

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 876**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2015** **PCT/EP2015/068729**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016** **WO16030209**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2015** **E 15750737 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 3186639**

54 Título: **Neprilisina como marcador pronóstico de insuficiencia cardiaca**

30 Prioridad:

**29.08.2014 EP 14182846**

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

**12.12.2019**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN  
CIÈNCIES DE LA SALUT GERMANS TRIAS I  
PUJOL (100.0%)**

**Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles, s/n  
08916 Badalona, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**BAYES GENIS, ANTONI;  
LUPÓN ROSÉS, JOSEP;  
GALÁN ORTEGA, AMPARO y  
BARALLAT MARTÍNEZ DE OSABA, JAUME**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

ES 2 734 876 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

Neprilisina como marcador pronóstico de insuficiencia cardíaca

- 5 La presente invención es en el ámbito del pronóstico clínico. En particular, la presente invención se refiere al pronóstico de acontecimientos adversos (tales como la mortalidad cardiovascular) en pacientes con insuficiencia cardíaca (IC).

### ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 La insuficiencia cardíaca (IC), denominada también IC congestiva (ICC), es una afección cardíaca que se produce cuando un problema en la estructura o en la función del corazón deteriora su capacidad para suministrar suficiente flujo sanguíneo para satisfacer las necesidades del organismo. Puede provocar una amplia variedad de síntomas, particularmente dificultad para respirar (disnea) en reposo o durante el ejercicio y/o fatiga, signos de retención de líquidos tales como congestión pulmonar o hinchazón de los tobillos, y pruebas objetivas de una anomalía en la estructura o en la función del corazón en reposo. Sin embargo, algunos pacientes pueden estar completamente asintomáticos, y las anomalías asintomáticas estructurales o funcionales del corazón se consideran precursoras de una insuficiencia cardíaca sintomática y están asociadas con una elevada mortalidad.

- La insuficiencia cardíaca es una enfermedad común: más del 2 % de la población de Estados Unidos, o prácticamente 20 5 millones de personas, están afectadas, y entre el 30 y el 40 % de los pacientes muere por una insuficiencia cardíaca en el primer año tras haber recibido el diagnóstico.

- La insuficiencia cardíaca a menudo no es diagnosticada debido a la ausencia de una definición acordada universalmente y a los retos en el diagnóstico definitivo, particularmente en las etapas tempranas. Con una terapia 25 apropiada, se puede tratar la insuficiencia cardíaca en la mayoría de pacientes, pero es una afección potencialmente mortal, y la enfermedad progresiva está asociada con una tasa de mortalidad anual global del 10 %. Además, es la principal causa de hospitalización en personas mayores de 65 años. En consecuencia, la gestión de la insuficiencia cardíaca consume el 1-2 % del gasto sanitario total en los países europeos.

- 30 La IC crónica es una afección a largo plazo que se desarrolla a lo largo de entre meses y años, con una sintomatología tratada habitualmente estable. Esta afección está asociada con el desarrollo de respuestas adaptativas cardíacas que, sin embargo, pueden ser perjudiciales a largo plazo y dar lugar a un empeoramiento de la afección. La IC aguda (ICA) es un término usado para describir una insuficiencia cardíaca exacerbada o descompensada, en referencia a los episodios en los que el paciente puede estar caracterizado por presentar un cambio en los signos y síntomas de la 35 insuficiencia cardíaca que da como resultado la necesidad de un tratamiento u hospitalización urgente. La ICA se desarrolla rápidamente, en horas o días, y puede ser inmediatamente mortal ya que el corazón no tiene tiempo de realizar adaptaciones compensadoras. La IC crónica también puede descompensarse, lo que muy habitualmente ocurre como consecuencia de una enfermedad intercurrente (tal como neumonía), un infarto de miocardio, arritmias, una hipertensión descontrolada o la incapacidad del paciente de mantener una restricción de líquidos, una dieta o una 40 medicación.

- La posibilidad de predecir acontecimientos adversos en la presentación del paciente es importante, ya que el reconocimiento temprano del riesgo es un requisito previo para empezar a tomar medidas que ayuden a prevenir el desarrollo de acontecimientos adversos. A este respecto se han realizado diversos intentos con objeto de hallar 45 marcadores que puedan proporcionar una información pronóstica precisa.

- Clínicamente, varios biomarcadores han recibido una gran atención como factores pronóstico en la IC, siendo los péptidos natriuréticos los más ampliamente usados, pero otros, tales como el ST2 y la troponina T de alta sensibilidad, también han mostrado resultados prometedores, haciéndolo además de una forma aditiva a los péptidos natriuréticos. 50 Cuando se mide el nivel del biomarcador, también es muy importante que el profesional clínico comprenda los factores de confusión que pueden debilitar o socavar la precisión de la prueba. Un ejemplo clásico de esto es cómo afecta el índice de masa corporal o una insuficiencia de la función renal a las concentraciones sanguíneas de los péptidos natriuréticos en la IC.

- 55 US 2014/206632 describe un método para determinar la probabilidad de ingreso hospitalario de un paciente diagnosticado con insuficiencia cardíaca mediante la medición de la concentración de una combinación de al menos dos marcadores. Como se describe a lo largo de todo el documento, uno de los biomarcadores es ET-1 y el otro (s) se seleccionan de troponina cardíaca, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), péptido natriurético cerebral (BNP), proBNP, proBNP N-terminal (NT-proBNP), interleuquina-6 (IL-6), 60 en muestra de sangre, suero o plasma. Como se concluye en [0149], los pacientes con un mayor número de biomarcadores elevados tienen una mayor probabilidad de hospitalización más rápido que los pacientes con un número menor de biomarcadores elevados.

A pesar de los esfuerzos realizados, todavía existe una necesidad de marcadores pronósticos adicionales que puedan proporcionar una información útil en el tratamiento de la enfermedad de la IC.

## RESUMEN DE LA INVENCION

5

Los presentes inventores han encontrado niveles de neprilisina soluble (denominada también en lo sucesivo en el presente documento "NEP") en circulación, en muestras de pacientes que padecen una IC. En particular, se han detectado niveles elevados en circulación de NEP soluble en el suero de pacientes con una IC crónica. Además, como se ilustra más abajo, se ha encontrado una asociación positiva entre la NEP y los eventos cardiovasculares (CV).

10

La NEP, tal como se explica detalladamente más abajo, es una enzima unida a la membrana, con un gran dominio catalítico extracelular, una única región transmembrana y un dominio citoplasmático N-terminal corto (27 aminoácidos). Esta enzima se ha descrito en el estado de la técnica como marcador diagnóstico o pronóstico de diversos tipos de cáncer o de enfermedades renales.

15

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que esta enzima puede ser útil como marcador pronóstico en la IC.

Por otro lado, algunos informes previos han identificado la presencia de NEP en fluidos biológicos. Sin embargo, no existe evidencia de una NEP soluble en circulación como marcador biopatológico indirecto en pacientes con IC.

20

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para determinar el pronóstico de un paciente que padece una enfermedad de insuficiencia cardíaca, comprendiendo el método la etapa de determinar el nivel de neprilisina soluble (NEP) en una muestra de ensayo del paciente.

