fueron reclutados entre 2009 y 2011 en el Hospital Universitario de Lariboisière (París, Francia).

Para centrarse en biomarcadores específicos de insuficiencia cardíaca sin perjuicio de a la etiología o la gravedad de la insuficiencia cardíaca, el grupo de casos de la cohorte de descubrimiento-validación estaba constituido por pacientes que padecían insuficiencia cardíaca crónica (ICC) o aguda (ICA). Los pacientes con ICC tenían una IC estable conocida con  $> 3$  meses sin ningún episodio de descompensación, independientemente de la fase de gravedad clínica (fase I a IV de la clasificación de la NYHA) e, independientemente de la etiología. El diagnóstico de insuficiencia cardíaca se había establecido formalmente a partir de observaciones clínicas, seguimiento de la cardiopatía, ecocardiografía transtorácica (ETT) y monitorización de BNP. Estos pacientes fueron incluidos durante su visita regular programada en el hospital. Los pacientes con ICA se reclutaron independientemente de la presentación clínica (izquierda, derecha, mixta, choque cardiogénico de bajo flujo).

El grupo de control de la cohorte de descubrimiento-validación estaba constituido por pacientes sin IC pero con factores de riesgo cardiovascular (FRC) o FRC y disnea no cardíaca (DNC) para la etapa de descubrimiento y la etapa de validación, respectivamente. Los pacientes con FRC fueron reclutados durante su visita programada en el centro de prevención de aterosclerosis del Hospital Universitario de Rangueil. La inclusión en este grupo requirió la exclusión de todos los pacientes con antecedentes, signos clínicos, indicios biológicos o ecocardiográficos de insuficiencia cardíaca (disfunción sistólica o diastólica).

La cohorte de validación externa se constituyó en el Hospital Universitario de Lariboisière (París, Francia) con pacientes con EPOC (con  $BNP < 20$  pg/ml para ensayar la EPOC "pura" sin ningún tipo de estrés cardíaco izquierdo o derecho) como pacientes de control y pacientes con ICA como pacientes de caso.

Para todos los sujetos se recopilaron datos antropométricos (peso, altura, género), antecedentes clínicos, datos biológicos y electrocardiografía (tablas 1, 3, 5). Todos estos exámenes fueron realizados durante el tratamiento por el médico a cargo de los pacientes y se realizaron para monitorizar la fase de insuficiencia cardíaca, pero también la función renal y hepática, la hidratación y el nivel inflamatorio. Todos los medicamentos fueron registrados.

La ETT se realizó para todos los sujetos incluidos por un solo cardiólogo. La ecocardiografía (Konton Imagic, Kontron, Saint German en Laye, Francia) permitió mediciones sistemáticas de volúmenes y diámetros, mediciones de la función sistólica y diastólica y de la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo. Se excluyeron los pacientes con diálisis renal o trasplante (fase 5D y 5T).

El protocolo de investigación se registró en una base de datos clínica (ClinicalTrials.gov NCT01024049) conforme a las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975. El protocolo fue aprobado por el comité de investigación humana (COSSEC) y ética regional de la institución (Comité de Protection des Personnes (CPP) # DC 2008-452). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes y/o sus representantes legalmente autorizados.

### Conjuntos de descubrimiento y validación

En primer lugar, se constituyó aleatoriamente un conjunto de descubrimiento-ensayo de 49 sujetos de los 228 pacientes de la cohorte de descubrimiento-validación. Veintiún pacientes con IC con 9 de los 67 con ICA y 12 de los 51 con ICA constituyeron el subconjunto de casos y 28 de los 67 pacientes con FRC constituyeron el subconjunto de controles. Las orinas de estos 49 sujetos se usaron para el análisis proteómico por CE-MS (tabla 1). El péptido X64054 aislado a través de este análisis se identificó adicionalmente a continuación como IGFBP2 y se ensayó en plasma del conjunto de descubrimiento-ensayo. Además se constituyeron dos cohortes de validación. La primera que comprendía pacientes del hospital universitario de Toulouse (tabla 3); el conjunto de validación incluyó 179 pacientes con un subconjunto de control constituido por 39 con FRC y 43 con DNC y un subconjunto de casos constituido por 39 con ICA y 58 con ICC.

Se constituyó una segunda cohorte de validación con 40 pacientes del Hospital Universitario de Lariboisière, París. Esta cohorte de validación externa incluyó 10 pacientes con EPOC y 30 con ICA (tabla 5).

### Muestras biológicas

Todos los sujetos se sometieron a una venopunción y se extrajo sangre venosa periférica en tubos de sodio/EDTA. Después de la centrifugación a 1500 g a 4 °C durante 10 minutos, el plasma se separó, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta que se analizó. Los sujetos también proporcionaron una muestra de orina por la mañana, y se recogieron 20 ml en un recipiente de recogida de polipropileno, se dividieron en alícuotas y se almacenaron como anteriormente.

### Métodos analíticos

#### Preparación de muestras y análisis por electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE-MS)

Todos los participantes recogieron muestras de orina por la mañana el día de los exámenes ecocardiográficos.

Las alícuotas se almacenaron a -80 °C hasta el momento del procesamiento. Las muestras de orina se procesaron a continuación como se ha descrito anteriormente [13] y después se resuspendieron en agua de grado de HPLC poco antes de los análisis por CE-MS. El análisis por CE-MS se realizó como se ha descrito usando un sistema de electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Villepinte, Francia) en línea acoplado a un MicroQTOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). El pulverizador ESI (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) se conectó a tierra y el potencial de la interfaz de pulverización iónica se estableció entre -4,0 y -4,5 kV. La adquisición de datos y los métodos de adquisición de MS fueron controlados automáticamente por la CE a través de relés de cierre de contacto. Los espectros se acumularon cada 3 s, en un intervalo de m/z de 350 a 3000. Los detalles sobre exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad del método de CE-MS se han proporcionado anteriormente.

#### Procesamiento de datos

Los espectros de masas se procesaron usando el software MosaiquesVisu (Mosaiques, Hannover, Alemania), incluyendo la selección de picos, deconvolución y desisotopado. El tiempo de migración y la intensidad máxima se normalizaron usando estándares polipeptídicos internos. Se cree que estos fragmentos son el resultado de procesos biológicos normales y parecen no resultar afectados por ninguna patología estudiada hasta la fecha tomando como base 20.000 muestras en la base de datos de los inventores. La lista de picos resultante caracteriza a cada polipéptido por su masa molecular, el tiempo de migración de electroforesis capilar normalizada y la intensidad de la señal normalizada. Todos los polipéptidos detectados se depositaron, emparejaron y anotaron en una base de datos Microsoft SQL, lo que permitió análisis y comparación adicionales de múltiples grupos de pacientes.

#### Métodos estadísticos e identificación de biomarcadores

Se compararon las medias y proporciones de las características clínicas y ecocardiográficas de las muestras de descubrimiento y de ensayo por medio de una prueba de la t y las estadísticas  $\chi^2$ , respectivamente, usando el

software SAS, versión 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.). En la fase de descubrimiento, se compararon la amplitud de la señal transformada con logaritmo natural del perfil del polipéptido urinario de CE-MS entre pacientes y controles mediante la prueba de Wilcoxon para datos independientes. Esta prueba no paramétrica es adecuada para datos proteómicos sesgados. Se puso a prueba la hipótesis nula de que los pacientes y los controles tienen la misma distribución continua de amplitud de la señal del perfil del polipéptido urinario de CE-MS. La amplitud de la señal representa los recuentos calibrados (intensidad) registrados por el dispositivo de espectrometría de masas. El ajuste estadístico para ensayos múltiples se realizó aplicando la corrección de Benjamini-Hochberg. Se buscó un grupo de polipéptidos urinarios que discriminaran entre casos y controles basándose en la distribución de biomarcadores en sujetos individuales. Para cada caso y cada control, los polipéptidos seleccionados se combinaron en una única variable de resumen, usando el software MosaCluster basado en máquina de vectores soporte, versión 1.6.5. En el conjunto de ensayo, los investigadores que desconocían al estado clínico de los participantes del estudio midieron los polipéptidos agrupados. Después de descifrar el código, se calculó la sensibilidad y la especificidad basándose en la tabulación del número de muestras clasificadas correctamente en el conjunto de ensayo, usando gráficos de características operativas del receptor (ROC). El área bajo la curva de ROC (AUC) proporciona una medida única de precisión general que es independiente de cualquier umbral particular.

