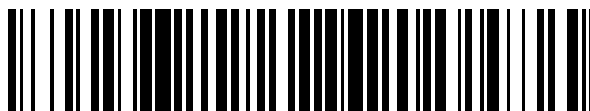


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 232**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/EP2014/055059**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140243**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14710259 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2971077**

54 Título: **Método y composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y la predicción del infarto de miocardio**

30 Prioridad:

**15.03.2013 EP 13305299**

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

**14.11.2019**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris Cédex 13, FR;  
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (25.0%);  
SORBONNE UNIVERSITÉ (25.0%) y  
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (25.0%)**

72 Inventor/es:

**MALLAT, ZIAD;  
TEDGUI, ALAIN;  
SIMON, TABASSOME y  
DANCHIN, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 731 232 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

Método y composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y la predicción del infarto de miocardio

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que sufre un infarto de miocardio o la recurrencia de un infarto de miocardio en un paciente que ha sufrido un infarto de miocardio, que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión de BAFF en una muestra procedente de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado, y iii) proporcionar una buena prognosis del tiempo de supervivencia o un riesgo bajo de recurrencia de un infarto de miocardio cuando el nivel de expresión es menor que el valor de referencia predeterminado, y una mala prognosis del tiempo de supervivencia o un riesgo alto de recurrencia de un infarto de miocardio cuando el nivel de expresión es mayor que el valor de referencia predeterminado.

### Antecedentes de la invención

15 La obstrucción trombotica aguda del flujo sanguíneo en la arteria coronaria precipita el infarto de miocardio. La pérdida de músculo cardíaco en la zona necrótica y la función comprometida del resto de los cardiomiocitos viables de la región perinecrotica inicia una serie de acontecimientos que, si no se les pone freno, con frecuencia conducen a la remodelación adversa de la cámara cardíaca, lo cual precipita la insuficiencia cardíaca. El principal soporte del tratamiento del infarto de miocardio (IM) agudo asocia el rápido restablecimiento de la patencia de la arteria coronaria, mecánicamente o a través de terapias trombolíticas y antiplaquetas, y la administración de agentes que reducen el consumo de oxígeno y descargan el músculo cardíaco. El amplio uso de esta estrategia terapéutica ha conducido a significativas reducciones en la morbilidad y la mortalidad después de un IM agudo [White, H.D. *et al.*, 2008]. No obstante, la carga clínica y social de la enfermedad cardíaca isquémica es inaceptablemente elevada, y la eficacia de otras terapias antitrombóticas a menudo se ve mitigada por el aumento del riesgo de acontecimientos hemorrágicos. Por tanto, se están dirigiendo esfuerzos hacia el establecimiento como diana de otras vías patofisiológicas, en particular las implicadas en la remodelación cardíaca posisquémica [Shah, A.M. *et al.*, 2011].

25 El sistema inmunológico se activa en respuesta al daño miocárdico. Poco tiempo después de la isquemia, el tejido dañado expone ligandos que son reconocidos por los componentes del sistema inmunológico innato, lo cual conduce a su activación. Por ejemplo, las cadenas pesadas de tipo II A y C que no son de miosina se exponen tras lesiones por reperfusión/isquemia y son reconocidas por anticuerpos IgM naturales, lo cual conduce a la activación de la lectina de unión al manano y el complemento de suero, que agrava las lesiones tisulares. La proteína C reactiva ("C-reactive protein", CRP), una proteína de fase aguda de pentraxina corta, también se une al tejido dañado y activa el complemento, lo cual conduce al agravamiento de las lesiones tisulares en un escenario de IM agudo 13. Por contraste, la pentraxina larga 3, una molécula que limita la activación del complemento, desempeña un papel cardioprotector en este escenario. La respuesta inflamatoria aguda también conduce a la movilización y el reclutamiento de células inmunológicas innatas. Pocas horas después del ataque isquémico, los neutrófilos son reclutados activamente hacia el tejido isquémico y contribuyen a la inflamación del tejido y las lesiones cardiovasculares a través de la producción de mediadores inflamatorios, especies de oxígeno reactivas y diversas proteasas [Granger, D.N. *et al.*, 1995; y Vinten-Johansen, J., 2004]. A la ola de infiltración de neutrófilos le sigue la movilización y el reclutamiento de monocitos. Estudios recientes han arrojado nueva luz sobre los mecanismos del reclutamiento y ciclo de vida de monocitos en un escenario de IM agudo, y sugieren unos papeles patogénicos o protectores diferenciados para los monocitos Ly6Chi y Ly6Clo, respectivamente, en la remodelación cardíaca y la conservación de la función cardíaca [Nahrendorf, M., *et al.*, 2007; y Leuschner, F., *et al.*, 2012]. A pesar de este aumento en el conocimiento, la utilidad de establecer como diana a la respuesta inmunológica en este escenario sigue siendo dudosa, tal como revela la falta de eficacia de la inhibición del complemento en pacientes con IM agudo [Mahaffey, K.W., *et al.*, 2003; Granger, C.B., *et al.*, 2003; Armstrong, P.W., *et al.*, 2007; y Eikelboom, J.W. *et al.*, 2007]. Así, es necesaria una mejor caracterización de los determinantes de la respuesta inmunológica después de lesiones isquémicas y los mecanismos por los cuales contribuyen a las lesiones del tejido para rellenar el hueco existente en el conocimiento que limita la traducción clínica y el diseño de estrategias terapéuticas eficaces para un uso futuro en seres humanos.

50 La técnica anterior ofrece información acerca de BAFF. Por ejemplo, Kahn *et al.*, 2008, indican que el bloqueo de BAFF puede usarse para prevenir o tratar el síndrome antifosfolípidos en un modelo de ratón. Además, la solicitud de patente WO20055042009 indica el uso de antagonistas de BAFF para el tratamiento de trastornos inmunológicos.

### Sumario de la invención

55 En la presente, los inventores estudian las interacciones entre los linfocitos B maduros y otras células mieloides innatas en un escenario de lesiones isquémicas. Han demostrado, en una cohorte de 1000 pacientes ingresados con un infarto de miocardio agudo, que el nivel de BAFF en la circulación es elevado y está asociado con un resultado cardiovascular adverso. Además, han demostrado que la inhibición de la señalización de BAFF dificulta la movilización de monocitos y mejora la función cardíaca después de un infarto de miocardio agudo.

Así, la presente invención se refiere a un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que sufre un infarto de miocardio o la recurrencia de un infarto de miocardio en un paciente que ha sufrido un infarto de miocardio, que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión de BAFF en una muestra procedente de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado, y iii) proporcionar una buena prognosis del tiempo de supervivencia o un riesgo bajo de recurrencia de un infarto de miocardio cuando el nivel de expresión es menor que el valor de referencia predeterminado, y una mala prognosis del tiempo de supervivencia o un riesgo alto de recurrencia de un infarto de miocardio cuando el nivel de expresión es mayor que el valor de referencia predeterminado.

La invención también describe un compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R para su uso en la mejora de la función cardíaca.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones:

A lo largo de esta memoria descriptiva se emplean varios términos y expresiones que se definen en los siguientes párrafos.

#### Método de pronóstico

La invención se refiere a un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que sufre un infarto de miocardio o la recurrencia de un infarto de miocardio en un paciente que ha sufrido un infarto de miocardio, que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión de BAFF en una muestra procedente de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado, y iii) proporcionar una buena prognosis del tiempo de supervivencia o un riesgo bajo de recurrencia de un infarto de miocardio cuando el nivel de expresión es menor que el valor de referencia predeterminado, y una mala prognosis del tiempo de supervivencia o un riesgo alto de recurrencia de un infarto de miocardio cuando el nivel de expresión es mayor que el valor de referencia predeterminado.

En una realización, el infarto de miocardio puede ser un infarto de miocardio agudo.

Generalmente, la muestra según la invención puede ser sangre, plasma, suero, linfa y tejido cardíaco.

Tal como se emplea en la presente, el término "BAFF" (factor activador de células B), también conocido como BlyS (estimulador de linfocitos B, "B lymphocyte stimulator") tiene el significado general que se le da en la técnica, e indica una citoquina que pertenece a la familia de ligandos del factor de necrosis tumoral ("tumor necrosis factor", TNF). Esta citoquina es un ligando para tres receptores: TNFRSF13B/TACI, TNFRSF17/BCMA, y TNFRSF13C/BAFF-R (véase, por ejemplo, Cancro P. Michael *et al.*, 2009). Esta citoquina se expresa en células del linaje de células B mieloides y linfoides, y actúa como un potente activador de células B. También se ha demostrado que desempeña un papel importante en la proliferación y la diferenciación de células B. Un ejemplo de secuencia para la proteína BAFF humana está depositado en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot con el número de registro Q9Y275.

Tal como se emplea en la presente, el término "paciente" indica un ser humano afectado o que es probable que se vea afectado por un infarto de miocardio, en particular un infarto de miocardio agudo.

En una realización, el paciente es un paciente no lúpico. Según la invención, un "paciente no lúpico" indica un paciente que no está afectado de un lupus, pero que está afectado o que es probable que se vea afectado por un infarto de miocardio, y en particular por un infarto de miocardio agudo.

Por tanto, en una realización particular, la invención se refiere a un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente no lúpico que sufre un infarto de miocardio o la recurrencia de un infarto de miocardio en un paciente no lúpico que ha sufrido un infarto de miocardio, que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión de BAFF en una muestra procedente de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado, y iii) proporcionar una buena prognosis del tiempo de supervivencia o un riesgo bajo de recurrencia de un infarto de miocardio cuando el nivel de expresión es menor que el valor de referencia predeterminado, y una mala prognosis del tiempo de supervivencia o un riesgo alto de recurrencia de un infarto de miocardio cuando el nivel de expresión es mayor que el valor de referencia predeterminado.

La expresión "determinar el nivel de expresión de BAFF", tal como se empleó anteriormente, incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (medir los niveles) con o sin referencia a un control. Generalmente, la expresión de BAFF puede medirse, por ejemplo, mediante RT-PCR, inmunohistoquímica o ELISA realizados con la muestra.

El "control" o el "valor de referencia" pueden ser un sujeto sano, es decir, un sujeto que no sufre ningún infarto de miocardio. El control también puede ser un sujeto que sufre un infarto de miocardio. Preferiblemente, dicho control es un sujeto sano.

Por ejemplo, la determinación del nivel de expresión de BAFF en una muestra puede realizarse midiendo el nivel de expresión del gen de BAFF.