25

Como se explica con detalle a continuación, se realizó el seguimiento consecutivo de un gran grupo real de 1.069 pacientes durante una media de 4,1 años con 335 acontecimientos de criterio de valoración compuestos, y se encontró que la NEP era un buen marcador indirecto biopatológico de la mortalidad y la morbilidad CV, incluso después de un ajuste a un modelo multivariable muy completo que incluía 12 variables pronósticamente significativas, incluyendo el NT-proBNP, que es uno de los biomarcadores más ampliamente usados en el pronóstico de la IC. Tal como se muestra en la Tabla 2, en la que se resumen los resultados del análisis multivariable, la información pronóstica proporcionada por la NEP es significativa (debido a que el valor de p es menor de 0,05) y es independiente de otros parámetros que se tuvieron en cuenta durante dicho análisis. La persona experta en la materia sabe que cuando se llevan a cabo análisis multivariantes, los biomarcadores que en un principio parecían ser adecuados para el diagnóstico o el pronóstico de una enfermedad, al final son desechados debido a que son estadísticamente interferidos en negativo por otros biomarcadores o por la consideración de otros parámetros (tales como la edad o el sexo, entre otros). La Tabla 3 de más abajo, que es otro análisis estadístico multivariable, ilustra que la información pronóstica proporcionada por la NEP soluble no se ve afectada por otros marcadores pronósticos de la IC, el ST2 y la troponina T de alta sensibilidad, que están incluidos en el análisis, al contrario que NTproBNP, que pierde su significación estadística.

30

Por lo tanto, a partir de los datos de las Tablas 2 y 3, puede concluirse que la NEP soluble proporciona una información pronóstica independientemente de los parámetros y de los otros biomarcadores considerados en el ensayo. Y, por consiguiente, los datos proporcionados más abajo soportan el gran valor de NEP como herramienta pronóstica en los pacientes con IC.

40

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso *in vitro* de NEP soluble como marcador pronóstico de la IC en un paciente que sufre de una insuficiencia cardíaca.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso de medios para la detección de la presencia de NEP soluble en una muestra aislada para el pronóstico de una enfermedad de insuficiencia cardíaca en el método según se define en el primer aspecto de la invención.

50

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para decidir o recomendar si se inicia un régimen médico basado en inhibidores de NEP, método que comprende las etapas de (a) determinar, *in vitro*, la cantidad de NEP soluble en una muestra de ensayo del paciente; y (b) comparar el nivel obtenido en la etapa (a) con un valor de referencia, en la que si la cantidad de NEP soluble detectada en la etapa (a) es mayor que el valor de referencia, es indicativo de que el paciente podría beneficiarse de un régimen médico basado en inhibidores de NEP.

55

En la determinación del nivel de NEP soluble en una muestra de ensayo, la persona experta puede establecer, además, cuál es la terapia más adecuada que se puede recomendar ya que el nivel detectado en la muestra puede reflejar la magnitud (es decir, la gravedad) del síndrome. Cuanto mayor sea el nivel de NEP soluble determinado en la muestra de ensayo, más beneficiosa puede ser la administración de inhibidores de NEP al paciente con IC.

60

Adicionalmente, una vez se ha decidido iniciar el régimen médico porque el sujeto padece un síndrome de IC (siguiendo el método definido en el segundo aspecto de la invención), puede monitorizarse la eficacia del régimen: una disminución o un retorno al nivel normal de NEP soluble puede indicar que el paciente con IC ha reaccionado favorablemente al régimen médico, y por lo tanto, dicho régimen es eficaz; si el nivel de NEP soluble no se modifica significativamente, o aumenta, esto puede indicar que el régimen médico no es eficaz.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 representa curvas de regresión de Cox ajustadas según la edad. A- curva de supervivencia exenta de acontecimientos según el criterio de valoración compuesto primario de muerte CV u hospitalización por IC. B- curva de supervivencia para la de muerte CV. Valor mediano de NEP = 0,642 ng/ml. Línea negra = neprilisina < mediana; línea gris = neprilisina ≥ mediana.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona un método para determinar el pronóstico en un paciente que padece una IC.

"Pronóstico" se refiere a la predicción de un acontecimiento adverso (por ejemplo, mortalidad) en un paciente con una insuficiencia cardíaca. Esto puede incluir una estimación de la probabilidad de recuperación o de la probabilidad de muerte de dicho paciente. "Acontecimiento adverso" se define como el empeoramiento o la descompensación de la insuficiencia cardíaca, y la mortalidad. "Mortalidad" se define como la muerte cardiovascular (atribuible, por ejemplo, a una isquemia y a un infarto de miocardio, a una insuficiencia cardíaca, a una parada cardíaca o a un accidente cerebrovascular) y mortalidad no cardiovascular (incluyendo todas las demás causas de muerte, por ejemplo, una infección, tumores malignos). Por lo tanto, en una realización, el "mal pronóstico" se selecciona del grupo que consiste en: empeoramiento o descompensación de la insuficiencia cardíaca, y mortalidad cardiovascular. En otra realización, el mal pronóstico es el riesgo de mortalidad.

La IC, denominada también ICC, es una afección cardíaca que se produce cuando un problema en la estructura o en la función del corazón deteriora su capacidad para suministrar suficiente flujo sanguíneo que satisfaga las necesidades del organismo.

En una realización, el paciente padece una IC crónica.

Una "IC crónica" es una afección a largo plazo (meses/años) habitualmente con una sintomatología tratada estable, que está asociada con las respuestas adaptativas que realiza el corazón (por ejemplo, dilatación, hipertrofia) a una causa precipitante. Estas respuestas adaptativas, sin embargo, pueden ser perjudiciales a largo plazo y dar lugar a un empeoramiento de la afección. Los pacientes con IC crónica pueden clasificarse en pacientes con IC crónica estable, en progresión y descompensada. La descompensación en los pacientes con IC crónica muy habitualmente ocurre como consecuencia de una enfermedad intercurrente (tal como una neumonía), un infarto de miocardio, arritmias, hipertensión incontrolada o la incapacidad del paciente para mantener una adecuada restricción de fluidos, una dieta o medicación. La IC crónica, que está empeorando o descompensada, se caracteriza por presentar un cambio en los signos y en los síntomas de IC que da como resultado la necesidad de terapia urgente o de un ajuste de la terapia y la necesidad de una hospitalización.

Algunos factores habituales que precipitan la hospitalización por una insuficiencia cardíaca son, por ejemplo, una isquemia miocárdica aguda, el no cumplimiento del régimen médico (restricción de sodio y/o de líquidos), una incorrecta presión arterial alta, una fibrilación auricular y otras arritmias, una embolia pulmonar o infecciones concurrentes.

La neprilisina (NEP) es una enzima unida a membrana con un gran dominio catalítico extracelular, una única región transmembranaria y un corto dominio (27 aminoácidos) citoplasmático N-terminal. Su secuencia está disponible en la base de datos de Uniprot (versión 180, última modificación del 9 de julio de 2014) con el código de referencia P08473. Esta enzima cataliza la degradación de diversos péptidos vasodilatadores, incluyendo péptidos natriuréticos, y también contribuye a la degradación de la angiotensina II.

La forma soluble de NEP, que es la que se detecta en el método de la presente invención, es la forma de NEP que no está unida a la membrana. En una realización, la forma soluble de NEP difiere de la forma natural, con el código de referencia P08473, en que carece del dominio transmembrana e intracelular, y se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 1.