#### Secuenciación

Las muestras de orina se analizaron en un sistema de nanoflujo Dionex Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Camberly RU), esencialmente como se describe (Carty et al., 2011; Metzger et al., 2012). Las muestras (5 µl) se cargaron en una columna Nano-Trap Danoex 100 µm x 2 cm 5 µm C18 a un caudal de 5 µl/min mediante un muestreador automático Ultimate 3000 RS (Dionex, Camberly, RU). La composición de la solución de carga fue ácido fórmico al 0,1 % y acetonitrilo (98:2). Una vez cargada en la columna trampa, la muestra se lavó en una nanocolumna Acclaim PepMap C18 de 75 µm x 15 cm, 2 µm 100 Å a un caudal de 0,3 µl/min. La elución se realizó con un gradiente lineal de disolvente A, ácido fórmico al 0,1 % y acetonitrilo (98:2) contra disolvente B, ácido fórmico al 0,1 % y acetonitrilo (20:80) comenzando con un 1 % de B durante 5 minutos, aumentando hasta el 30 % a 90 minutos y después al 50 % de B a los 120 minutos. La columna trampa y de nanoflujo se mantuvieron a 35 °C en un horno de columna en el Ultimate 3000 RSLC. El eluyente de la columna se dirigió a una fuente de ESI de nanopulverización Proxeon (Thermo Fisher Hemel RU) que funciona en modo de ion positivo y después a un Orbitrap Velos FTMS. La tensión de ionización fue de 2,5 kV y la temperatura del capilar fue de 200 °C. El espectrómetro de masas fue operado en modo MS/MS barriendo de 380 a 2000 uma. El método de fragmentación fue HCD al 35 % de energía de colisión. Los iones se seleccionaron para MS2 usando un método dependiente de los datos con un recuento de repetición de 1 y un tiempo de repetición y exclusión de 15 s. Los iones precursores con un estado de carga de 1 fueron rechazados. La resolución de iones en MS1 fue de 60.000 y 7.500 para HCD MS2. Los archivos de datos de los experimentos realizados en el LTQ habilitado para HCD se buscaron en la base de datos no redundante humana de IPI usando Thermo Proteome Discoverer, sin ninguna especificidad enzimática. No se seleccionó ninguna modificación fija, y la oxidación de metionina y prolina se establecieron como modificaciones variables. Se permitió una ventana de error de masa de 10 ppm y 0,05 Da para MS y MS/MS, respectivamente. Para una validación adicional de las identificaciones de péptidos obtenidas, se usó la correlación estricta entre la carga de péptidos al pH de trabajo de 2 y el tiempo de migración de CE, para minimizar las tasas de identificación de falsos positivos 17. El tiempo de migración de CE calculado de la secuencia candidata basándose en su secuencia de péptidos (número de aminoácidos básicos) se comparó con el tiempo de migración experimental. Se aceptaron desviaciones del tiempo de migración de CE por debajo de ±2 minutos correspondientes a la medición de CE-MS.

#### Métodos inmunitarios

La transferencia de Western se realizó como ya se ha publicado 18 usando el anticuerpo monoclonal de conejo anti-IGFBP2 humana, clon EPR3380 (2) (Clinisciences, Nanterre, Francia). El ensayo de adsorción de IGFBP2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.) se usó para medir la IGFBP2 humana según las especificaciones del fabricante.

#### Extracciones de ARNm, PCR de transcripción inversa (RT) y cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Se realizaron extracciones de ARNm y RT-qPCR como ya se ha descrito usando los diferentes cebadores como ya se ha realizado [Harmancey R et al, 2007].

#### Análisis estadístico

Debido a la gran cantidad de señales en comparación con el número de pacientes ensayados en el análisis de CE-MS, solo se mantuvo la señal con una relación de señal respecto a ruido superior a 4 veces el fondo. A menos que se especifique lo contrario, las variables continuas se presentan como variables categóricas medias (±SD) como porcentajes. Para las variables continuas, una prueba de la t de Student o una prueba de Mann-Whitney para datos independientes cuando falló el ensayo de normalidad o para las variables categóricas se usó una prueba de chi cuadrado para determinar sus diferencias estadísticas entre los grupos. Los análisis estadísticos se realizaron usando el lenguaje de computación R (<http://www.R-project.org>) y Medcalc (Medcalc, versión 11.6.0.0, Medcalc software bva, Bélgica).

## **Resultados**

### Estudio de descubrimiento

5 Los datos demográficos y clínicos del conjunto de descubrimiento-ensayo se presentan en la tabla 1. Las diferencias significativas entre el control y los pacientes con IC para medicamentos, analítica al ingresar, ecocardiografía y signos vitales al ingresar están de acuerdo con su estado clínico. Por tanto, las concentraciones plasmáticas de BNP y CRP fueron significativamente mayores en pacientes con IC mientras que el aclaramiento de creatinina y la concentración de sodio se redujeron. Además, la tensión arterial media y la fracción de expulsión (FE) se redujeron en los pacientes con IC. Los pacientes con IC también tuvieron un aumento de la frecuencia cardíaca. Los pacientes con IC eran mayores que los sujetos control ( $70 \pm 15$  frente a  $53 \pm 12$ ;  $p < 0,001$ ). El 43 % de los pacientes con IC tenían antecedentes de AC. Los factores de riesgo cardiovascular estaban representados de manera similar en los dos grupos.

15 *Polipéptidos representados de forma diferencial determinados por CE-MS e identificación de un nuevo supuesto biomarcador de IC.*

El objetivo fue detectar los posibles perfiles de biomarcadores que podrían ser una característica distintiva de IC usando el análisis de CE-MS de muestras de orina como primera etapa. Basándose en el análisis del proteoma en orina de los pacientes con ICA e ICC (todas las fases y etiologías) y los sujetos de control con FRC, se definió un conjunto de polipéptidos específico para la IC (9 polipéptidos con  $AUC \geq 0,923$ ,  $p < 0,001$  (corrección de múltiples ensayos de Benjamini Hochberg) (tabla 2). Un polipéptido (x64054, masa 1878,792 Da; tiempo de electroforesis  $t = 20,7224$  s) pareció muy interesante porque mostró un excelente poder de discriminación para IC con un AUC de 0,988,  $p = 1,39 \times 10^{-5}$ . Por lo tanto, el enfoque se centró en este péptido y se le pudo identificar como la proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide (IPI: IPI00297284.1). En primer lugar se verificó la presencia de IGFBP2 en orina y sangre humanas y se observó que IGFBP2 era más abundante en plasma que en orina (datos no mostrados). El análisis por ELISA de la concentración urinaria de IGFBP2 reveló que la concentración fue de  $505 \pm 198$  (n=35) veces más baja que en el plasma (no se muestra). Debido a esta observación, se analizó adicionalmente IGFBP2 en muestras de plasma mediante ELISA.

30 *Concentración plasmática de IGFBP2*

El análisis de IGFBP2 en plasma mostró un aumento significativo en los pacientes con insuficiencia cardíaca en comparación con los individuos de control con  $1350 \pm 635$  ( $p < 0,001$ ) y  $214 \pm 136$  ng/ml, respectivamente (figura 7). Los niveles de BNP en estos pacientes mostraron una mayor concentración en pacientes con IC que en los de control;  $806 \pm 693$  y  $39 \pm 28$  ( $p < 0,001$ ), respectivamente (figura 7).