5 Generalmente, la detección comprende poner en contacto la muestra con reactivos selectivos, tales como sondas, cebadores o ligandos y, con ello, detectar la presencia o medir el aumento de polipéptidos o ácidos nucleicos de interés originariamente presentes en la muestra. El contacto puede realizarse en cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, una placa de microtitulación, un tubo de ensayo, un pocillo, un vaso, una columna... En realizaciones específicas, el contacto se realiza sobre un sustrato revestido con el reactivo, tal como una matriz de ácidos nucleicos o una matriz de ligandos específicos. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semisólido, tal como cualquier soporte adecuado que comprenda vidrio, plástico, nailon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede tener diversas formas y tamaños, tales como un portaobjetos, una membrana, una esfera, una columna, un gel, etc. El contacto puede realizarse bajo cualquier condición adecuada para un complejo detectable, tal como un híbrido de ácido nucleico o un complejo de anticuerpo-antígeno, que se forma entre el reactivo y los ácidos nucleicos o los polipéptidos de la muestra.

10 En una realización particular, el nivel de expresión del gen de BAFF puede determinarse determinando la cantidad del ARNm del gen de BAFF. Este método puede ser adecuado para medir el nivel de expresión del gen de BAFF en la muestra.

15 Los métodos para medir la cantidad de un ARNm son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras (por ejemplo, células o tejido preparado a partir del paciente) primero se extrae según métodos convencionales, por ejemplo, usando enzimas líticas o disoluciones químicas, o se extrae mediante resinas de unión a ácidos nucleicos, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído después puede detectarse mediante hibridación (por ejemplo, análisis de la transferencia Northern).

20 Como alternativa, el ARNm extraído puede someterse a una transcripción inversa y amplificación acopladas, tales como una transcripción inversa y amplificación mediante la reacción en cadena con polimerasa (RT-PCR), usando cebadores oligonucleotídicos específicos que permiten la amplificación de una región en el gen de BAFF. Preferiblemente se emplea una RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa. La RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa a tiempo real resulta particularmente ventajosa. El ARNm extraído puede someterse a transcripción inversa y amplificarse, tras lo cual las secuencias amplificadas pueden detectarse mediante hibridación con una sonda adecuada o mediante secuenciación directa, o mediante cualquier otro método apropiado conocido en la técnica.

25 Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena con ligasa ("ligase chain reaction", LCR), la amplificación mediada por transcripción ("transcription-mediated amplification", TMA), la amplificación por desplazamiento de hebra ("strand displacement amplification", SDA) y la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico ("nucleic acid sequence based amplification", NASBA).

30 Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que muestran complementariedad u homología de secuencia con el ARNm de interés en la presente son útiles como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que no es necesario que dichos ácidos nucleicos sean idénticos, sino que generalmente son al menos aproximadamente 80% idénticos a una región homóloga de tamaño comparable, al menos 85% idénticos y aún más preferiblemente el menos 90%, preferiblemente al menos 95% idénticos. En ciertas realizaciones, será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación. En la técnica se conoce una amplia diversidad de indicadores apropiados, que incluyen ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos (por ejemplo, avidina/biotina).

35 Las sondas generalmente comprenden ácidos nucleicos monocatenarios con una longitud de entre 10 a 1000 nucleótidos, por ejemplo, de entre 10 y 800, más preferiblemente de entre 15 y 700, generalmente de entre 20 y 500 nucleótidos. Los cebadores generalmente son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos con una longitud de entre 10 a 25 nucleótidos, diseñados para que se emparejen perfectamente o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés que se va a amplificar. Las sondas y los cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos con los que se hibridan, es decir, se hibridan preferiblemente bajo condiciones de hibridación de alta rigurosidad (que se corresponden con la temperatura de fusión más alta  $T_m$ , por ejemplo, formamida al 50%, 5x o 6x SCC; SCC es NaCl 0,15 M, Na-citrato 0,015 M).

40 En una realización particular, el método de la invención comprende las etapas de proporcionar ARN totales obtenidos a partir de la muestra del paciente, y someter los ARN a una amplificación e hibridación con sondas específicas, más en concreto por medio de una RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa.

45 Los ARN totales pueden extraerse con facilidad de la muestra. Por ejemplo, la muestra puede tratarse antes de su uso, por ejemplo, para hacer que los ácidos nucleicos estén disponibles. Las técnicas de lisis de células o proteínas y de concentración o dilución de ácidos nucleicos son muy conocidas por los expertos en la técnica.

50 En otra realización, el nivel de expresión del gen de BAFF puede medirse mediante análisis de micromatrices de ADN. Dicha micromatriz de ADN o micromatriz de ácidos nucleicos consiste en diferentes sondas de ácidos nucleicos que se unen químicamente a un sustrato que pueden ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una

microesfera. Un microchip puede estar constituido de polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos o nitrocelulosa. Las sondas comprenden ácidos nucleicos, tales como ADNc u oligonucleótidos que pueden tener de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 pares de bases. Para medir el nivel de expresión del gen de BAFF, una muestra procedente de un sujeto de ensayo, que primero se ha sometido opcionalmente a una transcripción inversa, se marca y se pone en contacto con la micromatriz en condiciones de hibridación, que conducen a la formación de complejos entre los ácidos nucleicos diana que son complementarios con las secuencias de las sondas unidas a la superficie de la micromatriz. Los complejos hibridados marcados después se detectan y pueden cuantificarse o semicuantificarse. El marcaje puede lograrse mediante diversos métodos, por ejemplo, usando el marcaje radiactivo o fluorescente. Están disponibles muchas variantes de la tecnología de hibridación de micromatrices para los expertos en la técnica (véase, preferiblemente, el análisis de Hoheisel, Nature Reviews, Genetics, 2006, 7:200-210).

La detección de la expresión de BAFF en la muestra también puede realizarse midiendo el nivel de la proteína de BAFF. En la presente solicitud, el "nivel de la proteína de BAFF" significa la cantidad o la concentración de dicha proteína de BAFF o la cantidad de células que expresan BAFF.

Estos métodos comprenden poner en contacto una muestra con un compañero de unión capaz de interactuar selectivamente con la proteína de BAFF presente en la muestra. El compañero de unión en general es un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal.

La presencia de la proteína puede detectarse usando técnicas electroforéticas y de inmunodiagnóstico convencionales, que incluyen inmunoensayos, tales como ensayos de competición, de reacción directa o de tipo "sandwich". Estos ensayos incluyen, pero no se limitan a transferencias Western; ensayos de aglutinación; inmunoensayos mediados y marcados por enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación, etc. Las reacciones en general incluyen revelar marcadores, tales como marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivos, enzimáticos o moléculas de tinte u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos que reaccionan con él. Más preferiblemente, la determinación de las concentraciones de BAFF se realiza con un clasificador de células activado por fluorescencia ("fluorescence-activated cell sorter", FACS). Dicho clasificador de células activado por fluorescencia es una máquina que puede separar con rapidez las células en una suspensión basándose en el tamaño y el color de su fluorescencia.

Los ensayos mencionados anteriormente en general implican la separación de la proteína no unida en una fase líquida del soporte en fase sólida al cual están unidos los complejos de 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 pocillo de microtitulación); poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, esferas o placas de microtitulación); poli(fluoruro de vinilidino); papel diazotizado; membranas de nailon; esferas activadas, esferas que responden al magnetismo y similares.

Más en concreto, puede usarse un método ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación se revisten con un conjunto de anticuerpos contra las proteínas que se están ensayando. Después se añade una muestra que contiene o que se sospecha que contiene la proteína marcadora a los pocillos revestidos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de los complejos de anticuerpo-antígeno, la placa o placas pueden lavarse para retirar los restos no unidos y se añade una molécula de unión secundaria marcada de modo detectable. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de la muestra capturada, la placa se lava y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando métodos conocidos en la técnica.

Un método concreto preferido utiliza la inmunohistoquímica, un método de tinción basado en reacciones inmunoenzimáticas que emplea anticuerpos monoclonales o policlonales para detectar células o proteínas específicas, tales como antígenos de tejidos. Generalmente, los protocolos de la inmunohistoquímica implican al menos algunas de las siguientes etapas:

- 1) obtención del antígeno (por ejemplo, mediante cocción a presión, tratamiento con proteasas, microondas, calentamiento en tampones apropiados, etc.);
- 2) aplicación de un anticuerpo primario (concretamente, un anticuerpo antiproteína de BAFF) y lavado;
- 3) aplicación de un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo primario (a menudo un segundo anticuerpo conjugado que permite la detección en la etapa 5) y lavado;
- 4) puede incluirse una etapa de amplificación;
- 5) aplicación de un reactivo de detección (por ejemplo, cromógeno, molécula marcada con fluorescencia o cualquier molécula que tenga un intervalo dinámico apropiado para lograr el nivel de sensibilidad requerido para el ensayo);
- 6) puede usarse una contratinción; y

7) detección usando un sistema de detección que hace visible la presencia de las proteínas (al ojo humano o mediante un sistema de análisis automático) para los análisis cualitativos o cuantitativos.

En la técnica se conocen diversos métodos de tinción inmunoenzimática para detectar una proteína de interés. Por ejemplo, las interacciones inmunoenzimáticas pueden visualizarse usando diferentes enzimas, tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, o diferentes cromógenos, tales como DAB, AEC, o rojo Fast; o marcadores fluorescentes, tales como FITC, Cy3, Cy5, Cy7, Alexafluors, etc. Los contratintes pueden incluir H&E, DAPI, Hoechst, con la condición de que dichos tintes sean compatibles con otros reactivos de detección y con la estrategia de visualización empleada. Tal como se conoce en la técnica, pueden usarse reactivos de amplificación para intensificar la señal de tinción. Por ejemplo, pueden usarse reactivos de tiramida. Los métodos de tinción de la presente invención pueden lograrse usando cualquier método o sistema adecuado, tal como será evidente para los expertos en la técnica, incluyendo sistemas automáticos, semiautomáticos o manuales.

El método de la invención comprende una etapa que consiste en comparar la expresión de BAFF con un valor de referencia o una referencia control.

Los valores de referencia predeterminados usados para la comparación pueden consistir en valores de "corte" que pueden determinarse como se describe a continuación. El valor de referencia ("corte") para la expresión de BAFF puede determinarse llevando a cabo un método que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una colección de muestras procedentes de pacientes que sufren un infarto de miocardio;
- b) determinar el nivel de expresión de BAFF para cada muestra contenida en la colección proporcionada en la etapa a);
- c) clasificar las muestras según dicho nivel de expresión;
- d) clasificar dichas muestras en subconjuntos de número creciente, respectivamente decreciente, de miembros clasificados según su nivel de expresión,
- e) proporcionar, para cada muestra proporcionada en el etapa a), información relacionada con el resultado clínico real del correspondiente paciente (concretamente, el tiempo de supervivencia de un paciente que sufre un infarto de miocardio o la recurrencia de un infarto de miocardio o ambos);
- f) para cada pareja de subconjuntos de muestras, obtener un porcentaje de la curva de supervivencia de Kaplan Meier;
- g) para cada subconjunto de muestras, calcular la significancia estadística (valor de p) entre ambos subconjuntos;
- h) seleccionar, como valor de referencia para el nivel de expresión, el valor del nivel de expresión para el cual el valor de p es el más pequeño.