El término "paciente", según se usa en el presente documento, se refiere a un organismo vivo humano o no humano que está recibiendo atención médica o que debería recibir a atención médica debido a una enfermedad. Esto incluye

personas sin ninguna enfermedad definida que están siendo investigadas para encontrar signos de patología. Por lo tanto, los métodos y los ensayos descritos en el presente documento son aplicables tanto a enfermedades humanas como veterinarias.

- 5 En una realización del primer aspecto de la invención, cuando el nivel de NEP soluble es mayor que un valor de referencia, es indicativo de un mal pronóstico.

Como puede derivarse a partir de los resultados mostrados más abajo, el riesgo de padecer un acontecimiento adverso aumenta proporcionalmente con el aumento de los niveles de NEP. Para una desviación estándar de la transformación

- 10 logarítmica de NEP, el riesgo de padecer un acontecimiento adverso aumenta aproximadamente un 18 %.

El término “valor de referencia” mencionado en el método del primer aspecto debe entenderse como un valor predefinido del marcador molecular NEP soluble, que deriva de los niveles de dicho marcador molecular en una muestra o en un grupo de muestras. Las muestras se toman de un sujeto o de un grupo de sujetos que todavía no ha

- 15 mostrado ningún resultado adverso. La persona experta en la materia, haciendo uso del conocimiento general, es capaz de elegir el sujeto o el grupo de sujetos más adecuado para la obtención del valor de referencia.

En una realización, el valor de referencia se determina a partir de una población de pacientes que padece IC. En dichas circunstancias, si se encuentra que el nivel de NEP soluble estaba aumentado en comparación con el valor de

- 20 referencia, debería ser indicativo de que el paciente está empeorando. Y, a partir de dichos datos, el profesional clínico es capaz de tomar las decisiones apropiadas para tratar al paciente y mantenerlo vivo.

En otra realización, cuando el paciente que padece una IC está siendo monitorizado de forma rutinaria por el profesional clínico, el “valor de referencia” se puede corresponder con el nivel de NEP soluble al comienzo de la monitorización del paciente, o con el determinado en el último chequeo de salud. O como alternativa, el valor de

- 25 referencia puede ser determinado a partir de una población de pacientes que padece una IC que no ha mostrado todavía ningún resultado adverso, según se ha indicado anteriormente. De este modo, si se encuentra un aumento en el nivel de NEP soluble, sería indicativo de que el paciente está empeorando, y de que es probable que se produzca un resultado adverso. Esta información permitirá al profesional clínico optimizar el tratamiento del paciente.

- 30 Los métodos para la obtención del valor de referencia a partir del grupo de sujetos seleccionado son bien conocidos en el estado de la técnica.

Por ejemplo, en los ejemplos de más abajo, el valor de referencia, 0,642 ng, se corresponde con la mediana de los

- 35 niveles de NEP soluble determinados a partir de una población de pacientes con IC en unas instalaciones ambulatorias. Podría determinarse que los pacientes con una IC con unos niveles de NEP soluble mayores que dicho valor de referencia tendrían un aumento en el riesgo de un acontecimiento adverso de un 37 %.

En una realización de la invención la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y sobrenadantes celulares. En otra realización, la muestra es sangre, plasma o suero. En otra

- 40 realización adicional más, la muestra es suero.

En otra realización del método del primer aspecto de la invención, se determina la concentración de NEP soluble.

- 45 En una realización, el nivel de NEP soluble se determina mediante una técnica de inmunoensayo.

Un “inmunoensayo” es una prueba bioquímica que mide la presencia o la concentración de una macromolécula en una solución mediante el uso de un anticuerpo, inmunoglobulina o un fragmento de los mismos. Los inmunoensayos se presentan en muchos formatos y variaciones diferentes. Los inmunoensayos pueden llevarse a cabo en múltiples

- 50 etapas, añadiéndose y eliminándose los reactivos, o por separado en diferentes puntos del ensayo. Los ensayos multietapa se denominan a menudo inmunoensayos de separación o inmunoensayos heterogéneos. Algunos inmunoensayos pueden llevarse a cabo mediante una simple mezcla de los reactivos y de la muestra, y realizando una medición física. Dichos ensayos se denominan inmunoensayos homogéneos o menos frecuentemente inmunoensayos de no separación. A menudo se emplea el uso de un calibrador en los inmunoensayos. Los

- 55 calibradores son soluciones que se sabe que contienen el analito en cuestión, y la concentración de ese analito es generalmente conocida. La comparación de la respuesta en un ensayo de una muestra real con respecto a la respuesta del ensayo producida por los calibradores hace posible interpretar la potencia de la señal en términos de la presencia o de la concentración del analito en la muestra.

- 60 Ventajosamente, al determinar la concentración de la proteína se determina la cantidad total de NEP en la muestra, independientemente de si es activa o no, obteniendo por lo tanto una información más precisa sobre el nivel real de NEP soluble en circulación en los fluidos corporales, con las consiguientes ventajas para el pronóstico adecuado de la enfermedad.

Ventajosamente, los inmunoensayos superan algunos de los inconvenientes mostrados por los métodos enzimáticos, tales como la susceptibilidad debida al sustrato, así como el hecho de que el sitio catalítico de la enzima puede verse alterado durante las diferentes etapas de la enfermedad.

5

Los inmunoensayos pueden clasificarse generalmente como: inmunoensayos homogéneos competitivos; inmunoensayos heterogéneos competitivos; inmunoensayos no competitivos en un solo sitio; e inmunoensayos no competitivos en dos sitios.

10 En una realización, el inmunoensayo es un inmunoensayo homogéneo competitivo. En otra realización el inmunoensayo es un ELISA.

En el mercado hay disponibles diversos kits de ELISA para la determinación de la concentración de NEP soluble, tales como los comercializados por R&D Systems, Raybiotech o Aviscera Bioscience, entre otros.

15

En una realización, cuando se lleva a cabo el análisis mediante un ELISA, la muestra se diluye antes de la incubación desde 1/10 hasta 1/2. En otra realización, la muestra se diluye antes de la incubación a 1/4.

20 En otra realización, cuando se lleva a cabo el análisis mediante un ELISA, la etapa de incubación se lleva a cabo a una temperatura constante seleccionada en el intervalo de temperaturas comprendido entre 25 y 37 °C, y mezclado a 1.000 rpm. En otra realización la temperatura constante de la etapa de incubación es de 30 °C.

En otra realización, la etapa de incubación, cuando se lleva a cabo el ELISA, está comprendida entre 120 y 180 h. En otra realización la etapa de incubación es de 150 minutos.

25

En otra realización adicional más, la detección mediante el ELISA se lleva a cabo: (a) diluyendo 1/4 la muestra de suero antes de la incubación; e incubando la mezcla durante 150 minutos a 30 °C a 1.000 rpm. En dichas condiciones, los inventores han averiguado que se consigue una mejora en la sensibilidad.

30 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso de medios para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención.

En la presente invención, debe entenderse que el término "anticuerpo o un fragmento del mismo con la capacidad de unirse a la NEP soluble" es cualquier inmunoglobulina o fragmento de la misma capaz de unirse al antígeno definido por la NEP soluble. Incluye anticuerpos monoclonales y policlonales. El término "fragmento del mismo" engloba cualquier parte de un anticuerpo que tenga el tamaño y la conformación adecuados para unirse a un epítipo de NEP. Algunos fragmentos adecuados incluyen F(ab), F(ab') y Fv. Un "epítipo" es la parte del antígeno que es reconocida por el sistema inmunitario (los linfocitos B, los linfocitos T o los anticuerpos).

