

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 050**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2014 PCT/US2014/053860**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15034897**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2014 E 14842064 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3041514**

54 Título: **Reducción del riesgo de eventos cardíacos adversos mayores**

30 Prioridad:

03.09.2013 US 201361873122 P

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

16.06.2020

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**BEHFAR, ATTA;
TERZIC, ANDRE y
CRESPO-DIAZ, RUBEN JOSE**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 767 050 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

Reducción del riesgo de eventos cardíacos adversos mayores

5 ANTECEDENTES

1. Campo técnico

10 El presente documento se refiere a métodos y a materiales para reducir el riesgo de eventos cardíacos adversos mayores. Por ejemplo, el presente documento proporciona métodos y materiales para identificar pacientes con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor, así como métodos y materiales para tratar pacientes con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor (por ejemplo, pacientes que se sometieron a intervención coronaria percutánea (PCI) para infarto de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI)).

15 2. Información de antecedentes

Algunas estrategias para reperfundir rápidamente a los pacientes que presentan STEMI han mejorado considerablemente la supervivencia en estado agudo. Sin embargo, estos pacientes albergan un riesgo significativo a largo plazo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor después, por ejemplo, de PCI para STEMI. Chiara Andreoli y John T. Parissis en Biomarcadores en *Congestive Heart Failure* (Capítulo 6 de "Biomarkers in Cardiovascular Diseases", 1 de agosto 2013, páginas 101-145, DOI: 10.1201/b15301-8), desvelan que NAP-2, GRO-alfa, ST-2, TNF- α y las metaloproteinasas de la matriz son biomarcadores en insuficiencia cardíaca. SMITH CAMILLA *et al.* en "Increased Levels of Neutrophil-Activating Peptide-2 in Acute Coronary Syndromes Possible Role of Platelet-Mediated Vascular Inflammation (JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 48, n.º 8, páginas 1591-1599), muestran que NAP-2 tiene el potencial de inducir respuestas inflamatorias en la placa aterosclerótica. Por su capacidad para estimular la activación de leucocitos y células endoteliales, tal inflamación inducida por NAP-2 podría estimular la ruptura de placa y síndromes coronarios agudos.

SUMARIO

30 El presente documento proporciona métodos y materiales para reducir el riesgo de eventos cardíacos adversos mayores. Por ejemplo, el presente documento proporciona métodos y materiales para identificar pacientes con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor, así como métodos y materiales para tratar a pacientes con riesgo de experimentar un evento cardíaco adverso mayor (por ejemplo, pacientes que se sometieron a PCI para STEMI).

35 Como se describe en el presente documento, se puede evaluar un paciente de STEMI que se sometió a PCI para determinar si ese paciente tiene un mayor riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor en lugar de identificarse como poco probable de sufrir un evento cardíaco adverso mayor. Por ejemplo, se pueden usar los perfiles de expresión de uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, 40 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19) de los siguientes polipéptidos para identificar pacientes con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor: eotaxina-3, catepsina-S, Dickopf-1 (DKK-1), folistatina, supresión de tumorigenicidad-2 (ST-2), GRO-alfa (GRO- α), interleuquina-21 (IL-21), sobreexpresión de nefroblastosoma (NOV), transferrina, inhibidor tisular de metaloproteidasa-2 (TIMP-2), receptor 1 y 2 de factor de necrosis tumoral (TNFaRI y II), oncogén 3 viral de leucemia eritroblástica (ErBb3), proteína-2 activadora de neutrófilos (NAP-2), angiostatina, ligando 25 de 45 quimioquina (CCL25), proteína 4 similar a angiopoyetina (ANGPTL4), metaloproteinasa-3 de la matriz (MMP-3) y factor- α de crecimiento transformante (TGF- α). En algunos casos, se puede tratar un paciente de infarto de miocardio o un paciente de STEMI que se sometió a PCI mediante la administración al paciente de un polipéptido NAP-2 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2. En algunos casos, un paciente que se ha de tratar se puede identificar para el tratamiento mediante la evaluación de los perfiles de expresión como se describe en el 50 presente documento. En algunos casos, los métodos y materiales proporcionados en el presente documento se pueden usar para monitorizar o confirmar que una opción particular de tratamiento de infarto de miocardio (por ejemplo, tratamiento con un polipéptido NAP-2 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2) es eficaz.

55 En general, un aspecto del presente documento presenta un método para mejorar la función cardíaca. El método comprende, o consiste esencialmente en, administrar una composición que comprende un polipéptido NAP-2 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2 a un mamífero, mejorando de ese modo la función cardíaca de dicho mamífero. La composición puede comprender el polipéptido NAP-2. La composición puede comprender el ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2. El mamífero puede ser un ser humano. El mamífero puede ser un paciente humano que se sometió a intervención coronaria percutánea para infarto de miocardio con elevación del 60 segmento ST. El método puede comprender administrar la composición durante una intervención coronaria percutánea. El método puede comprender administrar un polipéptido TGF- α o un ácido nucleico que codifica un polipéptido TGF- α al mamífero.