Puede construirse un intervalo de confianza alrededor del valor del nivel de expresión obtenido de este modo, por ejemplo  $\pm 5$  o 10%.

Por ejemplo, el nivel de expresión de BAFF se ha evaluado para 100 muestras de 100 pacientes. Las 100 muestras se clasifican según el nivel de expresión de BAFF. La muestra 1 tiene el nivel de expresión más elevado, y la muestra 100 tiene el nivel de expresión más bajo. Un primer agrupamiento proporciona dos subconjuntos: por un lado la muestra n.º 1, y por el otro lado las 99 muestras restantes. El siguiente agrupamiento proporciona por un lado las muestras 1 y 2, y por el otro lado las 98 muestras restantes, etc., hasta el último agrupamiento: por un lado las muestras 1 a 99 y por el otro lado la muestra n.º 100. Según la información relacionada con el resultado clínico real para el correspondiente paciente, se preparan curvas de Kaplan Meier para cada uno de los 99 grupos de dos subconjuntos. También se calcula, para cada uno de los 99 grupos, el valor de p entre ambos subconjuntos.

Se selecciona el valor de referencia de modo que la discriminación basada en el criterio del valor de p mínimo sea la más potente. En otras palabras, el nivel de expresión que se corresponde con el límite entre ambos subconjuntos para el cual el valor de p es mínimo se considera el valor de referencia. Debe advertirse que, según los experimentos realizados por los inventores, el valor de referencia no es necesariamente el valor de la mediana de los niveles de expresión.

En el trabajo habitual, el valor de referencia (valor de corte) puede usarse en el presente método para discriminar muestras y, por tanto, los correspondientes pacientes.

Las curvas de Kaplan-Meier de porcentaje de supervivencia como función del tiempo se emplean habitualmente para medir la fracción de pacientes que viven durante una cierta cantidad de tiempo después del tratamiento y son muy conocidas por los expertos en la técnica. El valor de p se emplea de modo convencional en los ensayos de significancia estadística.

Los expertos en la técnica también entienden que la misma técnica de evaluación del nivel de expresión de BAFF

debe usarse preferiblemente para obtener el valor de referencia y después para evaluar el nivel de expresión de BAFF de un paciente sometido al método de la invención.

Si por ejemplo, el nivel de expresión de BAFF es mayor que el valor de referencia, se considera que el paciente presenta una mala prognosis del tiempo de supervivencia o que tiene un alto riesgo de recurrencia de un infarto de miocardio. De modo similar, si el nivel de expresión de BAFF es menor que el valor de referencia, se considera que el paciente presenta una buena prognosis del tiempo de supervivencia o que tiene un bajo riesgo de recurrencia de un infarto de miocardio.

El escenario de un único valor de "corte" permite la discriminación entre una mala y una buena prognosis con respecto al tiempo de supervivencia, y un riesgo bajo y un riesgo alto de recurrencia de un infarto de miocardio para un paciente. En la práctica, en general se obtienen unos altos valores de significancia estadística (por ejemplo, valores de p bajos) para un intervalo de valores de cuantificación arbitrarios sucesivos, y no solo para un único valor de cuantificación arbitrario. Así, en una realización alternativa de la invención, en lugar de usar un valor de referencia definido, se proporciona un intervalo de valores.

Por tanto, se indica de modo arbitrario un valor de significancia estadística mínimo (umbral mínimo de significancia, por ejemplo, valor de p umbral máximo) y se conserva un intervalo de una pluralidad de valores de cuantificación arbitrarios para los cuales el valor de significancia estadística calculado en la etapa g) es mayor (más significativo, por ejemplo, valor de p menor), de modo que se proporciona un intervalo de valores de cuantificación. Este intervalo de valores de cuantificación incluye un valor de "corte" como se describió anteriormente. Según esta realización específica de un valor de "corte", puede determinar una mala prognosis, una buena prognosis o la recurrencia comparando el nivel de expresión con el intervalo de valores que se identifican. En ciertas realizaciones, un valor de corte consiste por tanto en un intervalo de valores de cuantificación, por ejemplo, centrados en el valor de cuantificación para el cual se halla el valor de significancia estadística más alto (por ejemplo, en general el valor de p mínimo que se halla). Por ejemplo, en una escala hipotética de 1 a 10, si el valor de corte ideal (el valor con la significancia estadística más alta) es 5, un intervalo adecuado (ejemplo) puede ser de 4-6.

Por tanto, un paciente puede evaluarse comparando los valores obtenidos midiendo el nivel de expresión de BAFF, en los que los valores menores que 5 revelan una buena prognosis y los valores mayores que 5 revelan una mala prognosis. En otra realización, un paciente puede evaluarse comparando los valores obtenidos midiendo el nivel de expresión de BAFF y comparando los valores en una escala, en la que los valores por debajo del intervalo de 4-6 indican una buena prognosis y los valores por encima del intervalo de 4-6 indican una mala prognosis, y los valores que se encuentran dentro del intervalo de 4-6 indican una prognosis intermedia.

En una realización concreta, el método de la invención comprende etapas de comparación que incluyen una clasificación de los valores de cuantificación medidos para el nivel de expresión de BAFF en dos posibilidades, respectivamente: (i) una primera posibilidad, cuando el valor de cuantificación para el nivel de expresión es mayor que el correspondiente valor de referencia predeterminado (la primera posibilidad se denomina "Hi", por ejemplo), y (ii) una segunda posibilidad, cuando el valor de cuantificación para el nivel de expresión es menor que el correspondiente valor de referencia predeterminado (la segunda posibilidad se denomina "Lo", por ejemplo).

Tal como se emplea en la presente, "el nivel de expresión de BAFF" se refiere a una cantidad o una concentración de un producto de la transcripción, por ejemplo, ARNm que codifica BAFF, o de un producto de la traducción, por ejemplo, la proteína de BAFF, o de un porcentaje de células que expresan BAFF o del promedio de intensidad de fluorescencia de BAFF (mediante FACS). Generalmente, un nivel de expresión de ARNm puede expresarse en unidades, tales como transcritos por célula o nanogramos por microgramo de tejido. El nivel de un polipéptido 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 un nivel de expresión.

En una realización particular, cuando la medición de la proteína de BAFF se realiza mediante ELISA, el nivel de expresión de BAFF en un paciente con una mala prognosis del tiempo de supervivencia o con alto riesgo de recurrencia de un infarto de miocardio aumenta en al menos 35%, preferiblemente en al menos 40%, preferiblemente en al menos 50%, preferiblemente en al menos 60%, preferiblemente en al menos 70%, preferiblemente en al menos 80%, más preferiblemente en al menos 90%, aún más preferiblemente en al menos 100% comparado con una referencia control. En otras palabras, preferiblemente, cuando la expresión de BAFF se mide mediante ELISA, la cantidad de la proteína de BAFF en un paciente con una mala prognosis del tiempo de supervivencia o con alto riesgo de recurrencia de un infarto de miocardio aumenta en al menos 35%, preferiblemente en al menos 40%, preferiblemente en al menos 50%, preferiblemente en al menos 60%, preferiblemente en al menos 70%, preferiblemente en al menos 80%, más preferiblemente en al menos 90%, aún más preferiblemente en al menos 100% comparado con una referencia control.

Según la invención, los inventores han establecido tres tercillos útiles para clasificar pacientes. Los pacientes en los tercillos 2 o 3 presentan un mayor riesgo de morir por infarto de miocardio o presentan un mayor riesgo de sufrir un infarto de miocardio recurrente (véase el ejemplo 1).

La presente invención también se refiere a kits para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que sufre un

infarto de miocardio o la recurrencia de un infarto de miocardio en un paciente que ha sufrido un infarto de miocardio, que comprenden un medio para detectar la expresión de BAFF.

Según la invención, los kits de la invención pueden comprender un anticuerpo antiproteína de BAFF, y otra molécula acoplada con un sistema de señalización que se une a dicho anticuerpo antiproteína de BAFF.

- 5 Generalmente, los anticuerpos o la combinación de anticuerpos están en forma de disoluciones listas para usar. En una realización, el kit comprende recipientes con las disoluciones listas para usar. Cualquier otra forma está incluida en la presente invención, y los expertos en la técnica pueden adaptar con facilidad la forma al uso en inmunohistoquímica.

- 10 La presente invención también se refiere a un gen o una proteína de BAFF como biomarcador para la predicción del tiempo de supervivencia de un paciente que sufre un infarto de miocardio o la recurrencia de un infarto de miocardio en un paciente que ha sufrido un infarto de miocardio.

En otra realización, la invención se refiere a un método *in vitro* para controlar la respuesta de un paciente a un tratamiento del infarto de miocardio, que comprende una etapa de medir el nivel de expresión de un gen de BAFF, o una etapa de medir el nivel de una proteína de BAFF, en una muestra procedente de un paciente.

- 15 Así, la presente invención se refiere al uso de un gen o una proteína de BAFF como biomarcador para el control de terapias antiinfarto de miocardio.

Según la invención, puede determinarse el nivel de expresión de un gen de BAFF o el nivel de una proteína de BAFF para controlar la respuesta de un paciente a un tratamiento del infarto de miocardio.

#### *Compuestos y sus usos*

- 20 Un segundo objeto de la invención se refiere a un anticuerpo o un aptámero que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un ARNip, una ribozima o un ARNhp que inhibe la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R, para su uso en un método para tratar un paciente que se considerado que presenta una mala prognosis para el tiempo de supervivencia o un alto riesgo de recurrencia de un infarto de miocardio según el método descrito anteriormente.

- 25 Tal como se emplea en la presente, la expresión "mejora de la función cardíaca" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una mejora en la función/actuación cardíaca que se caracteriza por una mejora significativa en la remodelación ventricular posisquémica (que incluye tamaño/dimensiones, forma/geometría y estructura de los ventrículos) y la función miocárdica en sístole (como fracción de eyección) y/o diástole (como relajación o aceptación).

- 30 En una realización, la invención indica que el compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R puede usarse en la mejora de la función cardíaca después de un infarto de miocardio o un infarto de miocardio agudo.

