

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 906**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2014 PCT/EP2014/061819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195456**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2014 E 14728216 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3004891**

54 Título: **Biomarcador de rehospitalización tras insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

06.06.2013 EP 13305760

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

30.09.2019

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (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;
SMITH-ROUET, FATIMA;
DESMOULIN, FRANCK y
GALINIER, MICHEL**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 725 906 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

Biomarcador de rehospitalización tras insuficiencia cardíaca

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a un método para determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca es susceptible de ser hospitalizado nuevamente por la misma enfermedad, en donde dicho método comprende medir la concentración de IGFBP2 en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca.

10

Estado de la técnica

La prevalencia de la insuficiencia cardíaca (IC) está creciendo debido al envejecimiento y a 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 a la necesidad de acceso a atención especializada. Para ayudar a los profesionales sanitarios a diagnosticar la insuficiencia cardíaca, se han propuesto biomarcadores de IC en sangre, tales 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 exámenes de IC a gran escala. Además, el 30% de los pacientes ingresados en las unidades de urgencias por 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 la IC requerirá exámenes costosos y lentos. Sin embargo, se reconoce que un diagnóstico rápido y una atención médica temprana del paciente tienen un impacto positivo en la salud del paciente y también reducen el coste del tratamiento.

15

20

25

Se ha divulgado que el aumento del nivel de IGFBP2 es un factor de predicción de la mortalidad por todas las causas y cardiovascular en pacientes con diabetes de tipo 2 (Ram Prakash Narayanan et al.: "IGF binding protein-2 is associated with all-cause and cardiovascular mortality in type 2 diabetes", 18 de marzo de 2013 (18/03/2013).

30

Hassfeld et al., divulgan que puede usarse IGFBP2 como biomarcador para la cardiomiopatía ("Insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3 are independent predictors of a poor prognosis in patients with dilated cardiomyopathy", vol. 93, n.º 3, 1 de marzo de 2007 (01/03/2007)).

35

Shweta R. Motiwala et al. han escrito que puede usarse IGFBP2 como biomarcador para muerte/infarto de miocardio ("Using Biomarkers to "Guide" Heart Failure Management", Cardiology in review, vol. 21, n.º 3, 1 de enero de 2013 (01/01/2013)).

El documento WO2014/023820 describe el uso de IGFBP2 para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca.

40

También se ha demostrado que los niveles de IGFBP-1 predijeron de manera consistente la IC entre los supervivientes de un primer infarto agudo de miocardio y podrían ser predictivos en una población libre de infarto agudo de miocardio diagnosticado clínicamente anterior (Jansky et al., "Insulin like growth factor binding protein-1 is a long-term predictor of heart failure in survivors of a first acute myocardial infarction and population controls. International Journal of Cardiology 138 (2010) 50-55).

45

Sin embargo, nunca se ha descrito el uso de IGFBP2 como biomarcador para la rehospitalización de pacientes ya hospitalizados por una insuficiencia cardíaca.

50

Un alta hospitalaria segura del paciente hospitalizado por insuficiencia cardíaca es un desafío muy importante. Para evitar un riesgo vital para el paciente, es esencial evaluar cuidadosamente el estado clínico del paciente a través del examen clínico, pero también con el apoyo de parámetros biológicos objetivos. Además, un reingreso hospitalario debido a una estimación optimista del pronóstico del paciente puede causar problemas financieros importantes al hospital de estar en los Estados Unidos a través de una sanción determinada mediante un cálculo de un índice de reingreso excesivo para la insuficiencia cardíaca (Hospital Readmission Reduction Program of the social security: <http://www.cms.gov/Medicare/Medicare-Fee-for-Service> Payment/AcutelInpatientPPS/Readmissions-Reduction-Program.html).

55

Por lo tanto, Es de interés tener un biomarcador biológico objetivo de rehospitalización después de una insuficiencia cardíaca.

60 **Objeto de la invención**

Los inventores han iniciado un estudio prospectivo con pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) de tres hospitales afiliados a universidades en el área metropolitana de Atlanta. El análisis de una sola variable reveló una asociación de IGFBP2 con el reingreso de pacientes por insuficiencia cardíaca.

65

Por lo tanto, la invención se refiere a un método para determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca es

susceptible de ser hospitalizado nuevamente por la misma enfermedad, en donde dicho método comprende medir la concentración de IGFBP2 en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca.

Descripción detallada de la invención

5 **Método para la estimación del riesgo de rehospitalización**
 La invención se refiere a un método para determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca es susceptible de ser hospitalizado nuevamente por la misma enfermedad, en donde dicho método comprende medir la concentración de IGFBP2 en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca.

10 En una realización, la invención se refiere a un método para determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca es susceptible de ser rehospitalizado (tasa de rehospitalización), en donde dicho método comprende medir la concentración de IGFBP2 en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca.

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

- (i) medir la concentración de IGFBP2 en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca,
- 20 (ii) comparar la concentración de IGFBP2 medida en la etapa (i) con un valor umbral derivado de la concentración de IGFBP2 en muestras que se han obtenido de pacientes que se encuentran en estadios particulares de la insuficiencia cardíaca y/o con un valor umbral derivado de la concentración de IGFBP2 en muestras obtenidas de pacientes sanos.

25 En una realización, el valor umbral corresponde a la concentración del segundo cuartil (mediana) en muestras que se han obtenido de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. Este valor umbral se encuentra entre el valor mediano del paciente que no fue hospitalizado y el valor mediano del paciente que fue hospitalizado u hospitalizado nuevamente.