65 En otro aspecto, el presente documento presenta un método para mejorar la función cardíaca. El método comprende, o consiste esencialmente en, administrar una composición que comprende un polipéptido TGF- α o un ácido nucleico que codifica un polipéptido TGF- α a un mamífero, mejorando de ese modo la función cardíaca de dicho mamífero.

La composición puede comprender el polipéptido TGF- α . La composición puede comprender el ácido nucleico que codifica un polipéptido TGF- α . El mamífero puede ser un ser humano. El mamífero puede ser un paciente humano que se sometió a intervención coronaria percutánea para infarto de miocardio con elevación del segmento ST. El método puede comprender administrar la composición durante una intervención coronaria percutánea.

5 En otro aspecto, el presente documento presenta un método para mejorar la función cardíaca. El método comprende, o consiste esencialmente en, administrar una composición que comprende un polipéptido ErBb3 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido ErBb3 a un mamífero, mejorando de ese modo la función cardíaca de dicho mamífero. La composición puede comprender el polipéptido ErBb3. La composición puede comprender el ácido nucleico que codifica un polipéptido ErBb3. El mamífero puede ser un ser humano. El mamífero puede ser un paciente humano que se sometió a intervención coronaria percutánea para infarto de miocardio con elevación del segmento ST. El método puede comprender administrar la composición durante una intervención coronaria percutánea.

15 En otro aspecto, el presente documento presenta un método para mejorar la función cardíaca. El método comprende, o consiste esencialmente en, administrar una composición que comprende un inhibidor de la expresión o actividad de los polipéptidos eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angiotatina, CCL25, ANGPTL4 y/o MMP-3 a un mamífero, mejorando de ese modo la función cardíaca de dicho mamífero. El mamífero puede ser un ser humano. El mamífero puede ser un paciente humano que se sometió a intervención coronaria percutánea para infarto de miocardio con elevación del segmento ST. El método puede comprender administrar la composición durante una intervención coronaria percutánea.

25 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento para poner en práctica la invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias que se mencionan en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

30 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción posterior. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

35 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A y 1B demuestran que la aspiración de trombo coronario durante STEMI proporciona el recurso serológico para la evaluación proteómica de alto rendimiento.

40 La Figura 1A (LAD; panel izquierdo) es una representación angiográfica de un trombo oclusivo en la arteria descendente anterior izquierda. Los paneles central y derecho representan las etapas realizadas para aspirar el coágulo y el sangrado coronario del vaso ocluido.

La Figura 1B es una representación de la extracción de un coágulo a través de un catéter de aspiración coronaria y la recogida de muestra en una jeringa de vacío. La evaluación proteómica de alto rendimiento documenta el contenido de proteínas de la sangre coronaria ocluida en el momento de la reperfusión en STEMI.

45 Las Figuras 2A-2D proporcionan una evaluación clínica de cohortes de pacientes protegidos y vulnerables.

La Figura 2A proporciona el modelo de riesgo de la clínica Mayo de puntuación de eventos cardíacos adversos mayores para cada paciente en el momento de STEMI.

La Figura 2B proporciona el porcentaje de pacientes que reciben el agente farmacológico respectivo.

50 La Figura 2C proporciona parámetros ecocardiográficos.

La Figura 2D proporciona el cambio en la fracción de eyección y la supervivencia dos años después de STEMI.

La Figura 3A proporciona las concentraciones de citoquinas indicadas en cohortes protegidas y vulnerables.

La Figura 3B proporciona las curvas de ROC para cada citoquina de la Figura 3A.

La Figura 4 contiene gráficos de barras que representan curvas estándares para la citoquina indicada.

La Figura 5 contiene gráficos de barras que representan curvas estándares para la citoquina indicada.

55 La Figura 6 contiene gráficos de barras que representan curvas estándares para la citoquina indicada.

La Figura 7 contiene gráficos de barras que representan curvas estándares para la citoquina indicada.

La Figura 8 contiene gráficos de barras que representan curvas estándares para la citoquina indicada.

La Figura 9 contiene gráficos de barras que representan curvas estándares para la citoquina indicada.

60 La Figura 10 contiene gráficos de barras que representan curvas estándares para la citoquina indicada.

La Figura 11 contiene gráficos de barras que representan concentraciones de citoquinas en cortes protegidas y vulnerables.

La Figura 12 contiene curvas ROC para las citoquinas indicadas.

La Figura 13 contiene una tabla con la sensibilidad y especificidad frente a citoquinas junto con el papel patobiológico en el infarto de miocardio.