35

40 Existen medios bien conocidos en el estado de la técnica para la preparación y caracterización de anticuerpos. Los métodos para la generación de anticuerpos policlonales son bien conocidos en el estado de la técnica. Brevemente, se preparó un anticuerpo policlonal mediante inmunización de un animal con una composición inmunógena y recolección del suero del animal inmunizado. Puede usarse un amplio abanico de especies animales para la producción del antisuero. Los animales usados normalmente para la producción del antisuero pueden ser conejos, ratones, ratas, hámsters, cobayas o cabras.

45

Por otro lado, los anticuerpos monoclonales (AcMc) se pueden preparar fácilmente usando técnicas bien conocidas. Los procedimientos para la preparación de los anticuerpos monoclonales comienzan generalmente con las mismas líneas que para la preparación de anticuerpos policlonales. A los animales se les inyecta el antígeno según se ha indicado anteriormente. El antígeno puede mezclarse con adyuvantes, tales como adyuvante completo o incompleto de Freund. Se repite la vacunación con el mismo antígeno aproximadamente cada dos semanas. Después de la inmunización, se eligen las células somáticas con una potencial producción de anticuerpos, específicamente los linfocitos B, para su uso en el protocolo para la producción de los anticuerpos monoclonales. Estas células pueden obtenerse a partir de biopsias de bazo, de nódulos linfáticos o de amígdalas, o a partir de muestras de sangre periférica. Los linfocitos B productores de anticuerpo del animal inmunizado se fusionan, a continuación, con células procedentes de una línea de células inmortales de mieloma, generalmente de la misma especie que el animal inmunizado. Las líneas celulares de mieloma que son adecuadas para su uso en los procedimientos de fusión para la producción de hibridomas son preferentemente células no productoras de anticuerpos, pero que tienen una elevada eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que, por lo tanto, las hacen incapaces de crecer en ciertos medios de cultivo, que únicamente permiten el crecimiento de las células fusionadas deseadas (hibridomas).

50

55

60

En una realización, la NEP soluble se detecta mediante el uso de un anticuerpo policlonal, tal como los proporcionados por USCN Life Sciences Inc; LifeSpan Biosciences o RayBiotech, entre otros.

En una realización, los medios es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la NEP soluble.

5 En otra realización más, los medios forman parte de un kit.

El kit puede comprender adicionalmente otros medios (aditivos, disolventes) para visualizar las interacciones (tiras reactivas, reactivos quimioluminiscentes, reactivos turbidimétricos, etc.). Los aditivos, disolventes y reactivos adecuados para visualizar la interacción antígeno-anticuerpo se describen en los ejemplos.

10

El método *in vitro* de la invención proporciona una información pronóstica. En una realización, la información pronóstica puede recogerse en un portador de datos adecuado. Ejemplos de portador de datos adecuado son papel, CD, USB, archivos informáticos en un PC o un registro sonoro con la misma información.

15 Finalmente, en un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para decidir o recomendar si se inicia un régimen médico basado en inhibidores de NEP en un paciente que padece IC.

En una realización del cuarto aspecto de la invención, el sujeto es un paciente que padece IC.

20 En otra realización del cuarto aspecto de la invención, el sujeto es un paciente que padece IC y, cuando se comparan los niveles elevados de NEP soluble con el valor de referencia, son indicativos de un mal pronóstico.

Algunos ejemplos ilustrativos no limitantes de los inhibidores de NEP son AHU-377, un componente de LCZ696; Omapatrilat; RB-101; y UK-414.495.

25

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, la palabra "comprende" y las variaciones de la palabra, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Adicionalmente, la palabra "comprende" engloba el caso de "que consiste en". Los objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras el análisis de la descripción, o pueden ser aprendidos mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan con fines ilustrativos, y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Los signos de referencia relacionados con los dibujos y colocados entre paréntesis en una reivindicación únicamente pretenden aumentar la inteligibilidad de la reivindicación, y no deben ser interpretados como limitantes del ámbito de la reivindicación. Adicionalmente, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de las realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

30

## 35 EJEMPLOS

### 1. Métodos

#### 40 Población del estudio

Desde mayo de 2006 hasta mayo de 2013, se incluyeron consecutivamente en el estudio pacientes ambulatorios tratados en la unidad multidisciplinar de IC. Los criterios de referencia para la inclusión y la obtención de las muestras de sangre se llevaron a cabo según se describe en Bayes-Genis A. et al. (Bayes-Genis A. et al., 2012). En resumen, 45 los pacientes fueron derivados a la unidad de IC por los departamentos de cardiología o de medicina interna, y en menor grado desde las urgencias u otros departamentos del hospital. El principal criterio de referencia era una IC según las directrices de la European Society of Cardiology independientemente de la etiología, al menos una hospitalización por IC, o una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) reducida. Se analizaron la NEP y NT-proBNP a partir de la misma muestra de sangre almacenada a -80 °, sin ningún ciclo previo de congelación-descongelación. Todas las muestras se obtuvieron entre las 09:00 am y las 12:00 pm.

50

Todos los participantes proporcionaron su consentimiento informado por escrito, y el comité de ética local aprobó el estudio. Todos los procedimientos del estudio se ajustaron a los estándares éticos descritos en la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983.

55

#### Seguimiento y resultados

Se llevó a cabo un seguimiento de todos los pacientes a intervalos predefinidos regulares, con visitas adicionales según fuera necesario en caso de descompensación. El programa de visitas regulares incluía un mínimo de visitas 60 trimestrales con las enfermeras, visitas semestrales con los médicos y visitas opcionales con geriatra, psiquiatra y médico rehabilitador. Los pacientes que no acudieron a las visitas regulares fueron contactados por teléfono.

El criterio de valoración primario fue el compuesto de muerte cardiovascular (CV) u hospitalización por IC. También se exploraron la muerte CV y por cualquier causa como criterios de valoración secundarios. Una muerte se consideró de origen CV si estaba causada por: una insuficiencia cardíaca (una insuficiencia cardíaca descompensada o una insuficiencia cardíaca resistente al tratamiento, en ausencia de otra causa); muerte súbita (muerte inesperada, con o sin testigos, de un paciente previamente estable sin ningún signo de empeoramiento de la insuficiencia cardíaca o de ninguna otra causa de muerte); infarto agudo de miocardio (IAM) (directamente relacionado en el tiempo con un IAM, debido tanto a complicaciones mecánicas, hemodinámicas como arrítmicas); ictus (asociada con un déficit neurológico agudo de aparición reciente); procedimental (en relación a procedimiento post-diagnóstico o post-terapéutico); y otras causas cardiovasculares (por ejemplo, la ruptura de un aneurisma, una isquemia periférica o una disección de la aorta).

Las hospitalizaciones fueron identificadas a partir de los registros clínicos de la Unidad de IC, de las salas de hospitalización y de la historia clínica electrónica compartida de Cataluña. Los acontecimientos mortales fueron identificados a partir de los registros clínicos de la Unidad de IC, de las salas de hospitalización, de la sala de urgencias, de los médicos generales y contactando con los parientes del paciente. Adicionalmente, los datos fueron verificados a partir de las bases de datos de los sistemas sanitarios catalán y español.