30 La invención también se refiere a un método para determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca es susceptible de ser hospitalizado nuevamente por la misma enfermedad que comprende las etapas que consisten en i) determinar la concentración de IGFBP2 en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente; y ii) comparar dicha concentración con el valor umbral.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "paciente con insuficiencia cardíaca" indica un paciente que sufre insuficiencia cardíaca y que está hospitalizado o que ha sido hospitalizado por una insuficiencia cardíaca en cualquier estadio. La expresión "paciente con insuficiencia cardíaca" también indica un paciente que ha sido hospitalizado por insuficiencia cardíaca en el pasado.

40 Como se usa en el presente documento, el término "rehospitalizado" indica un paciente que ha sido hospitalizado por una insuficiencia cardíaca y que nuevamente está hospitalizado. En este contexto, el paciente es hospitalizado nuevamente por la misma enfermedad. Dicho de otra forma, el término "rehospitalizado" indica una hospitalización adicional debido a la insuficiencia cardíaca.

45 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 una muestra de sangre, plasma, suero o linfa. En una realización particular, dicha muestra es de sangre o plasma.

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

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "insuficiencia cardíaca" indica la incapacidad del corazón para suministrar suficiente flujo de sangre para satisfacer las necesidades del cuerpo y esta patología está bien descrita en la práctica de la medicina. Este término abarca insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda.

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

65 Como se usa en el presente documento, el término "insuficiencia cardíaca aguda" indica la insuficiencia cardíaca de aparición repentina, así como la insuficiencia cardíaca aguda "exacerbada" o "descompensada", que se refiere a episodios en los que un paciente con insuficiencia cardíaca crónica conocida o sin insuficiencia cardíaca crónica

presenta síntomas de empeoramiento repentino y requiere hospitalización. Las complicaciones comunes debidas a la insuficiencia cardíaca aguda incluyen, pero sin limitación, disnea por congestión pulmonar o choque cardiogénico por bajo gasto cardíaco, fácil fatigabilidad (intolerancia al ejercicio), edema periférico, anasarca (pronunciado edema generalizado), hipotensión, síncope, oliguria o anuria, hiperpotasemia.

5 Un paciente con insuficiencia cardíaca se clasifica según una graduación internacional, a saber, la clasificación funcional de la New York Heart Association (NYHA). La clasificación funcional de insuficiencia cardíaca generalmente la realiza mediante 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, 6.^a ed. 10 Boston: Little, Brown et al., 1964;114). Esta clasificación clasifica la gravedad de la insuficiencia cardíaca en 4 clases (I-IV).

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

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

Un paciente con enfermedad cardíaca que produce una marcada limitación de la actividad física se clasifica como una clase III de la NYHA. Una actividad menor de la habitual provoca fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso. Se sienten cómodos en reposo.

25 Un paciente con enfermedad cardíaca que no pueda realizar ninguna actividad física sin molestias se clasifica como una clase IV de la NYHA. Los síntomas de insuficiencia cardíaca o del síndrome de angina pueden estar presentes incluso en reposo. Si se realiza alguna actividad física, la incomodidad aumenta.

30 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. Típicamente, las concentraciones de IGFBP2 se pueden medir, por ejemplo, mediante la técnica de electroforesis capilar-espectroscopia de masas (EC-EM), otras técnicas de espectrometría de masas o ELISA realizadas en la muestra.

35 Preferentemente, la invención se refiere a un método para determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca es susceptible de ser hospitalizado nuevamente por la misma enfermedad que comprende una etapa a) que consiste en medir la concentración de IGFBP2 en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca. 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.

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

45 La detección de la concentración de IGFBP2 en la muestra también puede realizarse 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.

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

55 La presencia de la proteína puede detectarse usando técnicas electroforéticas e inmunodiagnósticas convencionales, incluyendo inmunoensayos tales como ensayos de competición, de reacción directa o de tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, pero sin limitación, transferencias de Western; ensayos de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados con enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación, la técnica de electroforesis capilar-espectrometría de masas (EC-EM), etc. Las reacciones generalmente incluyen marcadores de revelado, tales como marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivos, enzimáticos o moléculas colorantes u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos con los que reacciona.

60 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 práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o de pocillo de microtitulación); cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotado; 65 membranas de nylon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles y similares.

Más particularmente, se puede usar un método ELISA, en donde se recubren los pocillos de una placa de microtitulación con un conjunto de anticuerpos contra las proteínas que se van a ensayar. Después, se añade una muestra que contiene o que se sospecha que tiene la proteína marcadora a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, pueden lavarse las
 5 placas para retirar los restos no unidos y se añade una molécula de unión secundaria marcada de manera detectable. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora capturada en la muestra, se lava la placa y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando métodos bien conocidos en la técnica.

Los métodos de la invención pueden comprender una etapa que consiste en comparar la proteína IGFBP2 y la concentración de fragmentos en células circulantes 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, se pueden
 10 emplear unidades relativas para describir una concentración. En una realización particular, "concentración de IGFBP2" puede referirse a fragmentos de IGBP2. Por lo tanto, en una realización particular, también pueden medirse fragmentos de IGFBP2.