### Estudio de validación

40 Los datos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos en el conjunto de validación se presentan en la tabla 3. Los pacientes con FRC tienen factores de riesgo cardiovascular sin síntomas ni parámetros objetivos de IC. Los pacientes con ICA fueron el grupo de mayor edad. Los pacientes con ICA tenían afecciones comórbidas significativas, incluyendo hipertensión (81 %), cardiopatía coronaria (52 %) y diabetes mellitus (24 %). La mayoría de los pacientes tomaban diuréticos (89 %) y agentes antiplaquetarios (60 %). La distribución por edad de los pacientes del grupo con ICC se localiza en el grupo de control entre los grupos de FRC y DNC. Los pacientes con ICC tenían  $62 \pm 13$  años de edad con un 68 % hombres y la FEVI fue  $\leq 45$  % en 42 pacientes. Los pacientes tenían afecciones comórbidas significativas, incluyendo hipertensión (37 %), cardiopatía coronaria (51 %) y diabetes mellitus (30 %). Nuevamente, la mayoría de los pacientes tomaban diuréticos (78 %) y agentes antiplaquetarios (54 %). No hay ninguna diferencia significativa para el género entre los grupos. Las concentraciones de IGFBP2 aumentaron significativamente en los pacientes con ICC e ICA frente a los pacientes con FRC o DNC. Este aumento de los niveles de IGFBP2 siguió un patrón similar al de los niveles de BNP en este conjunto de pacientes (figura 8). El análisis de la curva ROC de los pacientes con FRC y DNC frente a los pacientes con ICC e ICA mostró un área bajo la curva (AUC) de 0,933 para IGFBP2 con un índice de Youden de 0,81 asociado con IGFBP2  $> 556$  ng/ml, que fue mayor que BNP (0,870;  $p = 0,038$ ). La regresión logística de IGFBP2+BNP elevó el AUC a 0,942 pero no aumentó significativamente el rendimiento de IGFBP2 (datos no mostrados).

IGFBP2 se ensayó para el diagnóstico cardíaco de pacientes con disnea aguda. Los valores de las concentraciones de IGFBP2 y BNP de estos pacientes con disnea aguda se presentan para mostrar la distribución global de los pacientes (datos no mostrados). El análisis de la curva ROC de pacientes con DNC frente a ICA mostró un aumento del AUC para IGFBP2+BNP frente a BNP (0,925 frente a 0,859;  $p = 0,04$ ). En estos grupos de pacientes, el rendimiento de discriminación de IGFBP2 no fue significativamente diferente del de BNP (datos no mostrados). Se observó una clara diferencia entre el rendimiento de diagnóstico de BNP e IGFBP2 cuando el nivel de BNP en plasma era su zona de diagnóstico deficiente, que se extendió en este contexto de 100 a 600 pg/ml, que correspondía a su nivel más bajo con la concentración de descarte y 600 pg/ml que se definió como un valor de corte más alto razonable para incluir IC. En contraste con el BNP, que no tuvo valor diagnóstico (AUC = 0,643; IC al 95 %: 0,479-0,787) en esta zona de concentraciones, IGFBP2 alcanzó un AUC de 0,838 (IC al 95 %: 0,690-0,934)



(figura 9).

#### Niveles de IGFBP2 y correlaciones con parámetros clínicos

5 El análisis univariable de correlación entre IGFBP2 y BNP con las principales características de los pacientes se presenta en la tabla 4. Los niveles de IGFBP2 y BNP se correlacionaron fuertemente entre sí ( $\rho = 0,722$ ;  $p < 0,001$ ). Además, los niveles de BNP e IGFBP2 se correlacionaron de manera similar con diurético y proteína C reactiva, aclaramiento de creatinina y FEVI.

#### 10 Validación externa de IGFBP2 como biomarcador de ICA

Se ensayó el valor de predicción de IGFBP2 para el diagnóstico de ICA en una cohorte de pacientes reclutados en el Hospital Lariboisière, París. Esta cohorte comprendía pacientes con ICA y EPOC y se describe en la tabla 5. El uso del umbral de 556 ng/ml que se determinó de forma previa e independiente en la cohorte de descubrimiento-validación como se ha indicado anteriormente, condujo a una sensibilidad del 80 % para el diagnóstico de ICA y una especificidad del 90 % para pacientes con EPOC (datos no mostrados).

### **EJEMPLO 3: análisis en animales**

#### 20 Materiales y métodos

##### **Modelo de IC en rata y ecocardiografía transtorácica**

La investigación conforme a la National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals fue autorizada por el Comité de Ética Animal de Inserm. El estudio, que usa infarto de miocardio en ratas Sprague-Dawley de 2 meses (laboratorios Janvier) mediante ligadura de la arteria coronaria, fue aprobado por el Comité Local de Ética Animal (# MP/03/03/01/12). Se realizaron análisis ecocardiográficos transtorácicos para la medición de la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo usando el sistema ecocardiográfico Vivid 7 pro 7 (GE Medical System) como ya se realizó.

30

#### Resultados

##### Ensayo de IGFBP2 en un modelo en rata de IC isquémica

35 En el día 20, es decir, 4 días después de isquemia inducida por cirugía, los animales tuvieron una fracción de expulsión reducida (figura 10A) hasta el día 70 cuando los animales fueron sacrificados y se recogieron los órganos. El análisis de los niveles de expresión génica en tejidos mostró que los niveles de ARNm de IGFBP2 aumentaron en la aurícula de animales isquémicos en comparación con los operados de forma simulada (figura 10B). Es interesante y, en este momento, los niveles de ARNm de IGFBP2 en aurícula de los animales con IC fueron diez veces más altos que en el ventrículo y 4 veces mayores que los del hígado.

40

### **DISCUSIÓN**

45 Los niveles plasmáticos de BNP o NT-proBNP son herramientas valiosas para diagnosticar a los pacientes con IC 2. Por lo tanto, se comparó el valor de diagnóstico de IGFBP2 con el de BNP y el supuesto valor añadido de IGFBP2 respecto a BNP. El rendimiento de diagnóstico de la medición de IGFBP2 llevó a discriminar los casos de IC de los casos de control sin cardiopatía (pacientes con FRC y DNC) con un AUC mayor en comparación con el de BNP. La combinación logística de IGFBP2 y BNP condujo a un aumento del AUC en comparación con el BNP solo cuando se ensayó el uso de IGFBP2 y BNP en la discriminación entre pacientes con DNC e ICA. El valor añadido del rendimiento de diagnóstico de IGFBP2 fue aún más evidente en pacientes con elevación moderada de BNP, es decir, en el intervalo de concentración de 100-600 pg/ml.

50

La regulación positiva de IGFBP2 señala un papel potencial para las proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGF) (IGFBP) en IC e implica en mayor medida al eje somatotropo que abarca hormonas hipotalámicas tales como la hormona liberadora de hormona del crecimiento hipotalámica (GHRH), hormona de crecimiento hipofisaria e IGF 1 y 2. Las IGFBP confieren una regulación a la bioactividad del IGF, pero también pueden tener un papel directo. Claramente, la disponibilidad de IGF1 está regulada por la proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide IGFBP. Solo del 1 al 5 % de IGF1 está libre en el torrente sanguíneo, el IGF1 restante está estrechamente unido a las IGFBP con una afinidad mayor que o igual a para su receptor. Por lo tanto, las IGFBP modulan la interacción de los receptores de IGF1 e IGF1. Sin embargo, recientemente se descubrió que algunas IGFBP tienen su propia actividad incluso en ausencia de IGF, a través de una interacción directa con los factores de transcripción y la modulación de la expresión génica.

60

IGFBP2 es la segunda IGFBP más abundante en plasma humano. IGFBP2 es principalmente un inhibidor de IGF1. Los datos de correlación de los inventores confirmaron que los niveles plasmáticos de BNP e IGFBP2 no dependen del sexo, pero aumentan positivamente con la edad y negativamente con el índice de masa corporal.

65

Se reconoció que IGF1 está implicado en el crecimiento y el desarrollo del miocardio 28. El IGF1 y su receptor se expresan en el corazón desde la fase fetal e inducen hipertrofia del miocardio a través de las vías de MAP-quinasas y PI-3 cinasa. IGF1 también estimula la producción de proteínas del miocardio, incluyendo algunas con funciones contráctiles tales como troponina y actina. Por lo tanto, IGF1 se relaciona con la función contráctil cardíaca y los niveles de IGF1 están correlacionados con la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (FEVI). IGF1 también está implicado en la supervivencia y la apoptosis de los cardiomiocitos. Los modelos murinos y también pequeños ensayos clínicos con inyección de GH o IGF1 han revelado una reducción de la remodelación temprana del corazón, una mejora de la función sistólica y diastólica y una mejora de la contractilidad. Recientemente, la adición del anticuerpo neutralizador contra IGFBP2 en el momento de la diferenciación celular, causó una importante hipertrofia de mioblastos.

