

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 797**

21 Número de solicitud: 201800061

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.02.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.09.2019

71 Solicitantes:

RIVERO OTERO, José Miguel (25.0%)
Avda. Fernando Abril Martorell, 106 Hospital
Universitario y Politécnico La Fe, Torre A,
5ª planta, Laboratorio 5.27
46026 Valencia ES;
ROSELLÓ LLETÍ, Esther (25.0%);
PORTOLÉS SANZ, Manolo (25.0%) y
GIL CAYUELA, Carolina (25.0%)

72 Inventor/es:

RIVERO OTERO, José Miguel;
ROSELLÓ LLETÍ, Esther;
PORTOLÉS SANZ, Manolo y
GIL CAYUELA, Carolina

74 Agente/Representante:

OCHOA BLANCO-RECIO, Juan Carlos V.

54 Título: **Determinación de alteraciones en la metilación del gen ANKYRIN REPEAT-AND SOCS BOX - CONTAINNG PROTEIN 1, como marcador de disfunción ventricular y del volumen latido del ventrículo izquierdo en pacientes con cardiopatías isquémica**

57 Resumen:

La presente invención hace referencia a un procedimiento para efectuar un diagnóstico de la insuficiencia cardíaca de origen isquémico en un individuo. Describimos un nuevo método para el cálculo de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y de la performance del ventrículo izquierdo (volumen latido) mediante la utilización de la metilación diferencial del gen ANKYRIN REPEAT-AND SOCS BOX-CONTAINING PROTEIN 1- cg11 1898 68- en pacientes con insuficiencia cardíaca de origen isquémico.

Nuestro método implica el cálculo de la metilación diferencial de los sitios de un determinado gen y su utilización como instrumento de medida de relación con una función orgánica, en este caso la fracción de eyección y el volumen latido, independientemente de la relación que se obtenga utilizando el grado de expresión de mRNA. Introducimos el valor de la metilación diferencial como regulador de función por sí misma, y no solamente a través de la acción down-reguladora que ejerce sobre la expresión génica.

ES 2 723 797 A1

DESCRIPCIÓN

5 Determinación de alteraciones en la metilación del gen ANKYRIN REPEAT- AND SOCS BOX-CONTAINING PROTEIN 1, como marcador de disfunción ventricular y del volumen latido del ventrículo izquierdo en pacientes con cardiopatía isquémica.

Antecedentes

10 La insuficiencia cardíaca es un síndrome multifactorial que conduce a alteraciones de la contracción ventricular y dilatación cardíacas y que causa una elevada morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. Este síndrome es causado por enfermedades cardiovasculares, de las cuales la miocardiopatía dilatada y la miocardiopatía isquémica son las más frecuentes. La necesidad de desarrollar nuevas estrategias para su tratamiento surge de la eficacia limitada de las terapias actuales para este grave síndrome, el cual con una elevada prevalencia en
15 aumento sigue ocasionando un elevado gasto sanitario (van Deursen VM, et al. Eur J Heart Fail. 2014; 16: 103-11; Khatibzadeh S, et al. Int J Cardiol. 2013;1186- 94; Kazi DS, y Mark DB. Heart Fail Clin. 2013; 9: 93-106).

20 Datos recientes indican que la prevalencia en mayores de 20 años, que viven con insuficiencia cardíaca, es del 2,7 %. Sólo en los Estados Unidos se dan más de 670.000 casos nuevos cada año en mayores de 45 años (Yusuf S, et al. Circulation. 2001; 104:2746-53; Roger VL, et al. Circulation. 2012; 125:e2-e220), triplicándose, entre 1979 y 2004, la incidencia de nuevos hospitalizados (Fang J, et al., J Am Coll Cardiol. 2008; 52:428-34). Además, el aumento de la longevidad poblacional y una mayor supervivencia postinfarto agudo han contribuido, entre
25 otros factores, al incremento de su prevalencia consumiendo en la actualidad, en los países industrializados, más del 2% del gasto en salud (Roger VL, et al., Circulation 2012; 125: e2-e220).

30 Otras causas frecuentes de insuficiencia cardíaca son la hipertensión arterial y la enfermedad coronaria, además de la enfermedad valvular. La supervivencia de la insuficiencia cardíaca en mujeres es menor que la obtenida para el cáncer de mama, colorrectal y de ovario; y en hombres es 30 menor su supervivencia a la del cáncer de próstata (Askoxylakis V, et al., BMC
35 Cáncer 2010; 10: 105). En insuficiencia cardíaca descompensada aguda la mortalidad hospitalaria es 4.3 %, la estancia hospitalaria es de 4 a 6 días, con 20 % de readmisión a días y 50 % en 6 meses, siendo la mortalidad en un mes del 11.6 % y en un año del 33.3 % (Jong P, et al., Arch Intern Med 2002; 162: 1689-94).