Los inventores han determinado que el riesgo de hospitalización y/o rehospitalización de un paciente está asociado con la concentración de proteína IGFBP2 en plasma. Por lo tanto, la proporción de pacientes hospitalizados o rehospitalizados por insuficiencia cardíaca es mayor cuando la proteína plasmática IGFBP2 es superior a 171 ng/ml (el valor de la mediana de concentración de proteína IGFBP2 en plasma en la cohorte, (Figura 1, Figura 2, tabla 4). La tasa anual de hospitalización por insuficiencia cardíaca y otras causas se correlaciona positivamente con la concentración plasmática de la proteína IGFBP2 (Figura 3 y Figura 4, respectivamente). El riesgo de hospitalización
 20 y/o rehospitalización para un paciente es proporcional a la concentración de proteína IGFBP2 en plasma. Por lo tanto, por cada aumento de 100 ng/ml de proteína IGFBP2, la tasa de hospitalización/reingreso aumenta en un 20%. En otras palabras, por cada 100 ng/ml de más que el valor umbral de 171 ng/ml (el valor de la mediana de concentración de IGFBP2 en la cohorte), un paciente tiene un 20% más de probabilidades de ser hospitalizado por una insuficiencia cardíaca y por todas las causas (véase la tabla 3 y la tabla 4). En otra palabra más y a modo explicativo, un paciente con una concentración de IGFBP2 = valor umbral + 100 ng/ml tiene un 20% más de probabilidades de ser hospitalizado por una insuficiencia cardíaca. Un paciente con una concentración de IGFBP2 = valor umbral + 200 ng/ml tiene un 40% más de probabilidades de ser hospitalizado por una insuficiencia cardíaca. Un paciente con una concentración de IGFBP2 = valor umbral + 300 ng/ml tiene un 60 % más de probabilidades de ser hospitalizado por una insuficiencia cardíaca.

Normalmente, un "valor umbral", "nivel umbral" o "valor de corte" pueden determinarse experimentalmente, empíricamente o teóricamente. Un valor umbral también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocerá un experto habitual en la materia para concentraciones de proteína plasmática mayores de 171 ng/ml. Preferentemente, el experto en la materia puede
 30 comparar la concentración de IGFBP2 obtenida de acuerdo con el método de la invención con un valor umbral definido.

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

Preferentemente, dicho valor umbral es la concentración media de IGFBP2 de una población de individuos enfermos. Como se usa en el presente documento, el término "individuo enfermo" indica un ser humano que se sabe que está enfermo, es decir, que sufre insuficiencia cardíaca en cualquier estadio de la insuficiencia cardíaca según la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA.

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. Después, se determina el valor medio de las concentraciones obtenidas, de acuerdo con un análisis estadístico bien conocido, con el fin de obtener la concentración media de IGFBP2. Dicho valor se considera normal y, por lo tanto, constituye un valor umbral. Al comparar las concentraciones de IGFBP2 con este valor umbral, el médico puede entonces determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca debe ser rehospitalizado. 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 insuficiencia cardíaca o no o se puede determinar fácilmente el estadio de la insuficiencia cardíaca según la clasificación de insuficiencia cardíaca de la NYHA.

En consecuencia, el médico podría adaptar y optimizar la atención médica adecuada de un sujeto en una condición crítica y potencialmente mortal que padece insuficiencia cardíaca. La determinación de dicho pronóstico es muy apropiada para el seguimiento y la toma de decisiones clínicas.

Por lo tanto, la invención se refiere a un método para determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca es susceptible de ser rehospitalizado y comprende las siguientes etapas:

- 5 a) determinar la concentración de IGFBP2 en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca;
 b) determinar la concentración media de IGFBP2 en una muestra biológica obtenida de una población de individuos sanos o enfermos, preferiblemente 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).

10 Otro objeto más de la invención 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 que se ha obtenido de un paciente con insuficiencia cardíaca.

15 El kit puede incluir un anticuerpo o un conjunto de anticuerpos como se ha descrito anteriormente. En una realización particular, el anticuerpo o conjunto de anticuerpos se marcan como se ha descrito anteriormente. El kit también puede contener otros reactivos y materiales adecuadamente empaquetados necesarios para el protocolo de detección particular, incluyendo matrices de fase sólida, si procede y patrones. El kit también puede contener uno o más medios para la detección de un biomarcador adicional.

20 Un objeto adicional de la invención se refiere a un método para determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca es susceptible de ser hospitalizado nuevamente, en donde dicho método comprende además las etapas de:

- 25 (i) medir la concentración de IGFBP2 en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca,
 (ii) comparar la concentración de IGFBP2 medida en el paso (i) con un valor umbral procedente de la concentración de IGFBP2 en muestras que se han obtenido de pacientes sanos, en donde cuando la concentración de IGFBP2 en dicha muestra es mayor que el umbral, entonces el paciente es susceptible de ser hospitalizado nuevamente.

30 Un objeto adicional de la invención se refiere al uso de IGFBP2 como biomarcador para la rehospitalización de un paciente después de una insuficiencia cardíaca.

35 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.

Figuras

40 **Figura 1:** The Atlanta Cardiomyopathy Consortium: Diseño del estudio

Figura 2: Estadística descriptiva de IGFBP2. Media \pm DT de IGFBP2: 211 \pm 180 ng/ml, Mediana (IQR): 172 [76, 274] ng/ml. Distribución de IGFBP2: prueba lognormal (prueba Shapiro-Wilk W para datos lognormales: P=0,90)

45 **Figura 3:** Diagrama de cajas de todas las causas de la tasa de hospitalización por cuartiles de IGFBP2.

Figura 4: Diagrama de cajas de la tasa de hospitalización por insuficiencia cardíaca por cuartiles de IGFBP2.