#### Ensayo de neprilisina

Se midió la NEP humana mediante el uso de un inmunoensayo en sándwich modificado (HUMAN NEP/CD10 ELISA KIT, Aviscera Biosciences, Santa Clara, EE.UU., Ref. SK00724-01, Lote nº 20111893). Para mejorar la sensibilidad analítica del método y para obtener un límite inferior de la cuantificación de la muestra, se llevaron a cabo diversas modificaciones: a) se diluyeron alícuotas de suero a  $\frac{1}{4}$  en el tampón de dilución proporcionado por el fabricante (DB09) antes de la incubación; b) el kit se transfirió a una plataforma robótica automatizada (Basic Radim Immunoassay Operator 2 [BRIO 2], Radim spa, Pomezia, Italia) que lleva a cabo todas las incubaciones a una temperatura constante de 30 °C, con una mezcla a 1.000 rpm; y c) la incubación inicial de la muestra se extendió hasta 150 minutos, consiguiendo así una mayor pendiente de la curva de calibración y una mejor sensibilidad en el ensayo. El protocolo modificado mostró un intervalo de medición analítico de entre 0,250 y 16 ng/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron del 3,7 % y del 8,9 %, respectivamente.

#### Ensayo del NT-proBNP

Los niveles del NT-proBNP se determinaron en suero usando un ensayo de inmuno-electro-quimioluminiscencia con un Modular Analytics E 170 (Roche Diagnostics). Este ensayo tenía una reactividad cruzada < 0,001 % con el BNP bioactivo, y en los estudios que constituyen este informe, los ensayos tuvieron unos coeficientes de variación inter-análisis que variaban entre el 0,9 % y el 5,5 %.

#### Ensayo de la hs-cTnT

Los niveles de troponina se midieron en muestras de suero mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia usando un ensayo de la hs-cTnT con el Modular Analytics E 170 (Roche Diagnostics) y usando las instrucciones del fabricante. El ensayo de la hs-cTnT tenía un intervalo analítico de entre 3 y 10.000 ng/l. En el valor del percentil 99 de 13 ng/l, el coeficiente de variación fue del 9 %. El comportamiento analítico de este ensayo ha sido validado y es conforme con las recomendaciones del Task Force para su uso en el diagnóstico de la necrosis miocárdica.

#### Ensayo del hs-ST2

El ST2 se midió a partir de muestras de suero usando un inmunoensayo monoclonal en sándwich de alta sensibilidad (ensayo Presage™ sST2, Critical Diagnostics, San Diego, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo del hs-ST2 tuvo un coeficiente de variación intra-análisis < 2,5 % y un coeficiente de variación total del 4 %.

#### Análisis estadístico

Las variables categóricas se expresaron en forma de porcentajes. Las variables continuas se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar o la mediana (Q1-Q3) según la distribución fuera normal o no normal. La distribución normal se evaluó mediante gráficas Q-Q de normalidad (Q-Q plots). La correlación entre los niveles de NEP y edad, la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI), NT-proBNP y tasa de filtración glomerular estimada (CKD-EPI) se analizaron usando el coeficiente rho de Spearman. Las diferencias en las concentraciones de NEP entre los grupos por sexos y etiologías fueron evaluadas con la prueba de la U de Mann-Whitney. Las diferencias estadísticas (valor de P para la tendencia) en los niveles de NEP para los grupos de clase funcional de la New York Heart Association (NYHA) fueron estimadas usando la prueba de Spearman. Se llevaron a cabo análisis de regresión de Cox ajustados según la edad y se representaron gráficamente las curvas de supervivencia para el criterio de valoración primario compuesto y para la mortalidad CV con respecto a los valores medianos de NEP. También se realizaron análisis de supervivencia multivariados, usando modelos de regresión de Cox. Los valores de NEP fueron transformados logarítmicamente y se usó 1 DE para el cálculo de la proporción de riesgos (HR). Se incorporaron las siguientes



variables en el modelo: edad, sexo, etiología isquémica de la IC, FEVI, clase funcional de la NYHA, presencia de diabetes mellitus, hemoglobina (g/dl), sodio en suero (mmol/l), la tasa de filtración glomerular estimada, el NT-proBNP, tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes, tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) o con bloqueantes del receptor de la angiotensina II (BRA), y NEP. Los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, IL). Se consideró significativo una  $P < 0,05$  bilateral.

## RESULTADOS

Se midió la NEP soluble en circulación en 1.069 pacientes con IC atendidos consecutivamente desde mayo de 2006 hasta mayo de 2013. La Tabla 1 muestra las características de la situación inicial de la totalidad de la muestra y del subgrupo de pacientes que cumplía los criterios de inclusión del estudio PARADIGM-IC (clase II-IV de la NYHA, LVEF  $\leq 35$  %, NTproBNP  $\geq 600$  ng/l o NTproBNP  $\geq 400$  ng/l si había una admisión por IC en el año anterior, se trató con ACEI o ARB y con  $\beta$ -bloqueantes, salvo que estuviera contraindicado o no fueran tolerados; grupo tipo PARADIGM,  $N = 480$ ). Durante un periodo de seguimiento medio de  $4,1 \pm 2,4$  años, murieron 449, 247 por causas CV, 169 por causas no CV (37,6 %) y 33 por causas desconocidas (7,3 %). Entre las causas conocidas de muerte CV, la IC resistente fue la responsable en 128 pacientes (51,8 %), 53 pacientes (21,4 %) presentaron muerte súbita, y el infarto agudo de miocardio en 23 pacientes (9,3 %). 235 pacientes precisaron una hospitalización por IC durante el seguimiento, y 335 pacientes cumplían el criterio de valoración primario de muerte CV u hospitalización por IC. Se perdió el seguimiento de cinco pacientes, que fueron adecuadamente censurados.

### NEP soluble en circulación

Los niveles medianos de NEP soluble eran de 0,642 ng/ml (Q1-Q3 de 0,385-1,219 ng/ml). Ciento cincuenta y seis pacientes (14,6 %) tenían unos niveles de NEP por debajo del intervalo de medición analítico. Los niveles de NEP se correlacionaron modestamente pero significativamente con la edad ( $\rho = 0,16$ ,  $p < 0,001$ ); por el contrario, no se encontró ninguna correlación entre NEP y LVEF ( $\rho = 0,02$ ,  $p = 0,35$ ), la tasa de filtración glomerular estimada ( $\rho = 0,05$ ,  $p = 0,1$ ), el NTproBNP ( $\rho = -0,01$ ,  $p = 0,68$ ) o la clase funcional de la NYHA ( $p$  para la tendencia, 0,72). No hubieron diferencias por género en los niveles de NEP ( $p = 0,28$ ) pero fueron significativamente mayores en los pacientes no isquémicos con respecto a los isquémicos (0,690 ng/ml [0,450-1,401] frente a 0,611 ng/ml [0,328-1,046], respectivamente;  $p = 0,002$ ).

### NEP y resultados

Los valores de NEP ajustados por edad con respecto a la mediana estaban significativamente asociados con el criterio de valoración primario compuesto de muerte CV o de hospitalización por IC (HR 1,37 [CI al 95 % 1,11-1,69],  $p = 0,003$ ), muerte CV (HR de 1,60 [IC 95 % 1,24-2,06],  $p < 0,001$ ) y muerte por cualquier causa (HR 1,27 [IC 95 % 1,06-1,53],  $p = 0,01$ ). La Figura 1 ilustra las curvas de supervivencia divergentes para el criterio de valoración compuesto y para la muerte CV con respecto a los valores medianos de NEP.