Este estudio permitió a los inventores analizar el vínculo entre IC e IGFBP2 plasmática y el uso potencial de IGFBP2 como un nuevo biomarcador. Los inventores observaron claramente un aumento de casi 7 veces de la concentración plasmática de IGFBP2 en pacientes con IC. Además, el ensayo de IGFBP2 en la "zona gris" de BNP reveló un mayor poder de discriminación para este nuevo biomarcador.

La IGFBP2 es producida principalmente por el hígado y el corazón, por lo tanto, es probable que sea indicativa de la función hepática o cardíaca. Estos puntos se evaluaron en el modelo de IC en rata isquémica que también reveló un nivel de ARNm de IGFBP2 más fuerte en la aurícula frente al ventrículo o el hígado. Sobre todo, los niveles de ARNm de IGFBP2 aumentaron significativamente en la aurícula de los animales con IC. Esta observación plantea la cuestión del supuesto papel de IGFBP2 en la aurícula. Se podría especular que el aumento de la síntesis de IGFBP2 podría estar implicado en un mecanismo de protección contra la remodelación excesiva en el corazón porque la reducción de la neutralización basada en anticuerpos in vitro de IGFBP2 tras la diferenciación de los mioblastos condujo a hipertrofia 34. Además, la sobreexpresión de IGFBP2 causó una reducción de la masa muscular en el ratón 36. Sin embargo, a pesar de los sólidos antecedentes, esta hipótesis deberá ponerse a prueba más a fondo en modelos animales de IC.

Finalmente, se observó una correlación negativa significativa del nivel de IGFBP2 con el valor de FEVI en los pacientes. Estas observaciones tienden a proponer el uso de IGFBP2 como un posible biomarcador de seguimiento que podría utilizarse para estimar la estabilidad y la gravedad de la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, debido a su sensibilidad y especificidad en IC, el primer uso de IGFBP2 podría ser complementario con el BNP en el diagnóstico de IC en una población de pacientes con disnea aguda de origen cardíaco o no.

Este estudio adolece de algunas limitaciones. La validación del nuevo biomarcador IGFBP2 se realizó con una pequeña cohorte externa de pacientes. Sin embargo, el aumento de la concentración de IGFBP2 en pacientes con ICA fue fiable y califica a IGFBP2 como un nuevo biomarcador. Ahora se pretende ensayar IGFBP2 en cohortes internacionales multicéntricas muy grandes para obtener más validaciones. Además, el papel funcional de IGFBP2 en IC se definirá en modelos animales en roedores.

El uso de IGFBP2 como biomarcador de IC es prometedor y puede mejorar el diagnóstico de IC, especialmente en el intervalo de valores de BNP indicativos de IC leve a moderada. A pesar de que la síntesis de IGFBP2 es producida principalmente por el corazón, esta también es secretada por el hígado. Esta observación no debe afectar al uso de IGFBP2 para el diagnóstico de IC. Claramente, la insuficiencia cardíaca es un síndrome y los datos de los inventores proponen que IGFBP2 es un biomarcador fiable que podría revelar el estado funcional del corazón.

## REFERENCIAS:

En toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. El alcance de la protección está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Delahaye, F., Roth, O., Aupetit, J. F. y de Gevigney, G. [Epidemiology and prognosis of cardiac insufficiency]. Arch Mal Coeur Vaiss 94, 1393-1403 (2001).

Harmancey R, Senard J-M, Rouet P, Pathak A, Smih F. Adrenomedullin inhibits adipogenesis under transcriptional control of insulin. Diabetes. 2007; 56: 553-63.

Hassfeld S, Eichhorn C, Stehr K, Naegele H, Geier C, Steeg M, Ranke MB, Oezcelik C, Osterziel KJ. Insulin-like growth factor-binding proteins 2 and 3 are independent predictors of a poor prognosis in patients with dilated cardiomyopathy. Heart. Mar. 2007; 93(3): 359-60.

Mischak, H. et al. Comprehensive human urine standards for comparability and standardization in clinical proteome analysis. Proteomics Clin Appl 4, 464-478, doi:10.1002/prca.200900189 (2010).

Phillips K, M A Park, L H Quarrie, M Boutinaud, J D Lochrie, D J Flint, G J Allan, J Beattie. Hormonal control of IGF-binding protein (IGFBP)-5 and IGFBP-2 secretion during differentiation of the HC11 mouse mammary epithelial cell line. Journal of molecular endocrinology, 31: 197-208 (2003).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para clasificar insuficiencia cardíaca en un paciente de acuerdo con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la New York Heart Association (NYHA), en el que dicho método comprende las etapas de medir la concentración de la proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP2) en una muestra de plasma u orina obtenida de dicho paciente, en el que la concentración de IGFBP2 se correlaciona con la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA.
- 10 2. Un método para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca en un paciente, que comprende:
- i. determinar la concentración de IGFBP2 en una muestra de plasma u orina obtenida de dicho paciente; y
  - ii. comparar dicha concentración con un valor de control.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la insuficiencia cardíaca es una insuficiencia cardíaca asintomática, una insuficiencia cardíaca crónica o una insuficiencia cardíaca aguda.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de IGFBP2 se mide cuantificando el nivel de proteína IGFBP2 en la muestra.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la cuantificación del nivel de proteína IGFBP2 se realiza usando un conjunto de anticuerpos dirigidos contra IGFBP2.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la cuantificación del nivel de proteína IGFBP2 se realiza mediante ELISA.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la cuantificación del nivel de proteína IGFBP2 se realiza mediante una técnica de electroforesis capilar-espectroscopía de masas.