Tabla 1: Características de los pacientes (N=306)

50 Características clínicas:

- Edad: 57 \pm 12 años
 Sexo: 196 varones (64,0 %), 110 mujeres (36,0 %)
 Raza: 158 blanca (51,6 %), 138 negra (45,1 %), 10 otra (3,3 %)
 55 Etiología: 125 isquémica (40,8 %), 181 no isquémica (59,2 %)
 Fracción de eyección del VI: 37 [25, 50] %
 Clase de la NYHA: 214 I-II (69,9 %); 92 III-IV (30,1 %)
 Diabetes Mellitus: 102 (33,3 %)
 Presión sanguínea sistólica: 113 \pm 20 mmHg
 60 BNP: 210 [70, 662] ng/ml (en 240 participantes)
 Creatinina: 1,2 [1,0, 1,5] mg/dl
 Nitrógeno de urea en sangre: 18 [13, 26] mg/dl
 Sodio: 138,4 \pm 2,9 mEq/dl
 Hemoglobina: 13,2 \pm 1,8 g/dl
 65 β -bloqueantes: 279 (91,2 %)
 ACEI o ARB: 239 (78,1 %)

Antagonistas de aldosterona: 134 (43,8 %)
 Dispositivo ICD±CRT: 194 (64,5 %)
 PASP ecocardiográfica en 212 pacientes: 41±15 mmHg

5 Abreviaturas:

VI, ventricular izquierda; NYHA, New-York heart association; BNP, péptido natriurético cerebral; ACEI, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARB, bloqueador del receptor de angiotensina; ICD, desfibrilador cardíaco implantable; CRT, terapia de resincronización cardíaca; PASP, Presión sistólica arterial pulmonar.

10

Las variables continuas normales se expresan como media ± desviación típica.

Las variables no normales se expresan como mediana y [intervalo intercuartílico].

15

Las variables categóricas se expresan como número de ocurrencia y (porcentaje).

Tabla 2: Correlación de IGFBP2 con las características clínicas

Característica	Rho de Spearman	Valor P
Edad	0,107	0,062
Sexo (Masculino=0; Femenino=1)	-0,073	0,20
Raza (Blanca=1)	-0,078	0,17
Etiología (isquémica=1)	0,078	0,17
Fracción de eyección del VI	-0,089	0,12
Clase de la NYHA	0,097	0,095
Diabetes mellitus	0,076	0,19
Presión sanguínea sistólica	-0,104	0,071
BNP (en 240 pacientes)	0,319	<0,0001
Creatinina	0,318	<0,0001
Nitrógeno de urea en sangre	0,312	<0,0001
Sodio	-0,018	0,76
Hemoglobina	-0,206	0,0005
β-bloqueantes	0,044	0,44
ACEI o ARB	-0,167	0,0034
Antagonistas de aldosterona	-0,009	0,87
Dispositivo ICD/CRT	0,009	0,87
PASP ecocardiográfica (en 212 pacientes)	0,220	0,0013

20 VI, ventricular izquierda; NYHA, New-York heart association; BNP, péptido natriurético cerebral; ACEI, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARB, bloqueador del receptor de angiotensina; ICD, desfibrilador cardíaco implantable; CRT, terapia de resincronización cardíaca; PASP, Presión sistólica arterial pulmonar.

Tabla 3: Resultados

5 Seguimiento: mediana, 3,1 [1,9, 3,9] años; media, 2,8 ± 1,1 años 52 eventos clínicos principales: 42 muertes; 5 implante de dispositivo de asistencia ventricular izquierda (LVAD); 5 trasplante cardíaco urgente. 765 ingresos por todas las causas; 278 ingresos (36,3% de todos los ingresos) por IC.

Asociación de IGFBP2 (variable continua) con resultados (N=303)		
Análisis de una variable		
Asociación con los principales eventos clínicos (regresión de Cox): HR por 100 ng/ml	1,22 (IC del 95 %: 1,09 a 1,36)	P < 0,001
Asociación con ingresos por todas las causas (proceso de Poisson, regresión binomial negativa): IRR por cada 100 ng/ml	1,12 (IC del 95 %: 1,03 a 1,22)	P = 0,007
Análisis multivariable*		
Asociación con los principales eventos clínicos (regresión de Cox): HR por 100 ng/ml	1,23 (IC del 95 %: 1,06 a 1,43)	P = 0,005
Asociación con ingresos por IC (proceso de Poisson, regresión binomial negativa): IRR por cada 100 ng/ml	1,20 (IC del 95 %: 1,00 a 1,44);	P = 0,05
*Modelo de ajuste: edad, sexo, raza, etiología, clase de la NYHA, presión sanguínea sistólica, sodio, nitrógeno de urea en sangre (más fuerte que la creatinina y colineal), LVEF, hemoglobina, tratamiento (betabloqueantes, ACEI o ARB, antagonistas de aldosterona, dispositivo implantable). HR: relación de riesgos instantáneos; IRR, relación de tasa de incidentes.		

Tabla 4: Tasas de hospitalización y rehospitalización con concentración de IGFBP2 por debajo y por encima del valor umbral.

Resultados de acuerdo con IGFBP2 alto e IGFBP2 bajo (estado dicotomizado) (N=303)				
Resultado	Bajo IGFBP2 IGFBP2<172 ng/ml	Alto IGFBP2 IGFBP2>172 ng/ml	Relación de tasa de incidentes (IC del 95%)	Valor P
Utilización de recursos (por 100 personas-año)				
Hospitalizaciones por todas las causas	72,8	104,2	1,43 (1,24 - 1,65)	<0,0001
Hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca	21,8	43,1	1,98 (1,54 - 2,55)	<0,0001
Total de días hospitalizados por todas las causas	274	566	1,94 (1,81 - 2,07)	<0,0001
Días hospitalizados totales relacionados con insuficiencia cardíaca	175	346	1,97 (1,81 - 2,15)	<0,0001
Utilización de recursos (por 100 personas-año)				
Rehospitalizaciones por todas las causas	111	151	1,37 (1,15 - 1,63)	<0,0001
Distribución de pacientes				
Pacientes hospitalizados por todas las causas 73 % (N=221)	48 % (106)	52 % (115)		= 0,710