- 35 En otra realización, la invención indica que el compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o el compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R puede ser útil para la mejora de la función cardíaca y, por tanto, para la mejora de la función cardíaca después de un infarto de miocardio o un infarto de miocardio agudo en un paciente no lúpico.

Así, la invención también describe un compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R para su uso en la mejora de la función cardíaca en un paciente no lúpico.

- 40 Tal como se emplea en la presente, el término "TACI" (interactor del ligando de ciclofilina y modulador de calcio y activador transmembrana) tiene su significado general en la técnica, y se refiere a una proteína de receptor transmembrana que se encuentra predominantemente en la superficie de células B, que son una parte importante del sistema inmunológico. El TACI es un miembro específico de linfocitos de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF).

- 45 Tal como se emplea en la presente, la expresión "BCMA" ("B cell maturation antigen", antígeno de maduración de células B) tiene su significado general en la técnica y se refiere a un miembro de la superfamilia de TNFR expresado sobre células B.

Tal como se emplea en la presente, el término "BAFF-R" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un receptor expresado sobre todas las células B maduras.

- 50 En una realización particular, la invención indica que el compuesto según la invención inhibe la unión de BAFF a TACI.

En una realización particular, la invención indica que el compuesto según la invención inhibe la unión de BAFF a



BCMA.

En una realización particular, la invención indica que el compuesto según la invención inhibe la unión de BAFF a BAFF-R.

5 En una realización particular, la invención indica que el compuesto según la invención es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF.

En una realización particular, la invención indica que el compuesto según la invención es un inhibidor de la expresión del gen de TACI.

En una realización particular, la invención indica que el compuesto según la invención es un inhibidor de la expresión del gen de BCMA.

10 En una realización particular, la invención indica que el compuesto según la invención es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF-R.

En otra realización particular, la invención indica que el compuesto según la invención es un inhibidor de la vía de señalización de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R.

15 En una realización particular, la invención indica que el compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R puede usarse para el tratamiento del infarto de miocardio.

En una realización, el infarto de miocardio es un infarto de miocardio agudo.

20 En una realización, la invención indica que el compuesto según la invención puede unirse a o BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R y bloquear la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R y bloquear sus efectos fisiológicos, es decir, su efecto sobre la movilización o la infiltración de monocitos. Para identificar un compuesto capaz de bloquear la interacción entre BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R, puede usarse un ensayo. Por ejemplo, el compuesto que se va a ensayar compete con la unión de BAFF marcado con un fluorocromo (tal como isotiocianato de fluoresceína) en líneas celulares transfectadas con TACI, BCMA o BAFF-R. La inhibición de la unión después se analizará mediante citometría de flujo.

25 Tal como se emplea en la presente, la expresión "inhibidor de la vía de señalización" indica un compuesto que bloquea la cascada de señalización de un receptor, es decir, la activación de las moléculas implicadas en esa vía.

Generalmente, la invención indica que el compuesto según la invención incluye, pero no se limita a una molécula orgánica pequeña, un anticuerpo y un polipéptido.

30 En una realización, la invención indica que el compuesto según la invención puede ser un compuesto de peso molecular bajo (por ejemplo, una molécula orgánica pequeña (natural o no natural)).

35 La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula (natural o no natural) de un tamaño comparable al de las moléculas orgánicas que se emplean en general en los productos farmacéuticos. La expresión excluye las macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Ciertas moléculas orgánicas pequeñas concretas varían en tamaño hasta aproximadamente 10000 Da, más preferiblemente hasta 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.

40 En una realización, el compuesto según la invención es un anticuerpo. Pueden generarse anticuerpos dirigidos contra BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R según métodos conocidos, mediante la administración del antígeno o epitopo apropiado a un animal hospedante seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Pueden usarse diversos adyuvantes conocidos en la técnica para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Pueden prepararse y aislarse anticuerpos monoclonales contra BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R empleando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por medio de líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, pero no se limitan a la técnica del hibridoma, descrita originariamente por Kohler y Milstein (1975); la técnica del hibridoma de células B humanas (Cote *et al.*, 1983); y la técnica del EBV-hibridoma (Cole *et al.*, 1985). Como alternativa, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.946.778) para producir anticuerpos monocatenarios anti-BAFF, anti-TACI, anti-BCMA o anti-BAFF-R. Los compuestos útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos de anticuerpos anti-BAFF, anti-TACI, anti-BCMA o anti-BAFF-R que incluyen, pero no se limitan a fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que pueden generarse mediante la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Como alternativa, pueden construirse bancos de expresión de Fab y/o scFv para permitir la identificación rápida de fragmentos que tienen la especificidad deseada por BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R.

También pueden prepararse anticuerpos anti-BAFF, anti-TACI, anti-BCMA o anti-BAFF-R humanizados y fragmentos de anticuerpo procedentes de estos según técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, de roedor) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son  
 5 inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que ciertos restos de una región hipervariable (CDR) del receptor son reemplazados por restos procedentes de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, una rata, un conejo o un primate no humano, que tenga la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, ciertos restos de la región de marco ("framework region", FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes restos no humanos. Además, los  
 10 anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para afinar aún más la actuación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y generalmente dos dominios variables, en lo que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas de las FR son las de una secuencia de  
 15 inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la de una inmunoglobulina humana. Los métodos para fabricar anticuerpos humanizados son descritos, por ejemplo, por Winter (la patente de EE. UU. n.º 5.225.539) y Boss (Celltech, la patente de EE. UU. n.º 4.816.397).

Después, para esta invención, se seleccionan los anticuerpos neutralizantes de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R.

20 En una realización, el compuesto según la invención es un anticuerpo anti-BAFF.

En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser belimumab (véase, por ejemplo, Espinosa G. *et al.*, 2010; o Liu Zheng *et al.*, 2011).

En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según Scholz L. Jean *et al.*, 2008.

25 En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser LY2127399 (véase, por ejemplo, Davidson A 2010).

En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según la solicitud de patente WO0043032.

30 En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según la solicitud de patente WO2006025345.

En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según la solicitud de patente WO2006025345.

En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según la solicitud de patente CN101851291.

35 En otra realización, el compuesto según la invención es un anticuerpo anti-TACI.

En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según la solicitud de patente WO02066516.

En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según la solicitud de patente WO2004011611.

40 En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según la solicitud de patente WO0160397.

En otra realización, el compuesto según la invención es un anticuerpo anti-BCMA.

En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según la solicitud de patente WO02066516.

45 En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según la solicitud de patente WO0124811.

En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según la solicitud de patente WO0160397.

En otra realización, el compuesto según la invención es un anticuerpo anti-BAFF-R.

50 En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según Ramanujam Meera *et*

*al.*, 2006.

En una realización particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo según Rauch Melanie *et al.*, 2009.

5 En una realización, el compuesto según la invención es un aptámero. Los aptámeros son una clase de moléculas que representan una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad para reconocer casi cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Estos ligandos pueden aislarse a través de la evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial ("Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment", SELEX) de un banco de secuencia aleatorias, según se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. El banco de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En este banco, cada miembro es un oligómero lineal, que acaba siendo químicamente modificado, de una secuencia exclusiva. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se ha analizado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros de péptidos consisten en una región variable de anticuerpo restringida conformacionalmente mostrada por una proteína de plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan a partir de bancos combinatorios mediante dos métodos de híbridos (Colas *et al.*, 1996).

Después, para esta invención, se seleccionan los aptámeros neutralizantes de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R.

En una realización, la invención indica que el compuesto según la invención es un polipéptido.

20 En una realización particular, el polipéptido es un equivalente funcional de TACI, BCMA o BAFF-R. Tal como se emplea en la presente, un "equivalente funcional" de TACI, BCMA o BAFF-R es un compuesto que es capaz de unirse a BAFF, evitando con ello su interacción con TACI, BCMA o BAFF-R. La expresión "equivalente funcional" incluye fragmentos, mutantes, y muteínas de TACI, BCMA o BAFF-R. La expresión "funcionalmente equivalente", por tanto, incluye cualquier equivalente de TACI, BCMA o BAFF-R obtenido alterando la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, mediante una o más deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos, de modo que el análogo de proteína conserve la capacidad para unirse a BAFF. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse, por ejemplo, mediante mutación puntual del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos.

30 Los equivalentes funcionales incluyen moléculas que se unen a BAFF y comprenden todos o una porción de los dominios extracelulares de TACI, BCMA o BAFF-R. Generalmente, dichos equivalentes funcionales pueden ser los dominios extracelulares de TACI, BCMA o BAFF-R expresados como una proteína de fusión de Fc. Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden estar compuestas de la porción de unión al ligando extracelular de TACI que bloquea la activación de TACI por BAFF (por ejemplo, atacicept, Merck) o una proteína de fusión compuesta de la porción de unión al ligando extracelular de BAFF-R que bloquea la activación de BAFF-R por BAFF (por ejemplo, BR3-Fc, Biogen and Genentech, véase, por ejemplo, Vugmeyster Yulia *et al.*, 2006). Estas proteínas de fusión pueden generarse usando métodos conocidos en la técnica, tal como la tecnología del ADN recombinante, tal como se describe en detalle a continuación.

35 En una realización, la invención indica que el polipéptido según la invención es capaz de mejorar la función cardíaca y de tratar el infarto de miocardio a través de sus propiedades de receptor señuelo.

Un "receptor señuelo" significa que el polipéptido según la invención atrapa a BAFF y evita sus efectos fisiológicos sobre TACI, BCMA o BAFF-R.

40 Los equivalentes funcionales incluyen las formas solubles de TACI, BCMA o BAFF-R. Una forma soluble adecuada de estas proteínas, o sus equivalentes funcionales, puede comprender, por ejemplo, una forma truncada de la proteína de la cual se ha retirado el dominio transmembrana por medio de métodos químicos, proteolíticos o recombinantes.

45 Preferiblemente, el equivalente funcional es al menos 80% homólogo con la correspondiente proteína. En una realización particular, el equivalente funcional es al menos 90% homólogo, según se evalúa mediante cualquier algoritmo de análisis convencional, tal como, por ejemplo, el programa informático de análisis de secuencia Pileup (manual del programa para el paquete Wisconsin, 1996).