## Curva ROC

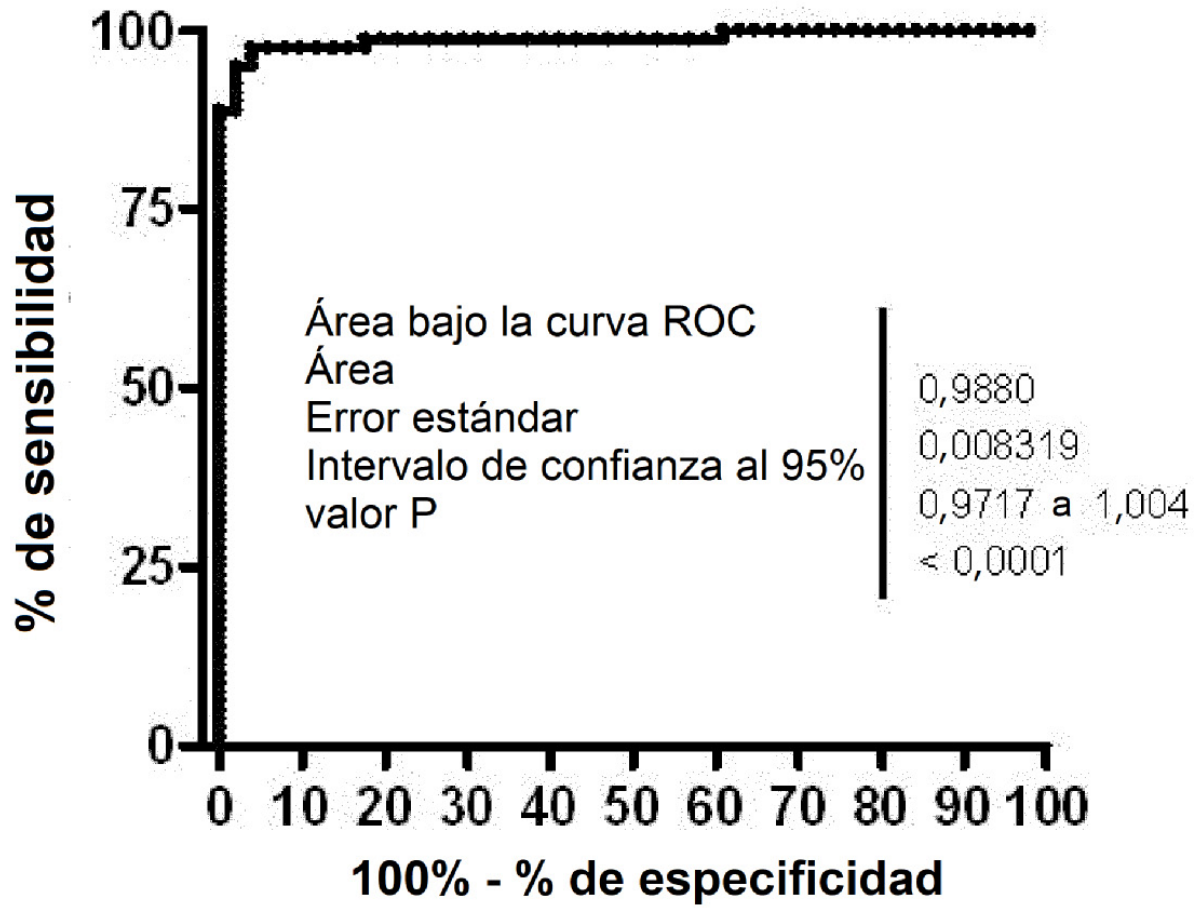


Figura 1

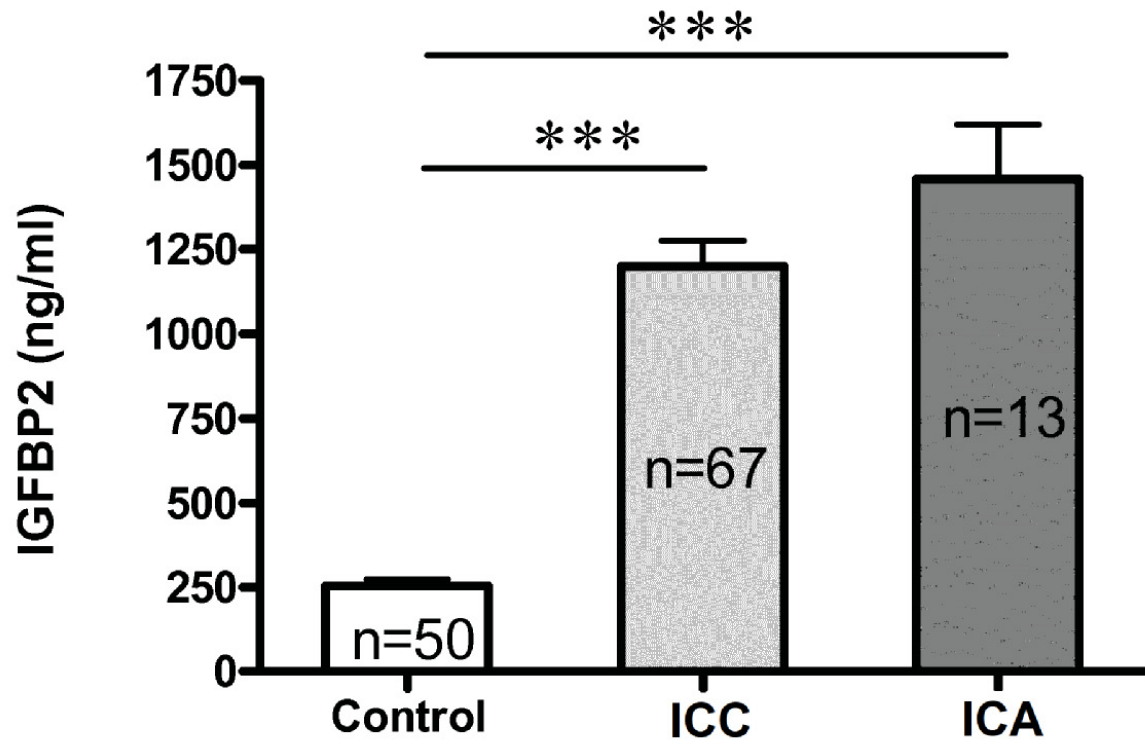


Figura 2