(continuación)

Resultados de acuerdo con IGFBP2 alto e IGFBP2 bajo (estado dicotomizado) (N=303)				
Resultado	Bajo IGFBP2 IGFBP2<172 ng/ml	Alto IGFBP2 IGFBP2>172 ng/ml	Relación de tasa de incidentes (IC del 95%)	Valor P
Pacientes rehospitalizados por todas las causas 51 % (N=155)	44 % (69)	55 % (86)		= 0,311
Pacientes hospitalizados por IC 31 % (N=95)	36 % (34)	64 % (61)		=0,021
Pacientes rehospitalizados con IC 18 % (N=54)	31 % (17)	68 % (37)		=0,018

Ejemplos**Materiales y métodos**

5

Población de pacientes

El Atlanta Cardiomyopathy Consortium es un estudio prospectivo de cohorte que recluta a pacientes ambulatorios con IC de tres hospitales afiliados a la universidad en el área metropolitana de Atlanta (Figura 1). Los criterios de inclusión incluyeron edad >18 años, capaz de comprender y firmar el consentimiento informado por escrito y participar y un diagnóstico de insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida o preservada. El diagnóstico de IC con fracción de eyección preservada requería, además del diagnóstico clínico de la IC, un nivel elevado de péptido natriurético de tipo B > 200 pg/dl y/o evidencias ecocardiográficas de disfunción diastólica. [Paulus WJ et al., 2007]. Los criterios de exclusión incluyeron enfermedad cardíaca congénita, trasplante de corazón previo o en espera de trasplante, enfermedad infiltrativa cardíaca conocida (por ejemplo, amiloidosis), trasplante previo de otro órgano sólido e IC terminal que requiere infusión continua ambulatoria de inotropo.

Procedimientos de estudio

Todos los pacientes se someten a un cuestionario de antecedentes, historial y examen físico, electrocardiograma, prueba de marcha de 6 minutos, varios cuestionarios y recogida de muestras de sangre y orina en la evaluación inicial. La raza la informa el propio paciente. Cada seis meses, se contacta a los pacientes para evaluar los cambios de medicación, procedimientos, nuevos diagnósticos y hospitalizaciones. Los datos de mortalidad se recogen mediante la revisión de registros médicos, información de familiares y consultas en el índice de muertes de la seguridad social. Los datos de hospitalización se obtienen de la revisión de registros de salud electrónicos, notas de pacientes de cualquier consulta a un especialista para cualquier ingreso a un hospital externo y consulta directa del paciente durante el seguimiento. La Junta de Revisión Institucional ha aprobado el estudio. Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes antes del reclutamiento.

Resultados

El evento clínico se definió como una composición de muerte, trasplante de corazón o colocación de dispositivo de asistencia ventricular izquierda. La utilización de recursos se evaluó como visitas al departamento de urgencias, hospitalizaciones por todas las causas y por IC y número total de días de hospitalización por 100 personas-año de seguimiento.

Recogida de muestras de sangre

Todos los sujetos fueron sometidos a una venesección después de 15 minutos de reposo en cama y se extrajo sangre venosa periférica en tubos de EDTA sódico. Después de la centrifugación a 1500 g a 4 °C durante 15 min, se separó el plasma, se separó en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta su ensayo.

Métodos inmunológicos

Ensayo inmunsorbente ligado a enzimas de IGFBP-2. Se usó el kit de revelado de ELISA R&D DuoSet (ELISA de tipo sándwich; n.º DY674; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) para medir IGFBP-2 según las especificaciones del fabricante.

Resultados

Participantes del estudio

- 5 Las características iniciales de los pacientes se presentan en la tabla 1. La edad media de los pacientes fue de 57 ± 12 años (intervalo de 25-87 años); 36% mujeres y 45,1% de raza negra. La mayoría de los pacientes tenían IC con fracción de eyección reducida.

Análisis de correlación

- 10 Los niveles plasmáticos de IGFBP2 no se asociaron con la edad, sexo, raza, etiología, fracción de eyección ventricular izquierda, clase de la NYHA, diabetes mellitus, presión sanguínea sistólica, sodio, β -bloqueantes, antagonista de aldosterona, dispositivo ICD/CRT. Los niveles de IGFBP2 se asociaron positivamente con BNP, creatinina, nitrógeno de urea en sangre, PASP ecocardiográfica y se asociaron negativamente con la hemoglobina, y prescripción de fármacos ACEI y ARB (véase la tabla 2).

Resultados

- 20 Durante un seguimiento medio de $2,8 \pm 1,1$ años (total: 857 paciente-años), 42 pacientes fallecieron, 5 se sometieron a trasplante y 5 recibieron dispositivos de asistencia ventricular, para una tasa total de eventos clínicos del 12% y una tasa anualizada de eventos del 6%. Se registraron las hospitalizaciones por IC y el número de días de hospitalización, así como las visitas al departamento de emergencias por todas las causas menores y específicas por IC. Los pacientes sufrieron 765 ingresos por todas las causas; 278 ingresos (36,3% de todos los ingresos) por IC. Aunque la distribución de IGFBP2 es lognormal, la forma de asociación con los principales eventos clínicos y las hospitalizaciones es lineal (evaluada con polinomios fraccionarios y esplines cúbicos restringidos), por lo que no fue necesaria ninguna transformación para modelar los resultados (Figura 2). Los pacientes con una concentración plasmática de proteína IGFBP2 superior al valor medio (172 ng/ml) sufren significativamente más hospitalizaciones o rehospitalizaciones por IC (Tabla 4). El análisis de la tasa de hospitalización de los pacientes estratificados en cuartiles según su concentración plasmática de proteína IGFBP2 demuestra que existe una tendencia positiva entre la concentración de IGFBP2 y la tasa de hospitalización del paciente y que el paciente en el cuartil más alto tiene una tasa de hospitalización significativamente mayor por todas las causas e insuficiencia cardíaca que los pacientes en el primer o segundo cuartil, figura 3 y figura 4, respectivamente.