Como variable continua, la NEP ajustada por la edad también estaba significativamente asociada con el criterio de valoración primario compuesto de muerte CV u hospitalización por IC (HR 1,17 [IC 95 % 1,06-1,29],  $p = 0,001$ ), y muerte CV (HR 1,19 [IC 95 % 1,06-1,32],  $p = 0,002$ ); con una tendencia a significación en la muerte por cualquier causa (HR 1,09 [IC 95 % 1,00-1,19],  $p = 0,06$ ). En un análisis multivariable completo que incluía NT-proBNP, la NEP soluble seguía estando significativamente asociada con el criterio de valoración primario compuesto (HR de 1,18 [IC 95 % 1,07-1,31],  $p = 0,001$ ) y con la mortalidad CV (HR de 1,18 [IC 95 % 1,05-1,32],  $p = 0,006$ ) (Tabla 2).

También se analizó un grupo de pacientes tipo PARADIGM, en esta serie de la vida real de IC, y los niveles de NEP en circulación seguían estando significativamente asociados con el criterio de valoración primario compuesto de muerte CV u hospitalización por IC en el análisis multivariable completo (HR 1,23 [IC 95 % 1,05-1,43],  $p = 0,008$ ).

En conclusión, la IC es una enfermedad clínica caracterizada por una sobre-regulación de múltiples rutas neurohormonales, que incluyen el sistema renina-angiotensina-aldosterona y los péptidos natriuréticos. En los ejes del péptido natriurético, la NEP es una enzima crucial. Los presentes inventores han demostrado por primera vez que se encuentran unos niveles elevados de NEP en circulación en los pacientes con IC, y que las concentraciones de NEP son unos indicadores de resultados adversos, tanto de mortalidad como de morbilidad CV.

Además, los datos proporcionados son indicativos de que la inhibición de NEP, ya presente en el ARNi LCZ696, es necesaria para abordar nuevos contribuyentes fisiopatológicos a la IC, y es crucial para mejorar los resultados del paciente.

Tabla 1

|    | <b>Grupo total<br/>N = 1069</b>               | <b>Pacientes tipo<br/>PARADIGM<br/>N = 480</b> |
|----|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 5  |                                               |                                                |
|    | Edad, años                                    | 66,2 ± 12,8                                    |
|    | Nº de varones, (%)                            | 768 (71,8)                                     |
| 10 | Nº de raza blanca, (%)                        | 476 (99,2)                                     |
|    | Nº según la etiología, (%)                    |                                                |
|    | Enfermedad isquémica cardíaca                 | 288 (60,0)                                     |
| 15 | Cardiomiopatía dilatada                       | 64 (13,3)                                      |
|    | Hipertenso                                    | 26 (5,4)                                       |
|    | Etoh                                          | 26 (5,4)                                       |
|    | Tóxicos (fármacos)                            | 12 (2,5)                                       |
| 20 | Valvular                                      | 33 (6,9)                                       |
|    | Otras                                         | 31 (6,5)                                       |
|    | Duración de la IC, meses <sup>†</sup>         | 20 (2-72)                                      |
|    | FEVI, en % <sup>*</sup>                       | 26,01 ± 6,4                                    |
| 25 | Nº según la clase funcional de la<br>NYHA (%) |                                                |
|    | I                                             | 0 (0)                                          |
|    | II                                            | 362 (75,4)                                     |
| 30 | III                                           | 115 (24)                                       |
|    | IV                                            | 3 (0,6)                                        |
|    | Sodio, mmol/l                                 | 138,5 ± 3,5                                    |
|    | Hemoglobina, g/dl                             | 13,0 ± 1,8                                     |
| 35 | eGFR, ml/min/1,73 m <sup>2</sup> <sup>*</sup> | 54,2 ± 25,2                                    |
|    | NT-proBNP, ng/l, <sup>†,‡</sup>               | 1824 (971-3829)                                |
|    | Neprilisina, ng/ml <sup>†</sup>               | 0,637 (0,389-1,220)                            |
|    | Hipertensión, nº, (%)                         | 292 (60,8)                                     |
| 40 | Diabetes mellitus, nº, (%)                    | 188 (39,2)                                     |
|    | Tratamiento (seguimiento), nº, (%)            |                                                |
|    | ACEI o ARB                                    | 480 (100)                                      |
| 45 | B-Bloqueante                                  | 447 (93,1)                                     |
|    | MRA                                           | 336 (70)                                       |
|    | Diurético de asa                              | 447 (93,1)                                     |
| 50 | Digoxina                                      | 197 (41)                                       |

\* Media ± desviación estándar; † Mediana (Q1-Q3); ‡ NTproBNP disponible en 1.030 pacientes. ACEI, inhibidor de la  
 55 enzima convertidora de la angiotensina; ARB, bloqueante del receptor de la angiotensina II; eGFR, tasa de filtración  
 glomerular estimada (CKD-EPI); Etoh, cardiomiopatía alcohólica; IC, insuficiencia cardíaca; LVEF, fracción de  
 eyección ventricular izquierda; MRA: antagonista del receptor de mineralcorticoides; NT-proBNP, péptido natriurético  
 pro-cerebral N-terminal; NYHA, New York Heart Association.

60

Tabla 2: análisis de regresión multivariable de Cox para el riesgo del criterio de valoración primario compuesto y la muerte CV

| Criterio de valoración primario compuesto |      |            |            | Muerte cardiovascular |            |            |
|-------------------------------------------|------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|
|                                           | PR   | IC al 95 % | Valor de P | PR                    | IC al 95 % | Valor de P |
| Edad                                      | 1,03 | 1,02-1,04  | < 0,001    | 1,04                  | 1,02-1,05  | < 0,001    |
| Mujer                                     | 0,74 | 0,58-0,95  | < 0,001    | 0,63                  | 0,46-0,86  | 0,003      |
| Etiología isquémica de la IC              | 1,09 | 0,86-1,38  | 0,50       | 1,06                  | 0,80-1,40  | 0,71       |
| LVEF                                      | 1,01 | 1,00-1,02  | 0,08       | 1,01                  | 1,00-1,02  | 0,21       |
| Clase funcional de la NYHA                | 1,61 | 1,31-1,98  | < 0,001    | 1,75                  | 1,37-2,22  | < 0,001    |
| eGFR, ml/min/1,73 m <sup>2</sup>          | 0,99 | 0,98-1,00  | 0,002      | 0,99                  | 0,99-1,00  | 0,004      |
| Diabetes sacarina                         | 1,42 | 1,14-1,77  | 0,002      | 1,42                  | 1,09-1,85  | 0,009      |
| Tratamiento con IECA o BRA                | 0,87 | 0,62-1,21  | 0,40       | 0,70                  | 0,48-1,03  | 0,07       |
| Tratamiento con bloqueante β              | 0,54 | 0,39-0,76  | < 0,001    | 0,44                  | 0,30-0,65  | < 0,001    |
| Sodio                                     | 0,99 | 0,98-1,01  | 0,37       | 0,99                  | 0,97-1,00  | 0,10       |
| Hemoglobina                               | 0,93 | 0,87-0,99  | 0,03       | 0,97                  | 0,90-1,05  | 0,44       |
| NT-proBNP*                                | 1,32 | 1,15-1,51  | < 0,001    | 1,43                  | 1,21-1,69  | < 0,001    |
| Neprilisina *                             | 1,18 | 1,07-1,31  | 0,001      | 1,18                  | 1,05-1,32  | 0,006      |