40 En conclusión, la insuficiencia cardíaca es un problema de salud crítico y prioritario por su creciente prevalencia y por su agresividad en términos de mortalidad y supervivencia. Un diagnóstico más preciso podría reducir el proceso terapéutico en estos pacientes.

45 Por lo tanto, la insuficiencia cardíaca es el estadio terminal de múltiples procesos cardiológicos, un síndrome clínico complejo que se caracteriza por anomalías de la función ventricular izquierda y de la regulación neurohormonal, que conlleva intolerancia al ejercicio, retención de líquidos y disminución de la longevidad (Packer, M. Drug Treatment of Heart Failure, 2nd ed. Secaucus, N. J., ATC International, 1988, p. 273).

50 Para el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca el examen clínico constituye la primera herramienta, seguido del electrocardiograma, la radiografía de tórax y el ecocardiograma bidimensional con estudios de flujo Doppler. Sin embargo, la imprecisión diagnóstica puede ser tan alta como el 60 % en los servicios de emergencias, con una tasa de error de 15 % (McCullough PA, et al., Circulation 2002; 106:416-22).

- En la actualidad, existen diversos marcadores que analizan diferentes alteraciones fisiopatológicas en la insuficiencia cardíaca. Algunos tienen que ver con la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, la disfunción endotelial sistémica y el remodelado miocárdico. La hipertrofia del miocito es probablemente una de las primeras consecuencias de la insuficiencia cardíaca. Esta situación conlleva una mayor expresión de algunos genes que codifican proteínas contráctiles (miosina, troponina...) no contráctiles (péptidos natriuréticos...), así como por un tamaño celular aumentado y alteraciones en el citoesqueleto, como acabamos de demostrar recientemente (Herrer I, et al., *Lab Invest.* 2014;94:645-53).
- 5 Sin embargo, existen muchos marcadores bioquímicos, neurohumorales (endotelina, vasopresina, péptidos natriuréticos, adrenomedulina...) e inflamatorios (factor de necrosis tumoral alfa, interleucinas, moléculas de adhesión...) cuyo papel en el pronóstico de la insuficiencia cardíaca está por definir. En este sentido, nuestro grupo ha determinado los niveles sanguíneos de big-endotelina (precursor de la endotelina-1), NTproBNP (fragmento terminal del proBNP, precursor de BNP) y aldosterona, en pacientes con insuficiencia cardíaca (Rivera M, et al., *Rev Esp Cardiol* 2005; 58:278-84). Los resultados obtenidos en este trabajo indican una buena relación entre los valores plasmáticos de big Endotelina-1 y NT-proBNP y los parámetros de función ventricular izquierda sistólica (fracción de eyección) y diastólica (velocidad de propagación del flujo mitral, y desplazamiento del plano auriculoventricular).
- 10 También son varios los trabajos en los que hemos indicado la determinación urinaria de NT-proBNP como marcador de la insuficiencia cardíaca y su relación con la función ventricular (Cortés R, et al. *Peptides.* 2012; 33: 354-8; *J Card Fail.* 2007; 13:549-55; *Heart.* 2007; 93: 957-62; *Eur J Heart Fail.* 2006; 8:621-7).
- 15 Por todo ello, es necesario obtener nuevos biomarcadores para el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca humana que tengan su origen en mecanismos celulares y moleculares básicos, que muestren también a nivel tisular valores alterados, como hemos indicado anteriormente (Cortés R, et al., *Int J Cardiol.* 2012; 158:199-204).
- 20 En este sentido decidimos analizar en muestras de ventrículo izquierdo humano la metilación diferencial de varios de los genes relacionados previamente con la actividad muscular en modelos animales, hipotetizando que alguna de las áreas de metilación diferencial (sitios) que forman parte del conjunto de cambios epigenómicos podrían tener relación con la contracción ventricular y la performance del ventrículo izquierdo (volumen latido), y esta relación no se establecería midiendo la expresión de mRNA del gen (expresión génica) sino midiendo la diferencia de metilación que se obtiene al comparar con sujetos normales control alguno de esos sitios del gen que estemos analizando, independientemente de un mayor o menor cambio de expresión de su mRNA.
- 25 Se calcularon las correlaciones de la metilación diferencial de los sitios de todos genes humanos de nuestras muestras de miocardio isquémico, relacionados con función muscular en modelos animales desarrollados con anterioridad, con la fracción de eyección inmediatamente previa a la realización del trasplante y también con el volumen latido obtenido inmediatamente antes al trasplante cardiaco. De todos ellos, solo dos sitios de un mismo gen ANKYRIN REPEAT- AND SOCS BOX-CONTAINING PROTEIN 1 cg11189868 y ANKYRIN REPEAT- AND SOCS BOX-CONTAINING PROTEIN 1 cg09969882 tuvieron una metilación diferencial significativa, al compararlos con las muestras del ventrículo de los sujetos control y solo ANKYRIN REPEAT- AND SOCS BOX-CONTAINING PROTEIN 1 cg11189 868 tuvo una relación significativa con la fracción de eyección ($r=-0,849$, $p=- 0,008$) y con el volumen latido ventricular izquierdo ($r=-0,929$, $p=0,001$).
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50