- 35 El análisis de una variable reveló una asociación de IGFBP2 con eventos clínicos importantes (HR = 1,22 por cada 100 ng/ml; IC del 95% [1,09- 1,36]; $P < 0,001$) y la tasa de ingresos por todas las causas (IRR=1,12 por cada 100 ng/ml (IC del 95% [1,03- 1,22]; $P=0,007$). El modelo ajustado en el análisis multivariable mostró que el riesgo de eventos clínicos mayores aumentó con el nivel de IGFBP2 (HR = 1,23 por cada 100 ng/ml; IC del 95% [1,06-1,43]; $P=0,005$); y la tasa de ingreso por insuficiencia cardíaca aumentó con el nivel de IGFBP2 (IRR: 1,20 por cada 100 ng/ml; IC del 95% [1,00 a 1,44]; $P=0,05$) (véase la tabla 3). Por lo tanto, IGFBP2 es un marcador pronóstico potente de rehospitalización.

Referencias

- 45 A lo largo de la presente solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

- 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).
- 50 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).
- Paulus WJ, Tschope C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, et al. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. European Heart Journal. 2007;28:2539-50.
- 55 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 determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca asintomática, insuficiencia cardíaca crónica o insuficiencia cardíaca aguda que ya ha sido hospitalizado por una insuficiencia cardíaca asintomática, una insuficiencia cardíaca crónica o una insuficiencia cardíaca aguda es susceptible de ser hospitalizado nuevamente por la misma enfermedad, en donde dicho método comprende medir la concentración de la proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 2 (IGFBP2) en una muestra de sangre, plasma o suero que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método comprende además las etapas de:
- 15 (i) medir la concentración de IGFBP2 en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca,
(ii) comparar la concentración de IGFBP2 medida en la etapa (i) con un valor umbral derivado de la concentración de IGFBP2 en muestras que se han obtenido de pacientes que se encuentran en estadios particulares de la insuficiencia cardíaca y/o con un valor umbral derivado de la concentración de IGFBP2 en muestras que se han obtenido de pacientes sanos.
- 20 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicha muestra se selecciona entre el grupo que consiste en una muestra de sangre o plasma.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde 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 donde la cuantificación del nivel de proteína IGFBP2 se realiza usando un conjunto de anticuerpos dirigidos contra IGFBP2.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la cuantificación del nivel de proteína IGFBP2 se lleva a cabo mediante ELISA.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la cuantificación del nivel de proteína IGFBP2 se lleva a cabo mediante la técnica de electroforesis capilar-espectrometría de masas (EC-EM).
- 35 8. Un método para determinar si un paciente con insuficiencia cardíaca asintomática, insuficiencia cardíaca crónica o insuficiencia cardíaca aguda es susceptible de ser hospitalizado nuevamente por la misma enfermedad, en donde dicho método comprende medir la concentración de IGFBP2 en una muestra de sangre, plasma o suero que se ha obtenido de dicho paciente con insuficiencia cardíaca.
- 40 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho método comprende además las etapas de:
- 45 (i) medir la concentración de IGFBP2 en dicha muestra que se ha obtenido 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 que se han obtenido de pacientes que se encuentran en estadios particulares de la insuficiencia cardíaca y/o con un valor umbral derivado de la concentración de IGFBP2 en muestras obtenidas de pacientes.