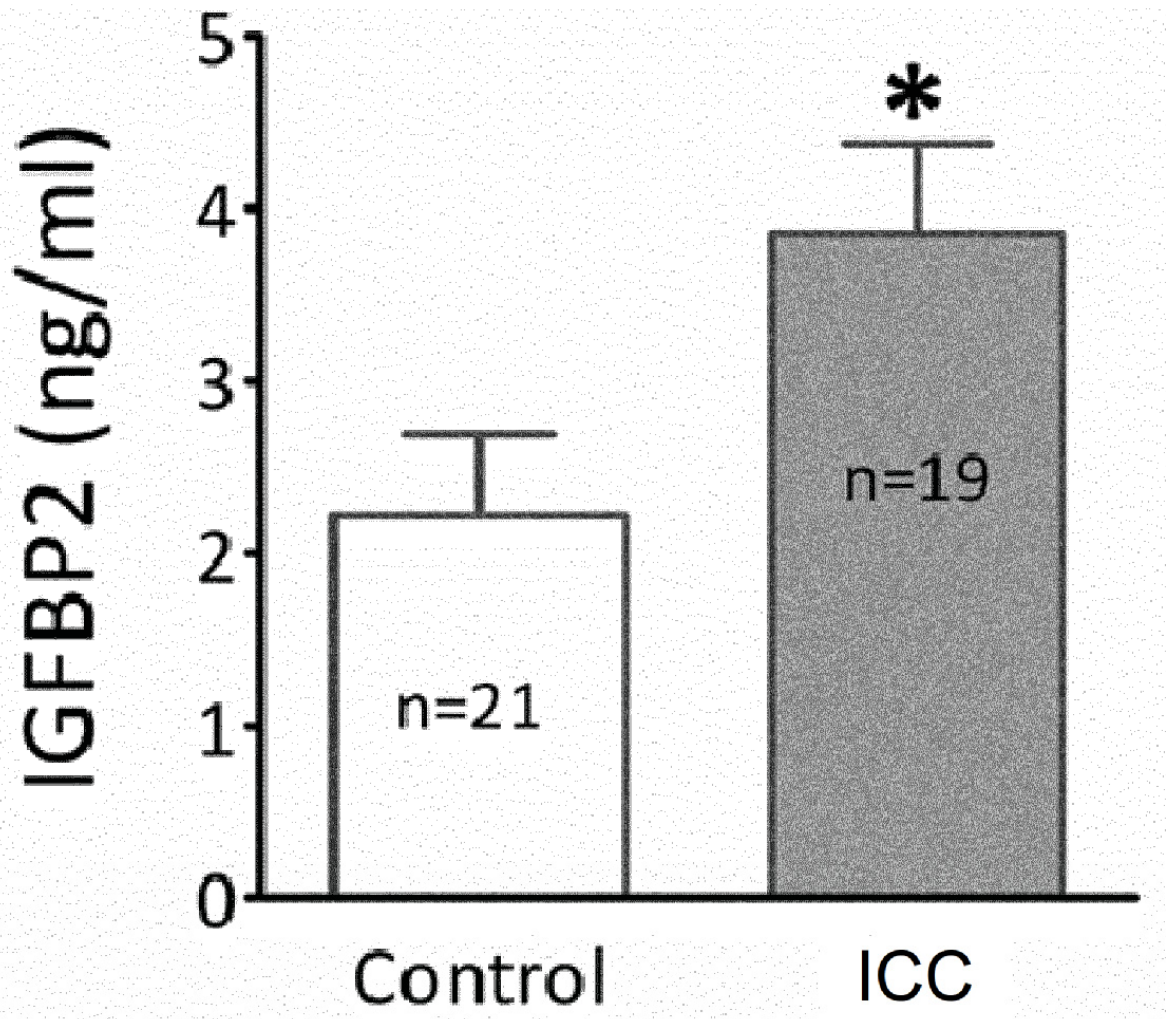


Figura 3

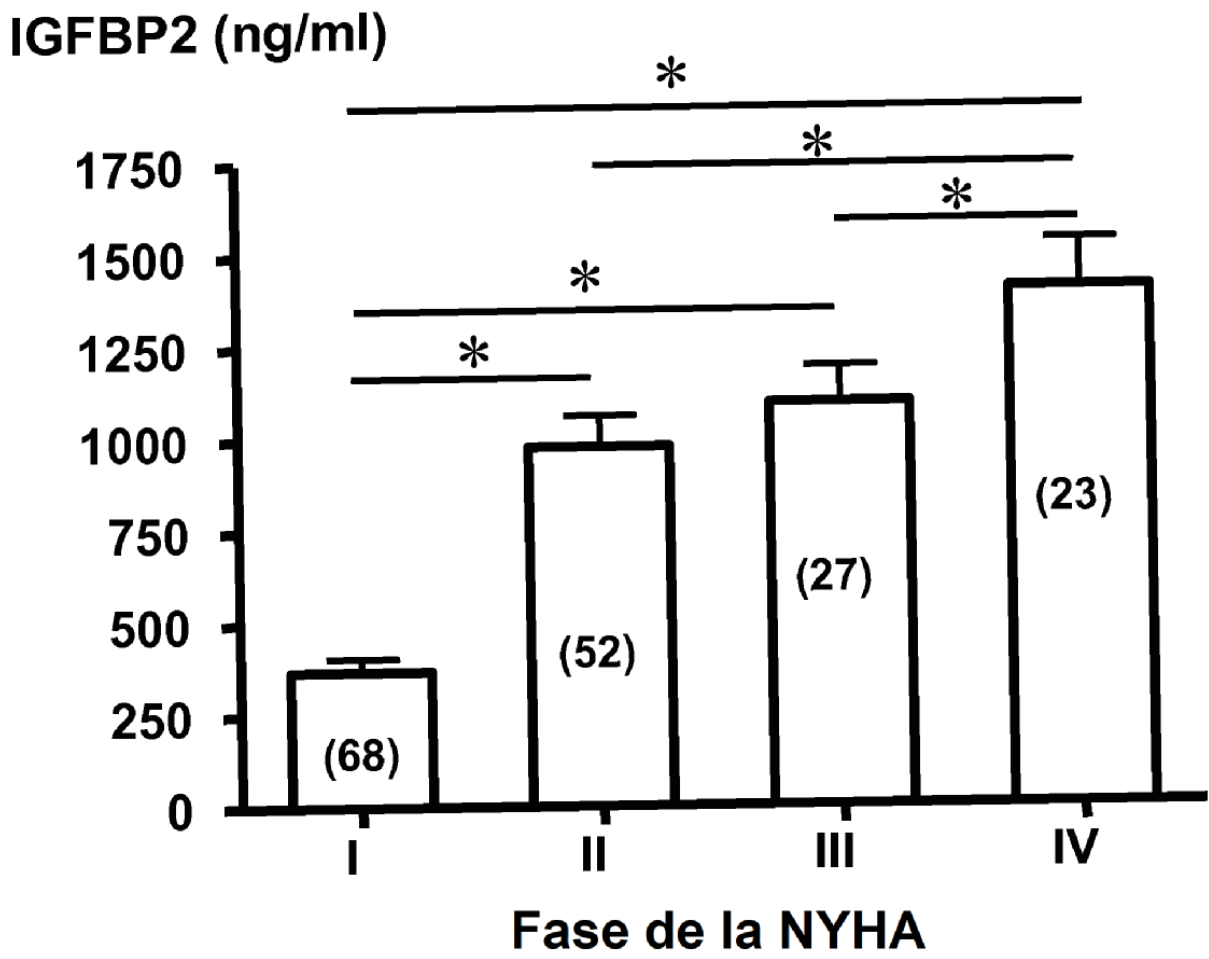


Figura 4

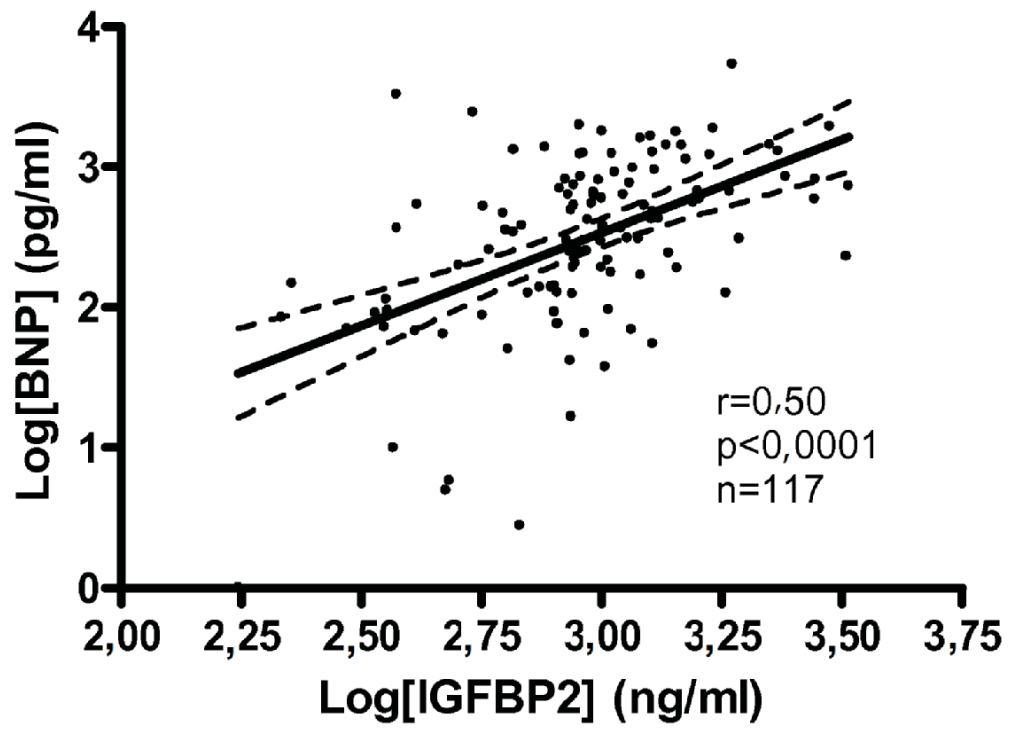


Figura 5