Metodología

5 Las muestras de tejido se obtienen cerca del ápex del ventrículo izquierdo y se mantienen en una concentración de cloruro sódico del 0.9 por 100 preservadas a 4 grados centígrados un máximo de 4 horas después de la pérdida de la circulación coronaria. Las muestras se conservan a menos 80 grados centígrados hasta que son usadas. Se precipitan dos veces con fenol, cloroformo isoamílico y alcohol. Una vez con cloroformo se centrifugan 5 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugan a una velocidad máxima durante 15 minutos a 4 10 grados centígrados y el sobrenadante se descarta. Todas las muestras de DNA se cuantifican por el método fluorométrico (Quant-i T PicoGreen dsDNA Assay, Live technologies, CA, U.S.A).

15 Los estudios epigenéticos se realizan con la utilización del Infinium methylation epic bead platform ilumina, interrogando más de 850000 CPGS, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de todo el genoma se amplifican siguiendo un endpoint enzimático de fragmentación precipitación y re-suspensión. Las muestras resuspendidas se hibridan durante 16 horas a 48 grados centígrados y se lavan con un nucleótido único de extensión con dideoxinucleótidos marcado. Se realizan y se repiten rondas de marcado que se aplican con la combinación de anticuerpos marcados que diferencian entre biotina y 2,4 20 dinitrofenol, DNP. Un balance de ajuste de color y una normalización de cuartiles se llevan a cabo para normalizar las muestras entre los dos canales de color. La metilación del DNA se muestra como beta valores que van de cero a uno CPGS con detección de una $p < 0.01$ y se considera que una caída más allá del mínimo de intensidad y por tanto del límite de detección es motivo de exclusión. El conjunto de datos se normaliza y el background corregido mediante el uso de un módulo de metilación 1.9.0 se estudió en Genome Studio v 2011.1 software. 25

El transcriptoma de las librerías se usa para realizar solid template beads. La calidad de la muestra se asegura basándose en un flujo de parámetros preestablecidos. La calidad de los datos se mide utilizando el Solid Experimental Tracking Software Parameter.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para valorar el grado de disfunción ventricular de un Individuo con cardiopatía isquémica mediante la utilización del perfil diferencial de metilación del gen ANKYRIN REPEAT- AND SOCS BOX-CONTAINING PROTEIN 1-cg11189868.
- 10 2. Método para valorar el volumen latido de un individuo con cardiopatía isquémica mediante la utilización un perfil diferencial de metilación del gen ANKYRIN REPEAT- AND SOCS BOX-CONTAINING PROTEIN 1- cg11 189 868.
3. Método combinado de valoración de la función ventricular y del volumen latido mediante la medición de la metilación diferencial de ANKYRIN REPEAT- AND SOCS BOX-CONTAINING PROTEIN 1-cg11189868.



- ②¹ N.º solicitud: 201800061
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 26.02.2018
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 0220003 A2 (MERCK PATENT GMBH [DE/DE]) 14/03/2002, página 2, línea 30 – página 3, línea 6; página 6, líneas 3-9; reivindicaciones 1, 13.	1-3
A	KEMPTON A. <i>et al.</i> Altered regulation of cardiac ankyrin repeat protein in heart failure. <i>Heliyon</i> , Enero 2018, Vol. 4, páginas:1-20, páginas 1-2, abstract; página 9, apartado, 3.3; página 12, apartado, 4.	1-3
A	LING S. <i>et al.</i> Ankyrin Repeat Domain 1 Protein: A Functionally Pleiotropic Protein with Cardiac Biomarker Potential. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2017, Vol. 18, páginas: 1362-1385, página 1362, abstract.	1-3
A	AIMURA T. <i>et al.</i> Cardiac Ankyrin Repeat Protein Gene (ANKRD1) Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy. <i>Journal of the American College of Cardiology</i> , 2009, Vol. 54, páginas: 334-342, página 334, abstract.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 11.10.2018</p>	<p>Examinador M. D. García Grávalos</p>	<p>Página 1/2</p>
---	--	------------------------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PUBMED, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.