50 La expresión "un fragmento funcionalmente equivalente", tal como se emplea en la presente, también puede significar cualquier fragmento o ensamblaje de fragmentos de TACI, BCMA o BAFF-R que se une a BAFF. Por consiguiente, la presente invención proporciona un polipéptido capaz de inhibir la unión de TACI, BCMA o BAFF-R a BAFF, y dicho polipéptido comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que se corresponde con la secuencia de al menos una porción de un dominio extracelular de TACI, BCMA o BAFF-R, en la que dicha porción se une a BAFF. En una realización, el polipéptido se corresponde con un dominio extracelular de TACI, BCMA o BAFF-R. En otra realización, el polipéptido se corresponde con los dominios extracelulares de TACI, BCMA o BAFF-R expresados como una proteína de fusión de Fc.

55 Los fragmentos funcionalmente equivalentes pueden pertenecer a la misma familia de proteínas que TACI, BCMA o BAFF-R identificadas en la presente. Una "familia de proteínas" significa un grupo de proteínas que comparten una

función común y muestran una homología de secuencia en común. Las proteínas homólogas pueden derivarse de una especie no humana. Preferiblemente, la homología entre las secuencias de proteínas funcionalmente equivalentes es al menos 25% a través de la secuencia de aminoácidos completa de la proteína completa. Más preferiblemente, la homología es al menos 50%, aún más preferiblemente 75% a través de la secuencia de aminoácidos completa de la proteína o de un fragmento de la proteína. Más preferiblemente, la homología es mayor que 80% a través de toda la secuencia. Más preferiblemente, la homología es mayor que 90% a través de toda la secuencia. Más preferiblemente, la homología es mayor que 95% a través de toda la secuencia.

En una realización, el polipéptido según la invención también puede ser un equivalente funcional de BAFF. Tal como se emplea en la presente, un "equivalente funcional" de BAFF es un compuesto que es capaz de unirse a TACI, BCMA o BAFF-R, evitando con ello su interacción con el ligando natural BAFF. La expresión "equivalente funcional" incluye fragmentos, mutantes, y muteínas de BAFF. La expresión "funcionalmente equivalente", por tanto, incluye cualquier equivalente de BAFF obtenido alterando la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, mediante una o más deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos, de modo que el análogo de proteína conserve la capacidad para unirse a TACI, BCMA o BAFF-R. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse, por ejemplo, mediante mutación puntual del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos. Puede usarse un compuesto según se explica en las solicitudes de patente WO2004081043 o WO2006034106.

Los polipéptidos de la invención pueden producirse mediante cualquier medio adecuado, tal como será evidente para los expertos en la técnica. Para producir las cantidades suficientes de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R, o sus equivalentes funcionales, para su uso según la presente invención, la expresión puede lograrse, de modo conveniente, mediante el cultivo bajo condiciones apropiadas de células hospedantes recombinantes que contienen el polipéptido de la invención. Preferiblemente, el polipéptido se produce por medios recombinantes, mediante la expresión a partir de una molécula de ácido nucleico codificadora. Los sistemas para la clonación y la expresión de un polipéptido en una diversidad de células hospedantes diferentes son muy conocidos.

Cuando se expresa en forma recombinante, el polipéptido preferiblemente se genera mediante la expresión a partir de un ácido nucleico codificador en una célula hospedante. Puede usarse cualquier célula hospedante, dependiendo de los requisitos individuales de un sistema concreto. Las células hospedantes adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas de células de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen las células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster y muchas otras. Las bacterias también son hospedantes preferidos para la producción de proteínas recombinantes, debido a la facilidad con la que las bacterias pueden manipularse y cultivarse. Un hospedante bacteriano preferido y habitual es *E. coli*.

En realizaciones específicas, se contempla que los polipéptidos usados en los métodos terapéuticos de la presente invención puedan modificarse para mejorar su eficacia terapéutica. Esta modificación de los compuestos terapéuticos puede usarse para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo en circulación o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes puede disminuir significativamente mediante su combinación con una diversidad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución. Por ejemplo, la adición de dipéptidos puede mejorar la penetración de un agente en circulación hacia el ojo a través de la barrera hematorretiniana usando transportadores endógenos.

Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros hidrosolubles. Se ha demostrado que diversos polímeros hidrosolubles modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de las barreras fisiológicas, y modifican la tasa de eliminación del cuerpo. Para lograr un efecto de transporte dirigido o de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros hidrosolubles que contienen restos de fármaco como grupos terminales, como parte del esqueleto, o como grupos colgantes sobre la cadena polimérica.

El polietilenglicol (PEG) ha sido ampliamente usado como vehículo de fármaco, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. La unión a diversos fármacos, proteínas y liposomas ha demostrado mejorar el tiempo de residencia y disminuir la toxicidad. El PEG puede acoplarse a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y a través de otros métodos químicos; sin embargo, el propio PEG se limita a un máximo de dos agentes activos por molécula. En una estrategia diferente, se exploraron los copolímeros de PEG y aminoácidos como nuevos biomateriales que conservarían las propiedades de biocompatibilidad del PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de unión por molécula (lo cual proporciona una mayor carga del fármaco), y que pueden ser diseñados sintéticamente para adaptarse a una diversidad de aplicaciones.

Los expertos en la técnica conocen técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de fármacos. Por ejemplo, se han empleado polímeros de transporte de fármacos que consisten en polímeros alternantes de monómeros de PEG y trifuncionales, tales como lisina, en VectraMed (Plainsboro, N.J.). Las cadenas de PEG (generalmente de 2000 Dalton o menos) se unen a los grupos  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -amino de la lisina a través de enlaces uretano estables. Estos copolímeros conservan las propiedades deseables de PEG, al mismo tiempo que proporcionan grupos colgantes reactivos (los grupos ácido carboxílico de la lisina) en intervalos predeterminados y estrictamente controlados a lo largo de la cadena del polímero. Los grupos colgantes reactivos pueden usarse para la derivatización, la reticulación o la conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles para producir profármacos estables de largo tiempo

en la circulación variando el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG, y el enlace rompible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta al espaciamiento del complejo de fármaco/grupo conector y a la cantidad de fármaco por peso molecular del conjugado (unos segmentos de PEG más pequeños proporcionan una mayor carga de fármaco). En general, al aumentar el peso molecular global del conjugado de copolímero en bloque se aumentará la semivida en circulación del conjugado. No obstante, el conjugado debe ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo del umbral limitante de la filtración glomerular (por ejemplo, menor que 60 kDa).

Además, de forma importante para que el esqueleto polimérico mantenga su semivida en circulación y biodistribución, pueden usarse conectores para mantener al agente terapéutico en forma de profármaco hasta su liberación del esqueleto polimérico por un activador específico, generalmente la actividad enzimática en el tejido diana. Por ejemplo, este tipo de transporte de fármacos activado por tejido es particularmente útil cuando es necesario el transporte a un sitio específico de biodistribución, y el agente terapéutico se libera en el sitio de la patología o cerca de este. Los bancos de grupos conectores para su uso en el transporte de fármacos activados son conocidos por los expertos en la técnica y pueden basarse en la cinética de las enzimas, la prevalencia de la enzima activa, y la especificidad de ruptura de las enzimas específicas de enfermedad seleccionadas. Estos conectores pueden usarse para modificar la proteína o el fragmento de la proteína descrita en la presente para la administración terapéutica.

En otra realización, el compuesto según la invención es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R.

Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden actuar como inhibidores de la expresión de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R para su uso en la presente invención. La expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R puede reducirse poniendo en contacto un sujeto o una célula con un ARN bicatenario pequeño (ARNbp), o un vector o una construcción que provoque la producción de un ARN bicatenario pequeño, de modo que la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R se inhibe específicamente (es decir, ARN de interferencia o ARNi). Los métodos para seleccionar un ARNbp adecuado o un vector que codifica un ARNbp son muy conocidos en la técnica para genes cuya secuencia es conocida (por ejemplo, véase Tuschl, T. *et al.* (1999); Elbashir, S. M. *et al.* (2001); Hannon, G.J. (2002); McManus, M.T. *et al.* (2002); Brummelkamp, T.R. *et al.* (2002); las patentes de EE. UU. n.ºs 6.573.099 y 6.506.559; y las publicaciones de patente internacional n.ºs WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836).

Las ribozimas también pueden actuar como inhibidores de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la ruptura específica del ARN. El mecanismo de acción de las ribozimas implica una hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguido de una ruptura endonucleolítica. Por tanto, las moléculas de ribozima con motivo de cabeza de martillo o de horquilla modificadas que catalizan de modo específico y eficaz la ruptura endonucleolítica de las secuencias de ARNm de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R son útiles dentro del alcance de la presente invención. Los sitios de ruptura de ribozimas específicos dentro de cualquier ARN diana potencial se identifican inicialmente mediante un barrido de la molécula diana para encontrar sitios de ruptura de ribozimas, que generalmente incluyen las siguientes secuencias: GUA, GUU, y GUC. Tras haberse identificado, las secuencias de ARN cortas de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos que se corresponden con la región del gen diana que contiene el sitio de ruptura pueden evaluarse para las características estructurales predichas, tales como la estructura secundaria, que hacen que la secuencia oligonucleotídica no sea adecuada. La idoneidad de las dianas candidatas también puede evaluarse ensayando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios usando, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasa.

Pueden prepararse ribozimas y oligonucleótidos antisentido útiles como inhibidores de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R por medio de métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química, tales como, por ejemplo, mediante la síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Como alternativa, pueden generarse moléculas de ARN antisentido mediante la transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Estas secuencias de ADN pueden incorporarse en una amplia diversidad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados, tales como los promotores de polimerasa de T7 o SP6. Pueden introducirse diversas modificaciones en los oligonucleótidos de la invención como un medio para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo, en lugar de los enlaces fosfodiéstera dentro del esqueleto del oligonucleótido.

Las ribozimas, ARNip y oligonucleótidos antisentido de la invención pueden administrarse *in vivo* por sí solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del ácido nucleico de ribozima, ARNip u oligonucleótido antisentido a las células, y preferiblemente a células que expresan BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con degradación reducida, con relación al grado de degradación que se produciría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a plásmidos, fágmidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que han sido manipuladas mediante la inserción o la incorporación de las secuencias de ácidos nucleicos de ribozimas, ARNip u oligonucleótidos antisentido. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a secuencias de ácidos nucleicos

procedentes de los siguientes virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino, y virus del sarcoma de Rouse; adenovirus, virus adenoasociados; virus de tipo SV40; virus de polioma; virus de Epstein-Barr; virus de papiloma; herpes virus; virus de vaccinia; poliovirus; y virus de ARN, tales como un retrovirus. Se pueden emplear con facilidad otros vectores no mencionados, pero conocidos en la técnica.