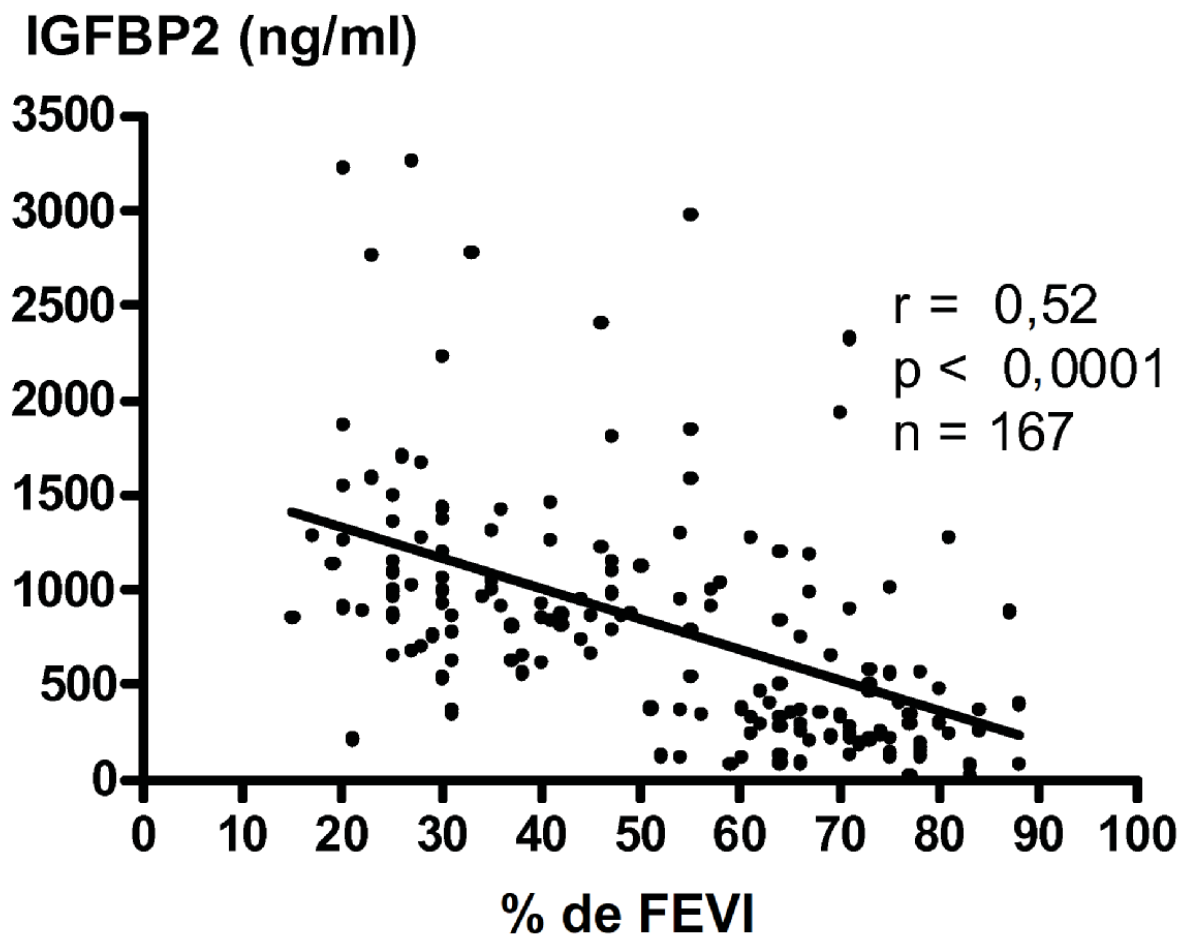


Figura 6

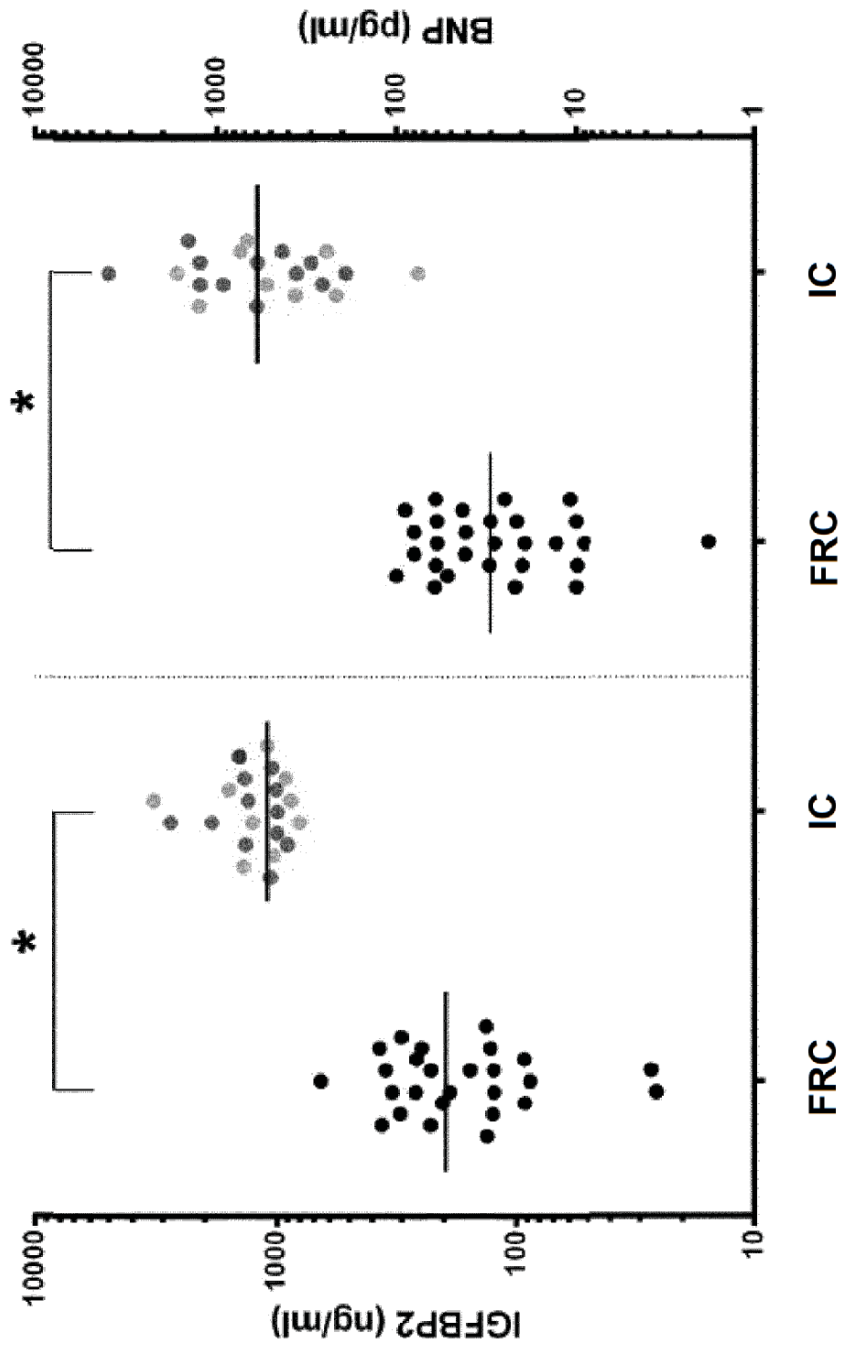


Figura 7

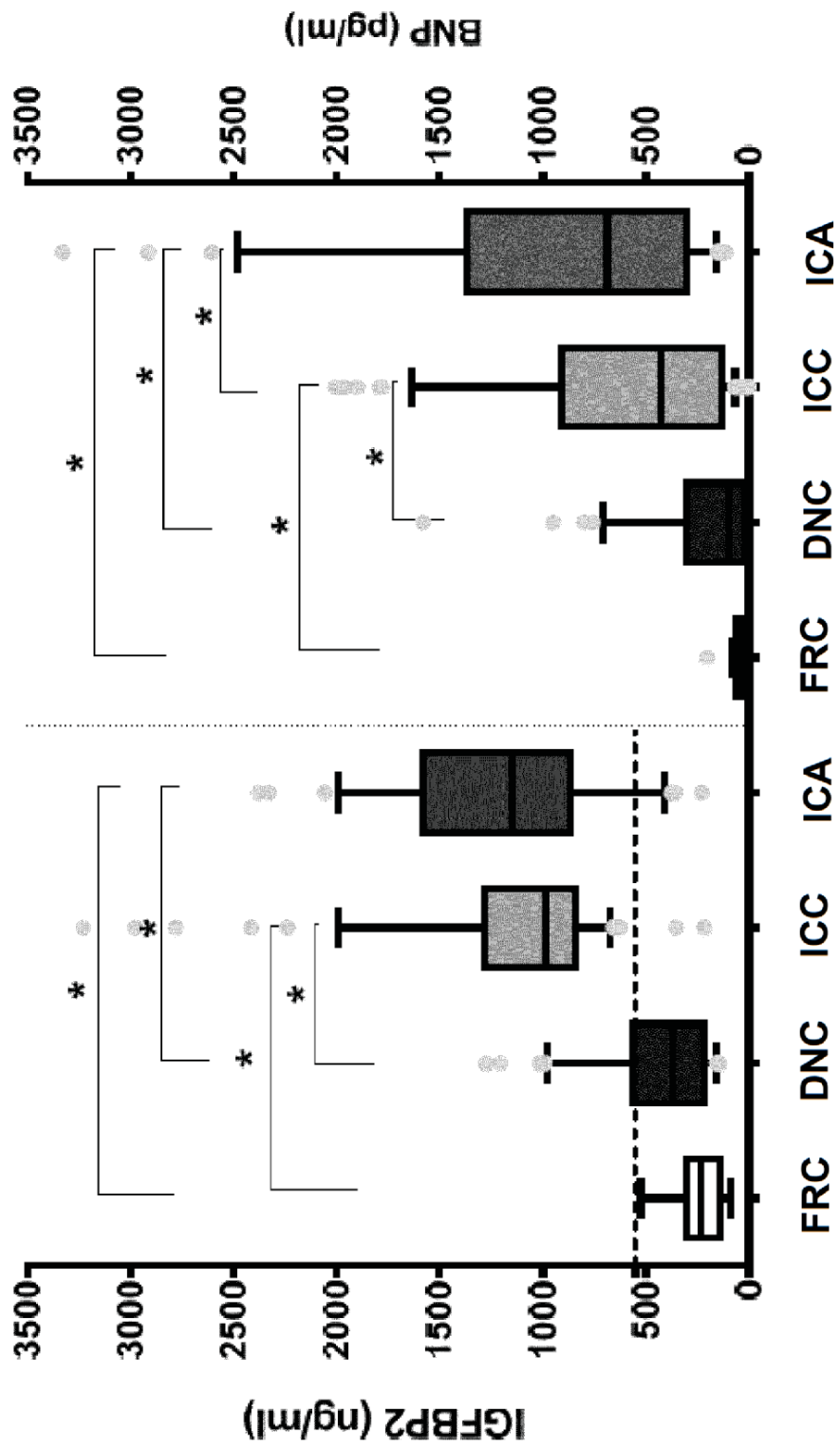