Tabla 3: análisis de regresión multivariable de Cox (retroceso paso a paso) incluyendo otros biomarcadores (NT-proBNP, Hsc-TnT y ST2) para el riesgo del criterio de valoración primario compuesto y la muerte CV.

|                                  | Criterio de valoración primario compuesto |                |            | Muerte cardiovascular |                |            |
|----------------------------------|-------------------------------------------|----------------|------------|-----------------------|----------------|------------|
|                                  | PR                                        | IC al 95 %     | Valor de P | PR                    | IC al 95 %     | Valor de P |
| Edad                             | 1,03                                      | de 1,02 a 1,04 | < 0,001    | 1,03                  | de 1,02 a 1,05 | < 0,001    |
| Mujer                            | 0,84                                      | de 0,64 a 1,10 | 0,21       | 0,75                  | de 0,54 a 1,04 | 0,09       |
| Etiología isquémica de la IC     | 1,01                                      | de 0,78 a 1,29 | 0,97       | 0,96                  | de 0,71 a 1,29 | 0,78       |
| LVEF                             | 1,01                                      | de 1,00 a 1,02 | 0,10       | 1,01                  | de 1,00 a 1,02 | 0,02       |
| Clase funcional de la NYHA       | 1,48                                      | de 1,18 a 1,96 | 0,001      | 1,56                  | de 1,20 a 2,03 | 0,001      |
| eGFR, ml/min 1,73 m <sup>2</sup> | 1,00                                      | de 0,99 a 1,00 | 0,114      | 0,99                  | de 0,99 a 1,00 | 0,08       |
| Diabetes sacarina                | 1,35                                      | de 1,07 a 1,71 | 0,01       | 1,42                  | de 1,08 a 1,87 | 0,01       |
| Tratamiento con IECA o BRA       | 0,76                                      | de 0,51 a 1,11 | 0,16       | 0,75                  | de 0,47 a 1,17 | 0,2        |
| Tratamiento con bloqueante β     | 0,64                                      | de 0,45 a 0,89 | 0,009      | 0,53                  | de 0,36 a 0,78 | 0,001      |
| Sodio                            | 0,97                                      | de 0,94 a 1,01 | 0,12       | 0,95                  | de 0,92 a 0,99 | 0,03       |
| Hemoglobina                      | 0,90                                      | de 0,84 a 0,96 | 0,002      | 0,96                  | de 0,88 a 1,04 | 0,34       |
| NT-proBNP *                      | 1,11                                      | de 0,94 a 1,31 | 0,21       | 1,19                  | de 0,97 a 1,45 | 0,09       |
| HscTnT **                        | 1,7                                       | de 1,43 a 2,03 | < 0,001    | 1,54                  | de 1,22 a 1,93 | < 0,001    |
| ST2 #†                           | 1,12                                      | de 1,02 a 1,23 | 0,02       | 1,11                  | de 0,99 a 1,24 | 0,06       |
| Neprilisina *                    | 1,16                                      | de 1,04 a 1,30 | 0,009      | 1,17                  | de 1,03 a 1,32 | 0,02       |

La PR, el IC al 95 % y el valor de p son los obtenidos en la última etapa que contiene la variable. El criterio de valoración primario compuesto se definió como la muerte cardiovascular por la hospitalización por IC. \* El NT-proBNP, la Hsc-TnT y la neprilisina como el log(NT-proBNP), el log(Hsc-TnT) y el log(neprilisina), por 1 DT; IC, intervalo de confianza; # El término cuadrático también se incluyó en el modelo debido a la relación cuadrática de las variables independientes con la variable dependiente; † por 10 ng/ml.

PR, proporción de riesgos; IC, insuficiencia cardíaca; LVEF, fracción de eyección ventricular izquierda; NYHA, New York Heart Association; eGER, tasa de filtración glomerular estimada (CKD-EPI); IECA, inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina; BRA, bloqueante del receptor de la angiotensina II; NT-proBNP, prohormona del péptido natriurético cerebral N-terminal. Hsc-TnT= troponina T cardíaca de alta sensibilidad. ST2= ST2 soluble.

## REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

Bayes-Genis A, de Antonio M, Galan A, Sanz H, Urrutia A, Cabanes R, et al. Combined Use of High Sensitivity ST2 and NTproBNP to Improve the Prediction of Death in Heart Failure. Eur J Heart Fail 2012; 14: 32-8.

5

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIO INSTITUT D'INVESTIGACIO EN CIENCIES DE LA SALUT  
GERMANS TRIAS I PUJOL

10

<120> Marcador pronóstico de IC

<130> P3130PC00

15

<150> EP14182846.7

<151> 2014-08-29

<160> 1

20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 698

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

<400> 1

30

Asp Asp Gly Ile Cys Lys Ser Ser Asp Cys Ile Lys Ser Ala Ala Arg  
1 5 10 15

Leu Ile Gln Asn Met Asp Ala Thr Thr Glu Pro Cys Thr Asp Phe Phe  
20 25 30

35

Lys Tyr Ala Cys Gly Gly Trp Leu Lys Arg Asn Val Ile Pro Glu Thr  
35 40 45

40

Ser Ser Arg Tyr Gly Asn Phe Asp Ile Leu Arg Asp Glu Leu Glu Val  
50 55 60

Val Leu Lys Asp Val Leu Gln Glu Pro Lys Thr Glu Asp Ile Val Ala  
65 70 75 80

45

Val Gln Lys Ala Lys Ala Leu Tyr Arg Ser Cys Ile Asn Glu Ser Ala  
85 90 95

50

Ile Asp Ser Arg Gly Gly Glu Pro Leu Leu Lys Leu Leu Pro Asp Ile  
100 105 110

Tyr Gly Trp Pro Val Ala Thr Glu Asn Trp Glu Gln Lys Tyr Gly Ala  
115 120 125

55

Ser Trp Thr Ala Glu Lys Ala Ile Ala Gln Leu Asn Ser Lys Tyr Gly  
130 135 140

60

Lys Lys Val Leu Ile Asn Leu Phe Val Gly Thr Asp Asp Lys Asn Ser  
145 150 155 160