Los vectores víricos concretos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que genes no fundamentales han sido reemplazados por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del ARN genómico vírico en ADN con la posterior integración provírica en el ADN celular del hospedante. Los retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica en seres humanos. Los retrovirus más útiles son los que son deficientes en la replicación (es decir, son capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Estos vectores de expresión retrovíricos genéticamente alterados tienen utilidad genera para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Los protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en la replicación (que incluyen las etapas de la incorporación de material genético exógeno en un plásmido, la transfección de una célula de encapsulamiento revestida con un plásmido, la producción de retrovirus recombinantes por la línea de células de encapsulamiento, la recolección de las partículas víricas del medio de cultivo de tejidos, y la infección de las células diana con las partículas víricas) se proporcionan en Kriegler, 1990, y en Murry, 1991).

Los virus concretos para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adenoasociados, que son virus de ADN bicatenario que ya han sido aprobados para un uso humano en la terapia génica. Los virus adenoasociados pueden modificarse para que sean deficientes en la replicación y ser capaces de infectar una amplia gama de tipos celulares y especies. También tienen ventajas, tales como estabilidad frente al calor y a disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas; y falta de inhibición de superinfección, lo cual permite realizar múltiples series de transducciones. Se ha indicado que los virus adenoasociados pueden integrarse en el ADN celular humano de una manera específica de sitio, minimizando con ello la posibilidad de una mutagénesis insercional y de variabilidad de las características de expresión génica de la infección retrovírica. Además, las infecciones con virus adenoasociados de tipo salvaje han continuado en cultivo de tejidos durante más de 100 transferencias en ausencia de presión selectiva, lo cual implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un acontecimiento relativamente estable. Los virus adenoasociados también pueden actuar de modo extracromosómico.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito a fondo en la técnica y son muy conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989. En los últimos años, se han empleado vectores plasmídicos como vacunas de ADN para administrar genes que codifican antígenos a células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para este fin, porque no plantean los mismos problemas de seguridad que muchos vectores víricos. Sin embargo, estos plásmidos, al tener un promotor compatible con la célula hospedante, pueden expresar un péptido a partir de un gen operativamente codificado dentro del plásmido. Algunos plásmidos que se emplean habitualmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40, y pBlueScript. Otros plásmidos son muy conocidos por los expertos en la técnica. Además, los plásmidos pueden diseñarse a la carta usando enzimas de restricción y reacciones de acoplamiento para retirar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos pueden administrarse mediante una diversidad de vías parenterales, mucósicas y tópicas. Por ejemplo, el plásmido de ADN puede inyectarse por vía intramuscular, ocular, intradérmica, subcutánea u otras vías. También puede administrarse mediante gotas o pulverizados intranasales, supositorios rectales y por vía oral. También puede administrarse hacia el interior de la epidermis o una superficie mucosa usando una pistola de genes. Los plásmidos pueden administrarse en una disolución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de transporte de ADN que incluye, pero no se limita a liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico del oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNhp o ribozima está bajo el control de una región reguladora heteróloga, por ejemplo, un promotor heterólogo. El promotor puede ser específico de células gliales de Muller, células de la microglia, células endoteliales, células de pericitos y astrocitos. Por ejemplo, puede obtenerse la expresión específica en células gliales de Muller a través del promotor del gen de glutamina sintasa. El promotor también puede ser, por ejemplo, un promotor vírico, tal como un promotor de CMV o cualquier promotor sintético.

Otro objeto de la invención describe un método para su uso para mejorar la función cardíaca, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R o una vía de señalización como se describió anteriormente.

En una realización, la invención describe un método para tratar el infarto de miocardio, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R o una vía de señalización como se describió anteriormente.

En un aspecto, la invención describe un método para tratar el infarto de miocardio, que comprende administrar a un

sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-BAFF, tal como belimumab.

Tal como se emplea en la presente, los términos "tratar" o "tratamiento" indican revertir, aliviar, inhibir el avance o prevenir el trastorno o la afección al cual se aplican los términos, o revertir, aliviar, inhibir el avance o prevenir uno o más síntomas del trastorno o la afección al cual se aplican dichos términos.

5 En otra realización, el infarto de miocardio es un infarto de miocardio agudo.

Otro objeto de la invención describe un método para tratar un paciente que se ha considerado que presenta una mala prognosis para el tiempo de supervivencia o que presenta un riesgo alto de recurrencia de un infarto de miocardio según el anterior método de la invención, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R o una vía de señalización como se describió anteriormente, o un agente de depuración de células B.

Otro objeto de la invención describe un compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R o una vía de señalización o un agente de depuración de células B, para su uso en el tratamiento de un paciente que se ha considerado que presenta una mala prognosis para el tiempo de supervivencia o que presenta un riesgo alto de recurrencia de un infarto de miocardio según el anterior método de la invención.

En una realización particular, la invención indica que el paciente es un paciente no lúpico.

Un "agente de depuración de células B" tiene el significado general en la técnica, y se refiere a una molécula que depura o destruye a las células B en un paciente y así reduce la respuesta humoral suscitada por las células B. Los agentes de depuración de células B son muy conocidos en la técnica (Thomas Dörner, Peter E. Lipsky, B-cell targeting: a novel approach to immune intervention today and tomorrow, Expert Opinion on Biological Therapy, septiembre de 2007, vol. 7, n.º 9, pp. 1287-1299:1287-1299). El agente de depuración de células B puede unirse a un marcador de la superficie de células B. Un "marcador de la superficie de células B" o "diana de células B" o "antígeno de células B" en la presente es un antígeno expresado sobre la superficie de una célula B que puede ser la diana de un agente de depuración de células B que se une a él. Los ejemplos de marcadores de la superficie de células B incluyen CD10, CD 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86.

En una realización particular, el agente de depuración de células B es un anticuerpo anticélulas B, preferiblemente un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o humano). Por ejemplo, un anticuerpo anticélulas B puede ser un anticuerpo que se dirige a cualquier marcador de la superficie de las células B, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-CD20 [por ejemplo, rituximab (Roche), ibritumomab tiuxetano (Bayer Schering), tositumomab (Glaxo SmithKline), AME-133v (Applied Molecular Evolution), ocrelizumab (Roche), ofatumumab (HuMax-CD20, Gemnab), TRU-015 (Trubion) e IMMU-106 (Immunomedics)], un anticuerpo anti-CD22 [por ejemplo, epratuzumab, Leonard *et al.*, Clinical Cancer Research (2004), 10:5327-5334], un anticuerpo anti-CD79a, un anticuerpo anti-CD27, o un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.109.304). Otro ejemplo de anticuerpo anticélulas B incluye un anticuerpo que se dirige a un factor de supervivencia de células B o una citoquina necesaria para la función de las células B o uno de sus efectores (por ejemplo, un receptor que se une al factor mencionado anteriormente). Estos anticuerpos incluyen el anticuerpo anti-APRIL (por ejemplo, anticuerpo anti-APRIL humano, ProSci Inc.), el anticuerpo anti-IL-6 [previamente descrito por De Benedetti *et al.*, J. Immunol. (2001), 166: 4334-4340; y por Suzuki *et al.*, Europ. J. of Immunol. (1992), 22 (8), 1989-1993, que se incorporan totalmente como referencia en la presente], el anticuerpo anti-IL-7 (R&D Systems, Minneápolis, Minn.) o el anticuerpo SDF-1 (R&D Systems, Minneápolis, Minn.).

La depuración de las células B también puede lograrse mediante el uso de proteínas de fusión que bloquean la activación de los receptores de células B, por ejemplo, una proteína de fusión compuesta por la porción de unión al ligando extracelular de TACI que bloquea la activación de TACI por APRIL y BLyS (por ejemplo, ataccept, Merck) o una proteína de fusión compuesta de la porción de unión al ligando extracelular de BAFF-R que bloquea la activación de BAFF-R por BLyS (por ejemplo, BR3-Fc, Biogen and Genentech). Estas proteínas de fusión pueden generarse usando métodos conocidos en la técnica, tal como la tecnología del ADN recombinante, tal como se describe en detalle a continuación.

50 Generalmente, un "agente de depuración de células B" puede ser un agente como se describe en Gullick Nicola *et al.*, 2007.

En otra realización, la invención indica que el agente de depuración de células B es un anticuerpo de depuración de células B.

En otra realización, la invención indica que el agente de depuración de células B es un anticuerpo anti-CD20.

55 En otro objeto, la invención se refiere a un compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o el compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R o una vía de señalización

para su uso en la mejora de la función cardíaca después de un infarto de miocardio o un infarto de miocardio agudo.

*Composición farmacéutica*

Otro objeto de la invención describe una composición terapéutica que comprende un compuesto según la invención para su uso en la mejora de la función cardíaca.

- 5 En otra realización, la invención describe una composición terapéutica que comprende un compuesto según la invención para su uso en el tratamiento del infarto de miocardio.

En particular, la invención indica que dicho compuesto es un inhibidor de la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R o una vía de señalización.

- 10 En una realización particular, la invención indica que la invención se refiere a una composición terapéutica que comprende un compuesto que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R o un compuesto que es un inhibidor de la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R o una vía de señalización o un agente de depuración de células B, para su uso en el tratamiento de un paciente que se ha considerado que presenta una mala prognosis para el tiempo de supervivencia o que presenta un riesgo alto de recurrencia de un infarto de miocardio según el anterior método de la invención.

- 15 Cualquier agente terapéutico de la invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, con matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas.

- 20 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción contraria cuando se administran a un mamífero, en especial a un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo no tóxicos.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen, por supuesto, del trastorno que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

- 25 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para la administración tópica, oral, intranasal, parenteral, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea y similares.

- 30 En particular, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, disoluciones salinas estériles isotónicas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, en especial liofilizadas, que tras la adición de agua esterilizada o disolución salina fisiológica, dependiendo del caso, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros y, en particular, en función del modo de administración usado, de la patología pertinente o, como alternativa, de la duración deseada del tratamiento.

- 35 Además, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para la administración oral; cápsulas de liberación a lo largo del tiempo; y cualquier otra forma que se emplea en la actualidad.

Los compuestos de la invención pueden administrarse en forma de una composición farmacéutica, como se define a continuación.

- 40 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente de un compuesto para tratar y/o prevenir el infarto de miocardio.

- 45 Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y las composiciones de la presente invención será decidido por el médico encargado dentro del alcance del criterio médico razonable. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente concreto dependerá de una diversidad de factores, que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de la administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o simultáneos con el polipéptido específico empleado; y factores similares conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, dentro del conocimiento de la técnica se incluye  
50 iniciar las dosis del compuesto a unos niveles inferiores a los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto diarios. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del



5 ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Un medicamento generalmente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra normalmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal diarios, en especial de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal diarios.