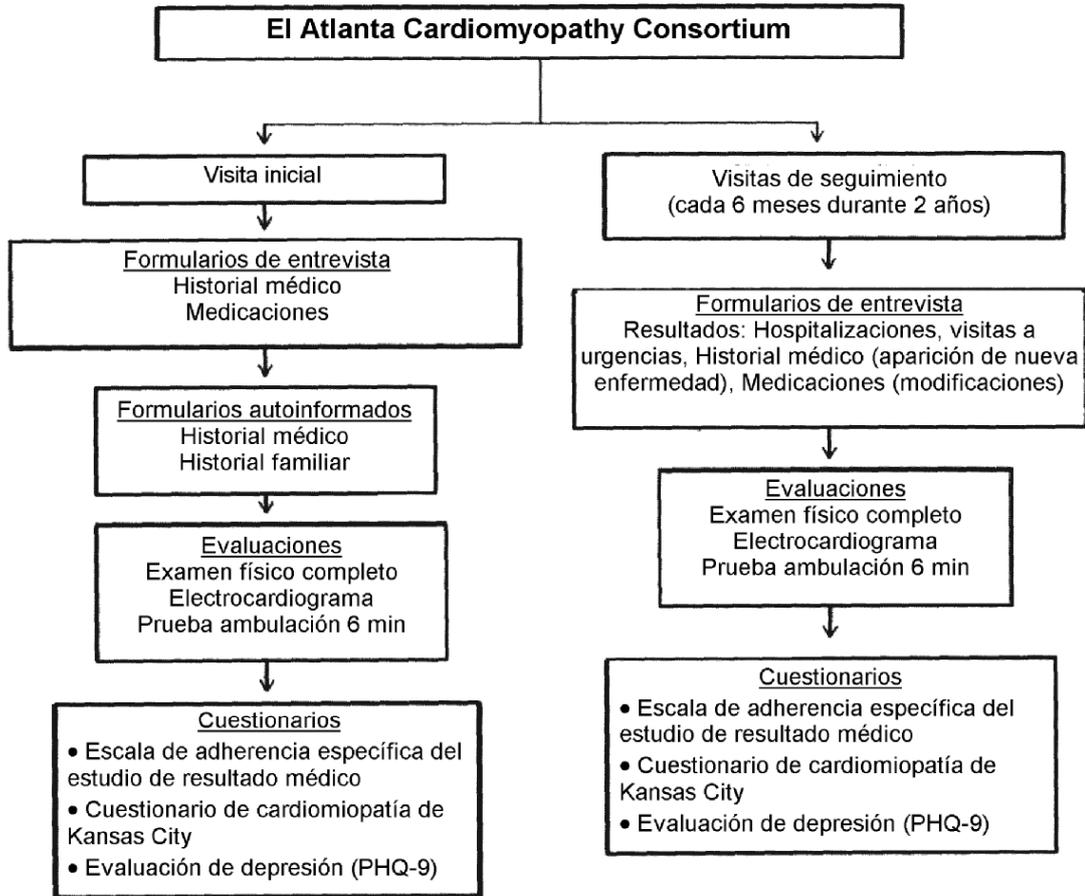


Figura 1

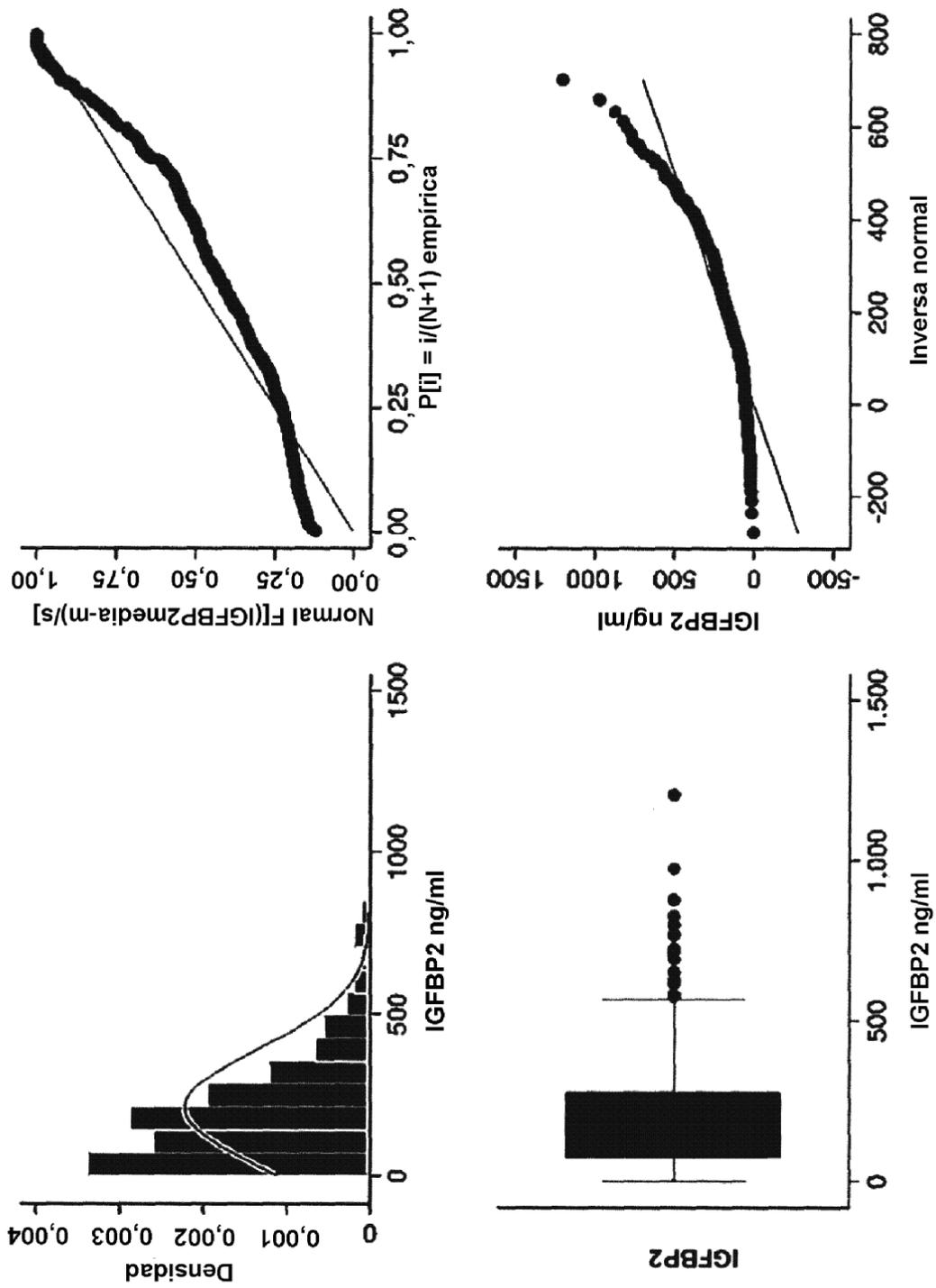
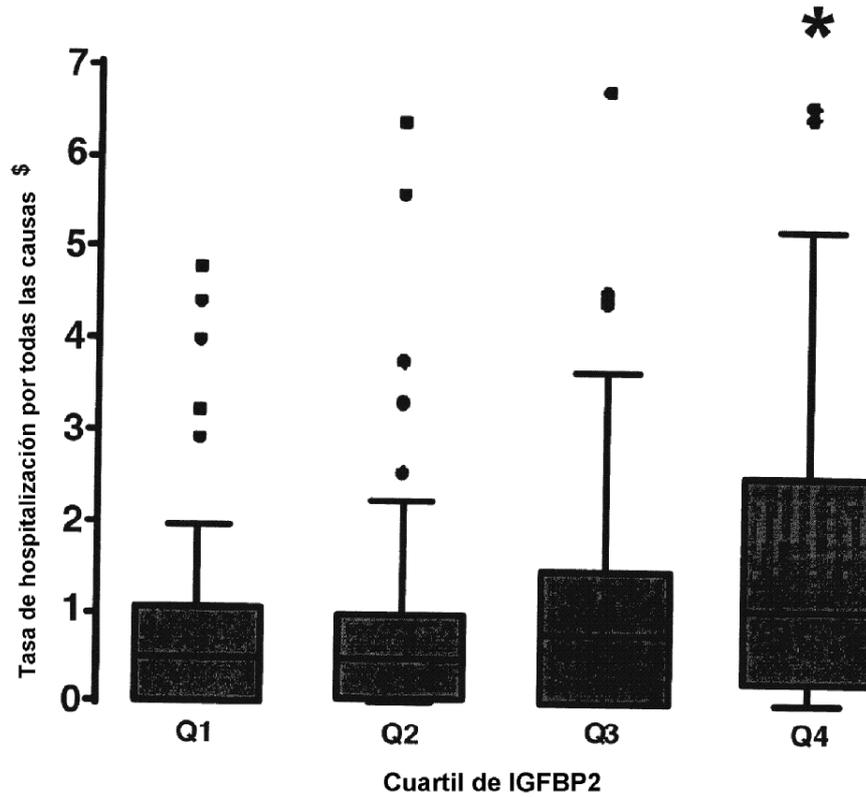