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    | Val | Asn | His | Val | Ile | His | Ile | Asp | Gln | Pro | Arg | Leu | Gly | Leu | Pro | Ser |  |
|    |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| 5  | Arg | Asp | Tyr | Tyr | Glu | Cys | Thr | Gly | Ile | Tyr | Lys | Glu | Ala | Cys | Thr | Ala |  |
|    |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| 10 | Tyr | Val | Asp | Phe | Met | Ile | Ser | Val | Ala | Arg | Leu | Ile | Arg | Gln | Glu | Glu |  |
|    |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| 15 | Arg | Leu | Pro | Ile | Asp | Glu | Asn | Gln | Leu | Ala | Leu | Glu | Met | Asn | Lys | Val |  |
|    |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| 20 | Met | Glu | Leu | Glu | Lys | Glu | Ile | Ala | Asn | Ala | Thr | Ala | Lys | Pro | Glu | Asp |  |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| 25 | Arg | Asn | Asp | Pro | Met | Leu | Leu | Tyr | Asn | Lys | Met | Thr | Leu | Ala | Gln | Ile |  |
|    |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| 30 | Gln | Asn | Asn | Phe | Ser | Leu | Glu | Ile | Asn | Gly | Lys | Pro | Phe | Ser | Trp | Leu |  |
|    |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| 35 | Asn | Phe | Thr | Asn | Glu | Ile | Met | Ser | Thr | Val | Asn | Ile | Ser | Ile | Thr | Asn |  |
|    |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| 40 | Glu | Glu | Asp | Val | Val | Val | Tyr | Ala | Pro | Glu | Tyr | Leu | Thr | Lys | Leu | Lys |  |
|    |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| 45 | Pro | Ile | Leu | Thr | Lys | Tyr | Ser | Ala | Arg | Asp | Leu | Gln | Asn | Leu | Met | Ser |  |
|    | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
| 50 | Trp | Arg | Phe | Ile | Met | Asp | Leu | Val | Ser | Ser | Leu | Ser | Arg | Thr | Tyr | Lys |  |
|    |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| 55 | Glu | Ser | Arg | Asn | Ala | Phe | Arg | Lys | Ala | Leu | Tyr | Gly | Thr | Thr | Ser | Glu |  |
|    |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
| 60 | Thr | Ala | Thr | Trp | Arg | Arg | Cys | Ala | Asn | Tyr | Val | Asn | Gly | Asn | Met | Glu |  |
|    |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
| 65 | Asn | Ala | Val | Gly | Arg | Leu | Tyr | Val | Glu | Ala | Ala | Phe | Ala | Gly | Glu | Ser |  |
|    |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
| 70 | Lys | His | Val | Val | Glu | Asp | Leu | Ile | Ala | Gln | Ile | Arg | Glu | Val | Phe | Ile |  |
|    | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |
| 75 | Gln | Thr | Leu | Asp | Asp | Leu | Thr | Trp | Met | Asp | Ala | Glu | Thr | Lys | Lys | Arg |  |
|    |     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    | Ala | Glu | Glu | Lys | Ala | Leu | Ala | Ile | Lys | Glu | Arg | Ile | Gly | Tyr | Pro | Asp |  |
|    |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |
| 5  | Asp | Ile | Val | Ser | Asn | Asp | Asn | Lys | Leu | Asn | Asn | Glu | Tyr | Leu | Glu | Leu |  |
|    |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |
| 10 | Asn | Tyr | Lys | Glu | Asp | Glu | Tyr | Phe | Glu | Asn | Ile | Ile | Gln | Asn | Leu | Lys |  |
|    |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |
| 15 | Phe | Ser | Gln | Ser | Lys | Gln | Leu | Lys | Lys | Leu | Arg | Glu | Lys | Val | Asp | Lys |  |
|    | 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |
| 20 | Asp | Glu | Trp | Ile | Ser | Gly | Ala | Ala | Val | Val | Asn | Ala | Phe | Tyr | Ser | Ser |  |
|    |     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |  |
| 25 | Gly | Arg | Asn | Gln | Ile | Val | Phe | Pro | Ala | Gly | Ile | Leu | Gln | Pro | Pro | Phe |  |
|    |     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |
| 30 | Phe | Ser | Ala | Gln | Gln | Ser | Asn | Ser | Leu | Asn | Tyr | Gly | Gly | Ile | Gly | Met |  |
|    |     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |  |
| 35 | Val | Ile | Gly | His | Glu | Ile | Thr | His | Gly | Phe | Asp | Asp | Asn | Gly | Arg | Asn |  |
|    |     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |
| 40 | Phe | Asn | Lys | Asp | Gly | Asp | Leu | Val | Asp | Trp | Trp | Thr | Gln | Gln | Ser | Ala |  |
|    | 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |  |
| 45 | Ser | Asn | Phe | Lys | Glu | Gln | Ser | Gln | Cys | Met | Val | Tyr | Gln | Tyr | Gly | Asn |  |
|    |     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |  |
| 50 | Phe | Ser | Trp | Asp | Leu | Ala | Gly | Gly | Gln | His | Leu | Asn | Gly | Ile | Asn | Thr |  |
|    |     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |
| 55 | Leu | Gly | Glu | Asn | Ile | Ala | Asp | Asn | Gly | Gly | Leu | Gly | Gln | Ala | Tyr | Arg |  |
|    |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |
| 60 | Ala | Tyr | Gln | Asn | Tyr | Ile | Lys | Lys | Asn | Gly | Glu | Glu | Lys | Leu | Leu | Pro |  |
|    | 610 |     |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |  |
| 65 | Gly | Leu | Asp | Leu | Asn | His | Lys | Gln | Leu | Phe | Phe | Leu | Asn | Phe | Ala | Gln |  |
|    | 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |  |
| 70 | Val | Trp | Cys | Gly | Thr | Tyr | Arg | Pro | Glu | Tyr | Ala | Val | Asn | Ser | Ile | Lys |  |
|    |     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |  |
| 75 | Thr | Asp | Val | His | Ser | Pro | Gly | Asn | Phe | Arg | Ile | Ile | Gly | Thr | Leu | Gln |  |
|    |     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |

Asn Ser Ala Glu Phe Ser Glu Ala Phe His Cys Arg Lys Asn Ser Tyr  
675 680 685

5

Met Asn Pro Glu Lys Lys Cys Arg Val Trp  
690 695



## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la determinación del pronóstico en un paciente que padece una enfermedad de insuficiencia cardíaca (IC), comprendiendo el método la etapa de determinar el nivel de neprilisina soluble (NEP) en una muestra de ensayo del paciente.
2. El método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que cuando el nivel de NEP soluble es mayor que un valor de referencia es indicativo de un mal pronóstico.
3. El método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que el nivel de NEP soluble se determina mediante una técnica de inmunoensayo.
4. El método *in vitro* según la reivindicación 3, en el que la técnica de inmunoensayo es un ensayo en sándwich.
5. El método *in vitro* según la reivindicación 4, en el que el ensayo en sándwich es un ELISA.
6. El método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y sobrenadantes celulares.
7. El método *in vitro* según la reivindicación 6, en el que la muestra de ensayo es suero o plasma.
8. El método *in vitro* según la reivindicación 2, en el que el mal pronóstico es el riesgo de un acontecimiento cardiovascular seleccionado del grupo que consiste en: un empeoramiento o una descompensación de la insuficiencia cardíaca, y la mortalidad.
9. El método *in vitro* de la reivindicación 8, en el que el riesgo del acontecimiento cardiovascular aumenta proporcionalmente con el nivel de NEP soluble.
10. El método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que el paciente padece una IC crónica.
11. Uso *in vitro* de NEP soluble como marcador pronóstico en la IC.
12. Uso de medios para la detección de la presencia de NEP soluble en una muestra aislada para el pronóstico de una enfermedad de insuficiencia cardíaca en el método de la reivindicación 1 a 10, en el que los medios son un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la NEP soluble.
13. El uso de la reivindicación 12, en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo forma parte de un kit.
14. Un método para decidir o recomendar el inicio de un régimen médico basado en inhibidores de NEP en un sujeto que sufre una enfermedad de insuficiencia cardíaca (IC), comprendiendo el método las etapas de (a) determinar, *in vitro*, la cantidad de NEP soluble en una muestra de ensayo del sujeto; y (b) comparar el nivel obtenido en la etapa (a) con un valor de referencia, en la que si la cantidad de NEP soluble detectada en la etapa (a) es mayor que el valor de referencia, es indicativo de que el sujeto se beneficiaría de un régimen médico basado en inhibidores de NEP.

FIG. 1