La invención se ilustrará más a fondo 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

10 Figura 1. El nivel en circulación de Baff en la fase aguda de un IM está asociado con los resultados cardiovasculares. La probabilidad de los acontecimientos resultantes (muerte o IM recurrente) es una función del nivel de Baff en circulación en la línea de base en pacientes con IM agudo. Un alto nivel detectable de Baff en el momento del ingreso de un IM agudo es una variable predictiva independiente de la muerte y de IM recurrente después de dos años de seguimiento después de múltiples ajustes (véanse los métodos). PR = proporción de riesgo.

15 Figura 2. El bloqueo de la señalización de Baff dificulta la movilización de monocitos y mejora la función cardíaca después de un IM agudo. (a) Cuantificación del número de monocitos 7/4hi en la médula ósea (izquierda) y en la sangre (derecha) de ratones Baff-r/- comparado con controles en el día 3 después de un IM. (b) Análisis cuantitativo de la fracción depurada (%) de ratones Baff-r/- comparado con ratones Baff-r+/+ y Baff-r+/- en el día 14 tras un IM. Los datos son representativos de 8 a 11 ratones por grupo. Se muestran los valores promedio  $\pm$  MEE. \* P < 0,05 y \*\* P < 0,01. (c, d) Cuantificación del número de células B B220+ IgM+ (d) y de monocitos 7/4hi (d) en la sangre de ratones tratados con anti-Baff comparado con animales inyectados con PBS. (e) Análisis cuantitativo de la fracción depurada (%) de ratones tratados con anti-Baff comparado con PBS en el día 14 después de un IM (n = 12 a 15 ratones por grupo). \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001.

### Ejemplo

25 Ejemplo 1: Un elevado nivel en circulación de Baff en la fase aguda de un IM está asociado con resultados cardiovasculares adversos

Los inventores evaluaron la relación entre el nivel en circulación de Baff y los resultados clínicos en una cohorte de 1000 pacientes ingresados por un IM agudo. El riesgo de muerte e IM recurrente se asoció con terciles crecientes de Baff en circulación en el momento del ingreso. La PR de muerte e IM recurrente en el segundo y tercer tercio de Baff fue de 1,65 (1,05-2,58) y 3,14 (2,09-4,73) comparado con el tercio más bajo (p<0,0001). La asociación sigue siendo significativa en un modelo totalmente ajustado (figura 1).

Ejemplo 2: El bloqueo de la señalización de Baff dificulta la movilización de monocitos y mejora la función cardíaca después de un IM agudo

35 La señalización de Baff a través del receptor de Baff (Baff-r) es necesaria para el mantenimiento de las células B2 maduras, y los ratones Baff-r/- se caracterizan por una profunda reducción en los linfocitos B en la zona folicular (FO) y marginal (MZ), pero conservan las células B1. Por tanto, se estudió el impacto de la deficiencia en Baff-r sobre la patofisiología de lesiones miocárdicas posisquémicas. De manera interesante, se descubrió que los ratones Baff-r/- muestran un aumento significativo en la acumulación de monocitos Ly6Chi en la médula ósea, pero muestran niveles inferiores de estos monocitos en la sangre en circulación, comparado con sus compañeros de camada control, lo cual sugiere claramente una movilización alterada de los monocitos (figura 2a). De manera importante, la deficiencia en Baff-r mejora la función cardíaca después de un IM, tal como se demuestra por el aumento significativo de la fracción depurada en ratones Baff-r/-, comparado con sus compañeros de camada Baff-r+/- (figura 2b). Para confirmar aún más el papel de Baff en este contexto, se trató un grupo de ratones de tipo salvaje ("wild-type", WT) con un anticuerpo monoclonal anti-Baff. Se descubrió que la neutralización de Baff condujo a una depuración significativa de los linfocitos B en circulación (figura 2c), que se asoció con una movilización alterada de los monocitos Ly6Chi (figura 2d) y una mejor función cardíaca (figura 2e)

### Referencias bibliográficas

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen la técnica actual a la cual pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias bibliográficas se incorporan en la presente descripción como referencia.

50 Ait-Oufella, H., *et al.*, B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice, *J. Exp. Med.*, 207, 1579-1587 (2010).

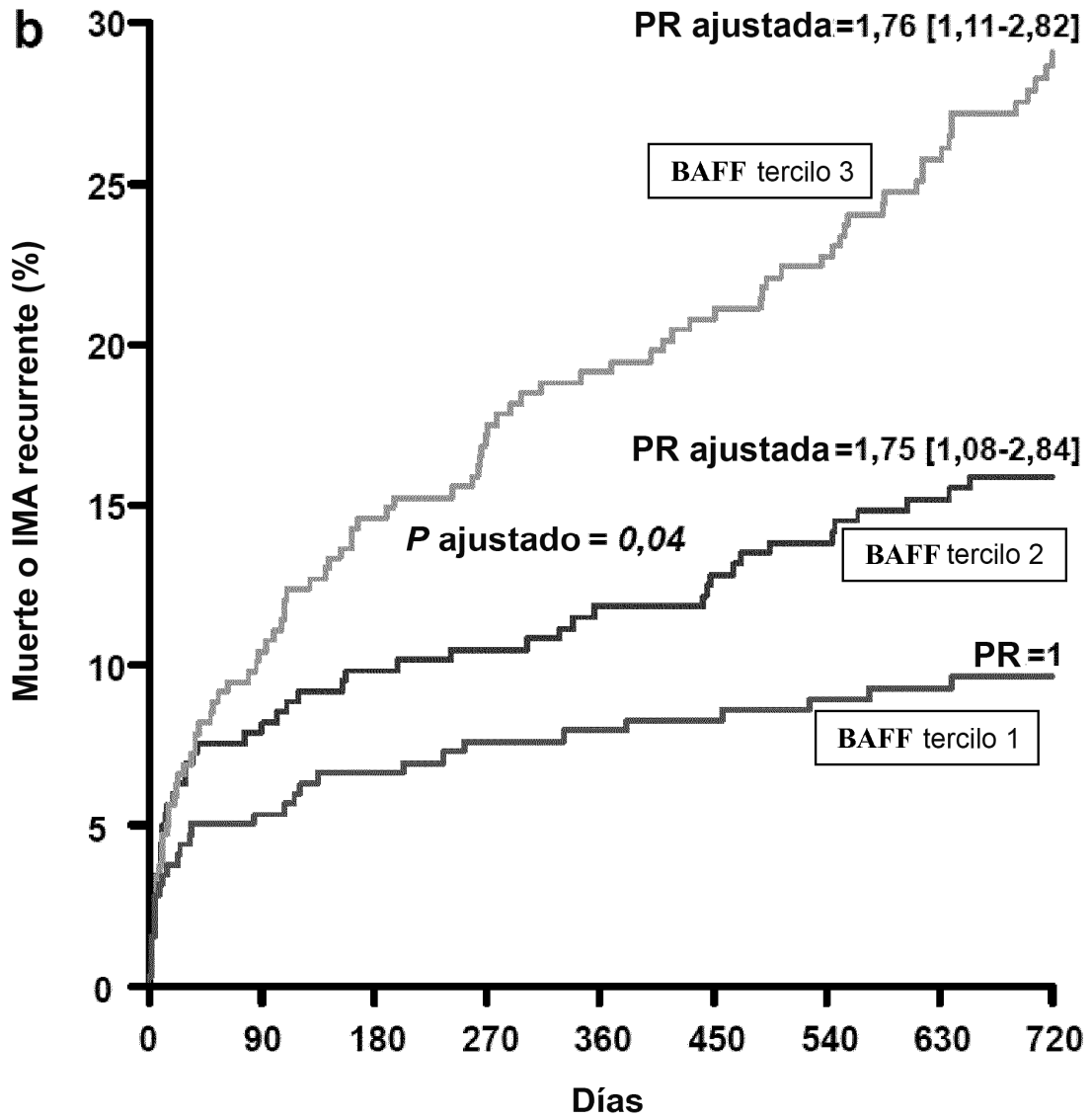
Armstrong, P.W., *et al.*, Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial, *JAMA*, 297, 43-51 (2007).

Busche, M.N., Pavlov, V., Takahashi, K. y Stahl, G.L., Myocardial ischemia and reperfusion injury is dependent on

- both IgM and mannose-binding lectin, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 297, H1853-1859 (2009).
- Cazes, A., *et al.*, Mechanical ventricular assistance in heart failure: pathology of the cardiac apex removed during device implantation, *Cardiovasc. Pathol.*, 19, 112-116 (2010).
- 5 Cochain, C., *et al.*, Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization, *Cardiovasc. Res.*, 88, 186-195 (2010).
- Eikelboom, J.W. y O'Donnell, M., Pexelizumab does not "complement" percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction, *JAMA*, 297, 91-92 (2007).
- Granger, D.N. y Korthuis, R.J., Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury, *Annu. Rev. Physiol.*, 57, 311-332 (1995).
- 10 Granger, C.B., *et al.*, Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: the COMplement inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty (COMMA) trial, *Circulation*, 108, 1184-1190 (2003).
- Gullick Nicola y D'Cruz David, New therapies for the treatment of systemic lupus erythematosus, *Expert Opin. Ther. Patents* (2007), 17(3).
- 15 Haas, M.S., *et al.*, Blockade of self-reactive IgM significantly reduces injury in a murine model of acute myocardial infarction, *Cardiovasc. Res.*, 87, 618-627 (2010).
- Kahn Phillip, Meera Ramanujam, Ramalingam Bethunaickan, Weiqing Huang, Haiou Tao Michael P. Madaio, Stephen M. Factor, y Anne Davidson, Prevention of Murine Antiphospholipid Syndrome by BAFF Blockade, *Arthritis & Rheumatism*, vol. 58, n.º 9, septiembre de 2008.
- 20 Leuschner, F., *et al.*, Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis, *J. Exp. Med.*, 209, 123-137 (2012).
- Mahaffey, K.W., *et al.*, Effect of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction: the COMplement inhibition in myocardial infarction treated with thromboLYtics (COMPLY) trial, *Circulation*, 108, 1176-1183 (2003).
- 25 Nahrendorf, M., *et al.*, The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions, *J. Exp. Med.*, 204, 3037-3047 (2007).
- Shah, A.M. y Mann, D.L., In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science, *Lancet*, 378, 704-712 (2011).
- Uchida, J., *et al.*, Mouse CD20 expression and function, *Int. Immunol.*, 16, 119-129 (2004).
- 30 Vinten-Johansen, J., Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury, *Cardiovasc. Res.*, 61, 481-497 (2004).
- White, H.D. y Chew, D.P., Acute myocardial infarction, *Lancet*, 372, 570-584 (2008).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un método *in vitro* para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que sufre un infarto de miocardio o la recurrencia de un infarto de miocardio en un paciente que ha sufrido un infarto de miocardio, que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión de BAFF en una muestra que se ha obtenido de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado, y iii) proporcionar una buena prognosis del tiempo de supervivencia o un riesgo bajo de recurrencia de un infarto de miocardio cuando el nivel de expresión es menor que el valor de referencia predeterminado, y una mala prognosis del tiempo de supervivencia o un riesgo alto de recurrencia de un infarto de miocardio cuando el nivel de expresión es mayor que el valor de referencia predeterminado.
- 10 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que el paciente es un paciente no lúpico.
- 3.- El método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, plasma, suero, linfa y tejido cardíaco.
- 15 4.- Un anticuerpo o un aptámero que inhibe la unión de BAFF a TACI, BCMA o BAFF-R; o un ARNip, una ribozima o un ARNhp que inhibe la expresión del gen de BAFF, TACI, BCMA o BAFF-R, para su uso en un método para tratar un paciente que se considerado que presenta una mala prognosis para el tiempo de supervivencia o un alto riesgo de recurrencia de un infarto de miocardio según la reivindicación 1.