Figura 2

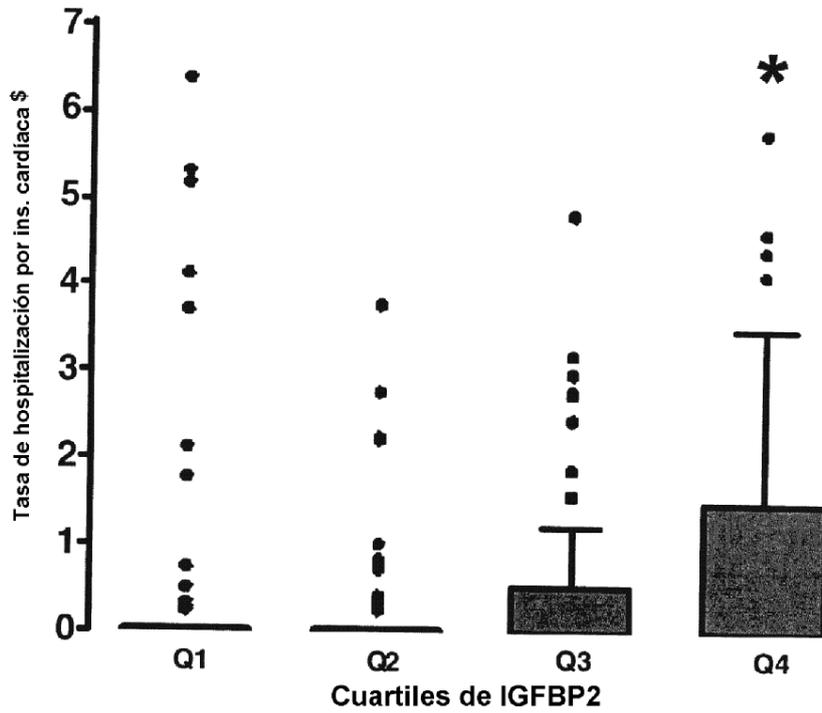


* Prueba de Kruskal Wallis P = 0,0015, comparación post hoc con Q1 y Q2, p<0,05

§ Tasa media anual de hospitalización de pacientes por todas las causas

Cuartiles	Q1	Q2	Q3	Q4	
N	77	76	77	76	
Mediana (ng/ml)	51,5	126,9	213,9	391,8	
(IC del 95%)	(44,7-55,8)	(111,6 - 136,4)	(205,5 - 226,0)	(356,8 - 445,4)	
Límite inferior (ng/ml)	1,8	76,8	174,0	278,4	
Límite superior (ng/ml)	75,9	171,0	274,0	1203,6	
Tasa de hospitalización por todas las causas	Q1	Q2	Q3	Q4	p para tendencia
Mediana	0,48	0,49	0,77	1,07	0,003
(IC del 95%)	(0,25 - 0,66)	(0,25 - 0,65)	(0,51 - 0,95)	(0,48 - 1,70)	

Figura 3



* Prueba de Kruskal Wallis P=0,0018, comparación post hoc con Q1 y Q2 p<0,05

\$ Tasa media anual de hospitalización de pacientes causada por insuficiencia cardíaca

Cuartiles	Q1	Q2	Q3	Q4	
N	77	76	77	76	
Mediana (ng/ml)	51,5	126,9	213,9	391,8	
(IC del 95%)	(44,7 - 55,8)	(111,6 - 136,4)	(205,5 - 226,0)	(356,8 - 445,4)	
Límite inferior (ng/ml)	1,8	76,8	174,0	278,4	
Límite superior (ng/ml)	75,9	171,0	274,0	1203,6	
Tasa hosp. por ins. cardíaca	Q1	Q2	Q3	Q4	p para tendencia
Percentil 75°	0	0	0,48	1,42	0,0003

Figura 4