Figura 8

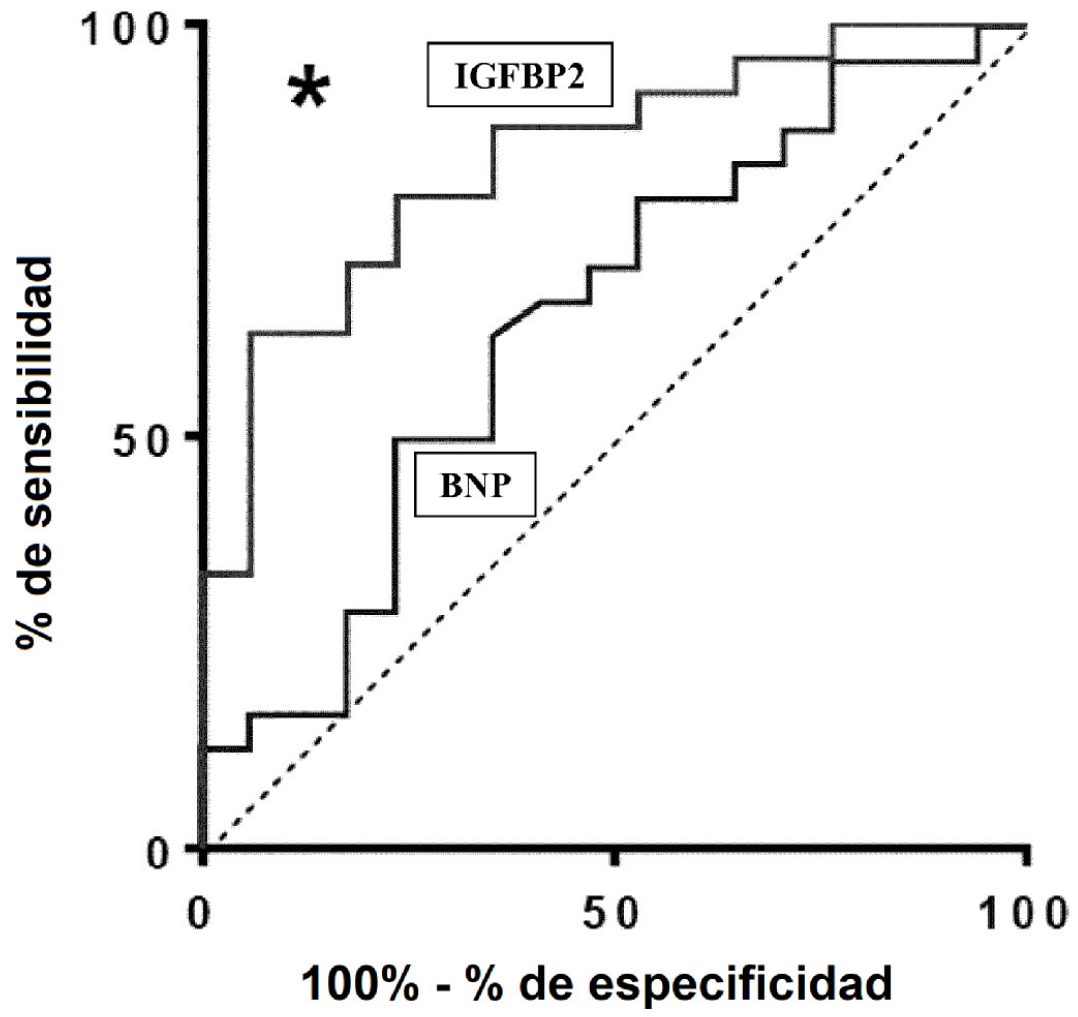


Figura 9

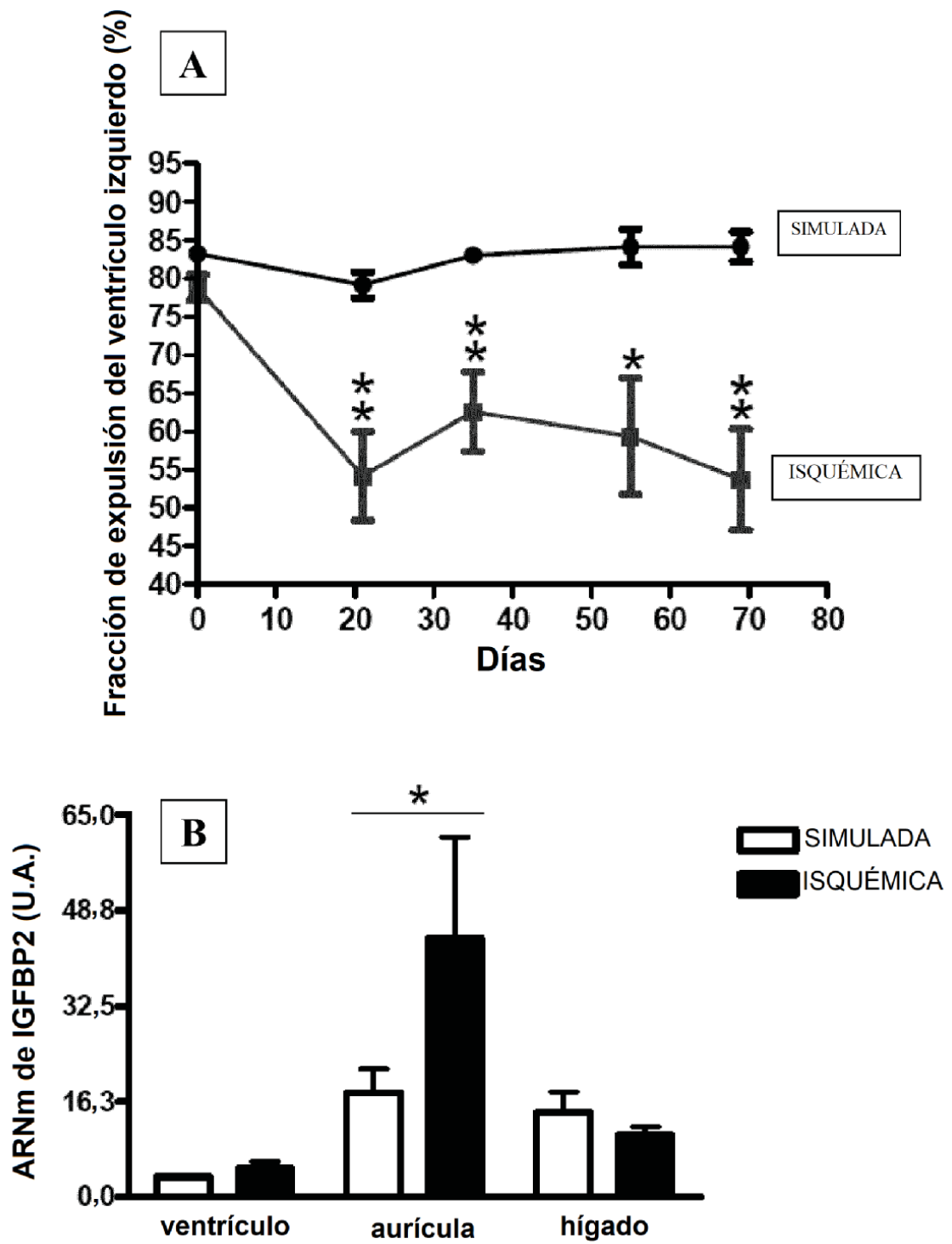


Figura 10 A y B