**Pacientes en riesgo (n)**

<b>Baff</b> tercilo 3	319	294	289	283	282	279	275	260	223
<b>Baff</b> tercilo 2	319	286	279	271	264	259	256	237	212
<b>Baff</b> tercilo 1	321	279	266	254	248	242	235	210	175

Figura 1

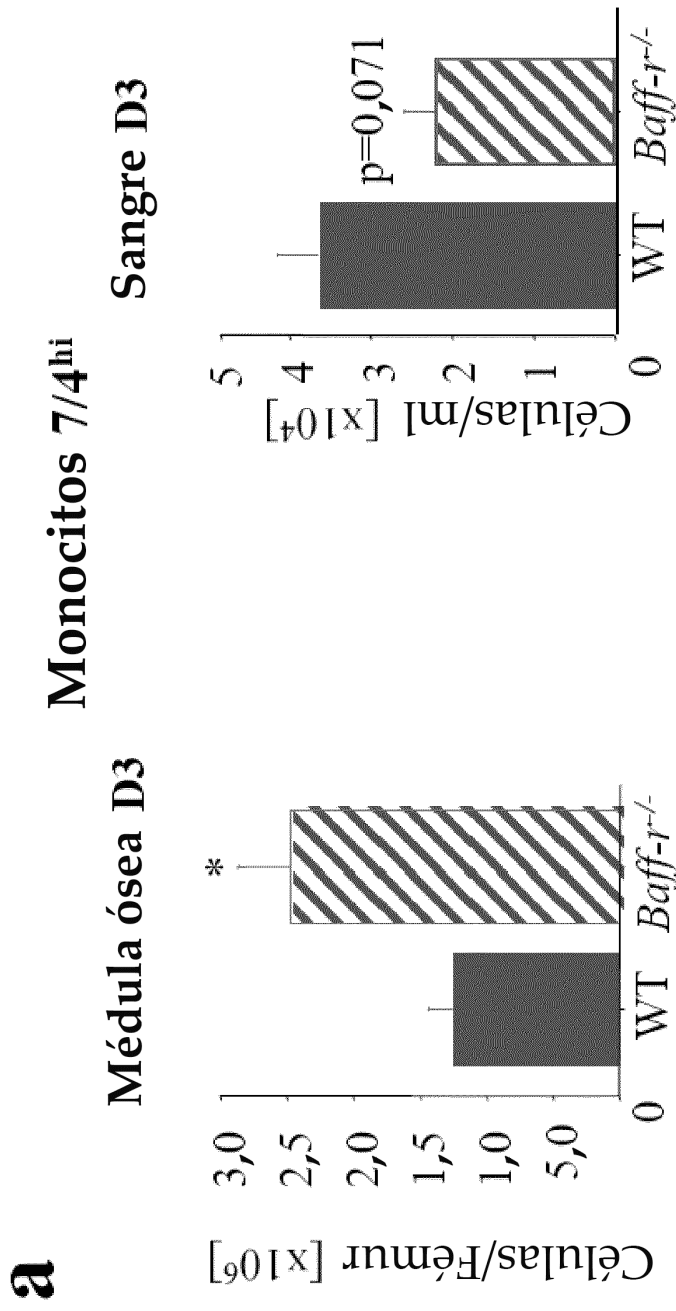
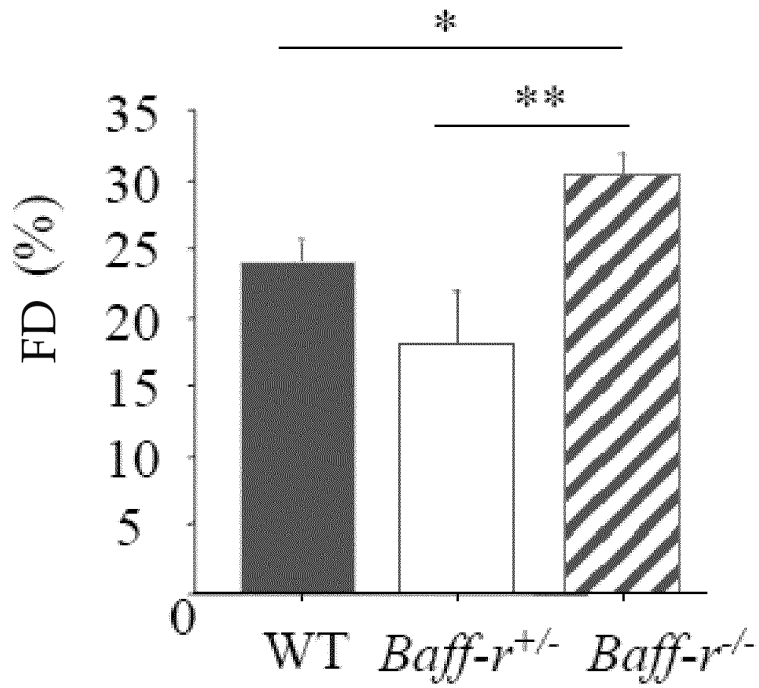


Figura 2 A

**b**



**c**

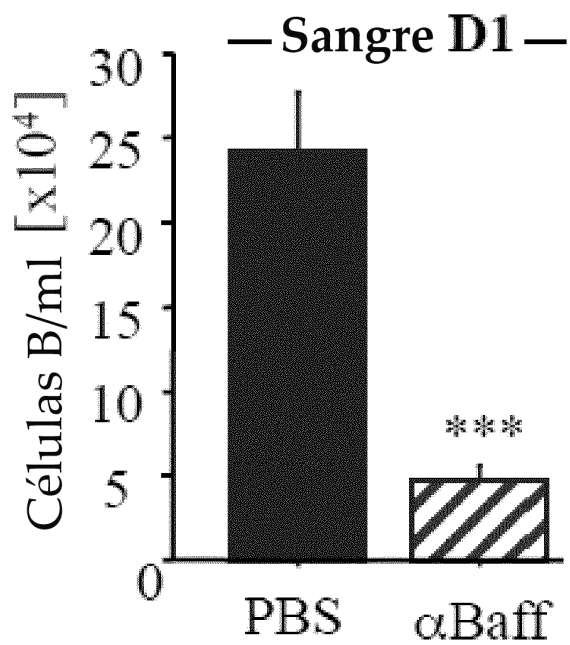
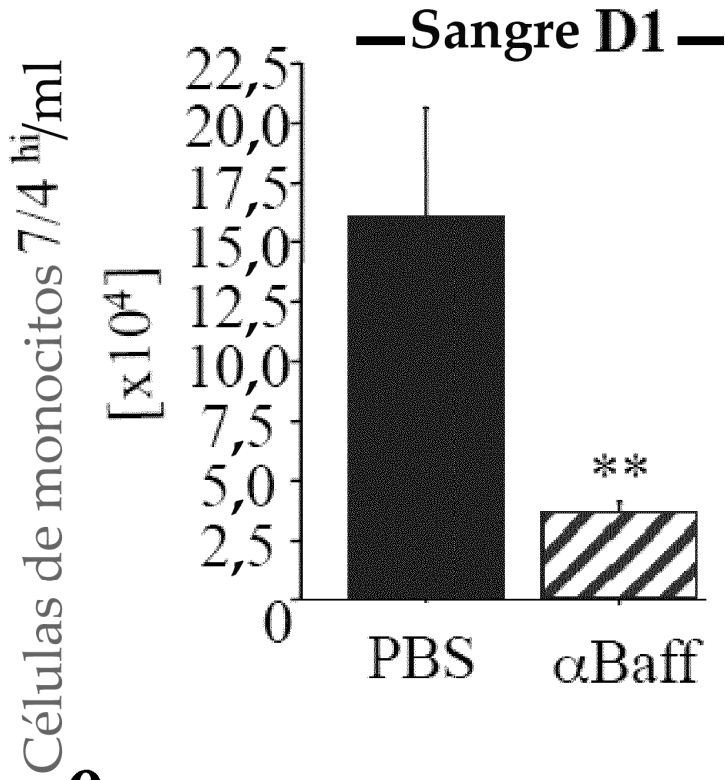


Figura 2 B y C

**d**



**e**

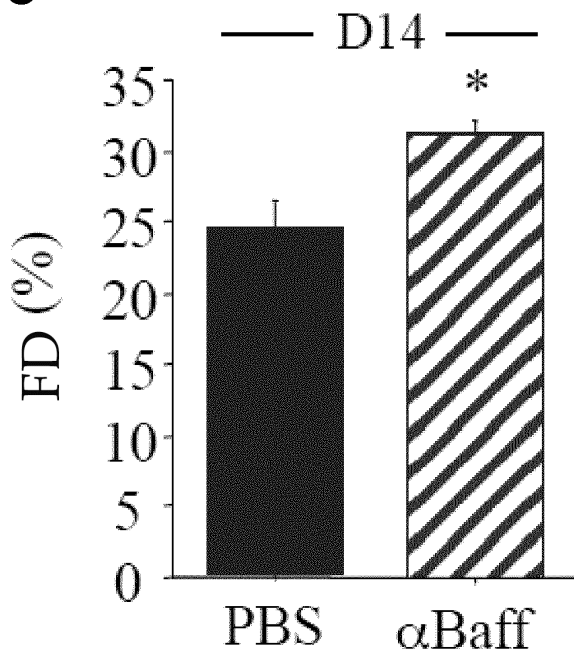


Figura 2 D y E