65 La Figura 14A es un diagrama de una red de interacción de 19 citoquinas identificadas (fuente en negrita).

La Figura 14B es una distribución de grado de red, $P(k)$ frente al grado (k) , y la distribución de coeficiente de

agrupamiento, (C[k]) frente a (k), que indica una arquitectura de red sin escala no estocástica y tendencias jerárquicas de red, respectivamente.

La Figura 14C es un gráfico de barras de funciones moleculares y fisiológicas priorizadas, y la Figura 14D es un gráfico de barras de rutas canónicas priorizadas.

5 Las Figuras 15A-15C demuestran el análisis funcional de las proteínas del lecho coronario en la lesión por reperusión de isquemia cardíaca.

La Figura 15A contiene una línea temporal de experimentos en animales: recogida de datos, cirugía y terapia.

La Figura 15B contiene datos de tinción de fibrosis PTAH y cuantificación en solución salina (n = 20) y grupos tratados con factor de crecimiento (n = 10).

10 La Figura 15C contiene datos de un análisis ecocardiográfico de ambos grupos que demuestran beneficio funcional en los ratones tratados con factor de crecimiento (n = 6) en comparación con solución salina (n = 12).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 El presente documento proporciona métodos y materiales para reducir el riesgo de eventos cardíacos adversos mayores. Por ejemplo, el presente documento proporciona métodos y materiales para identificar pacientes con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor, así como métodos y materiales para tratar pacientes con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor (por ejemplo, pacientes que se sometieron a PCI para STEMI). Algunos ejemplos de eventos cardíacos adversos mayores incluyen, sin limitación, muerte, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio recurrente, y hospitalización repetida para eventos relacionados con el corazón.

20 Como se describe en el presente documento, se pueden usar los niveles de expresión de uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, o 19) de los siguientes polipéptidos en una muestra de suero obtenida de un paciente de infarto de miocardio (por ejemplo, un paciente de STEMI que se sometió a PCI) para identificar a los pacientes con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor: eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, ErBb3, NAP-2, angiotatina, CCL25, ANGPTL4, MMP-3 y TGF- α . Por ejemplo, si un paciente de infarto de miocardio (por ejemplo, un paciente de STEMI que se sometió a PCI) contiene suero (por ejemplo, suero coronario) con un nivel elevado de uno o más de eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angiotatina, CCL25, ANGPTL4 y MMP-3, entonces se puede clasificar al paciente con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor. En algunos casos, si un paciente de infarto de miocardio (por ejemplo, un paciente de STEMI que se sometió a PCI) contiene suero (por ejemplo, suero coronario) con un nivel reducido de uno o más de ErBb3, NAP-2 y TGF- α , entonces se puede clasificar al paciente con riesgo de experimentar un evento cardíaco adverso mayor. En algunos casos, si un paciente de infarto de miocardio (por ejemplo, un paciente de STEMI que se sometió a PCI) contiene suero (por ejemplo, suero coronario) con un nivel elevado de uno o más de eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angiotatina, CCL25, ANGPTL4 y MMP-3 y un nivel reducido de uno o más de ErBb3, NAP-2 y TGF- α , entonces se puede clasificar al paciente con riesgo de experimentar un evento cardíaco adverso mayor.

40 Un polipéptido humano eotaxina-3 puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_006063.1 (N.º GI. 10344) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_006072 (N.º GI. 10344). Un polipéptido humano catepsina-S puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_004070.3 (N.º GI. 1520) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_004079.4 (N.º GI. 1520). Un polipéptido humano DKK-1 puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_036374.1 (N.º GI. 22943) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_012242 (N.º GI. 22943). Un polipéptido humano folistatina puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_037541.1 (N.º GI. 10468) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_013409.2 (N.º GI. 10468). Un polipéptido humano ST-2 puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de 3GenBank® BAA02233 (N.º GI. 6761) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® D12763.1 (N.º GI 6761). Un polipéptido humano GRO- α puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_001502.1 (N.º GI. 2919) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_001511 (N.º GI. 2919). Un polipéptido humano IL-21 puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_068575.1 (N.º GI. 59067) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_021803 (N.º GI. 59067). Un polipéptido humano NOV puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_002505.1 (N.º GI. 4856) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_002514 (N.º GI. 4856). Un polipéptido humano transferrina puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_001054.1 (N.º GI. 7018) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_001063.3 (N.º GI. 7018). Un polipéptido humano TIMP-2 puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_003246.1 (N.º GI. 7077) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_003255.4 (N.º GI. 7077). Un polipéptido humano TNFaRI puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de

Registro de GenBank® NP_001056.1 (N.º Gl. 7132) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_001065 (N.º Gl. 7132). Un polipéptido humano TNFaRII puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_001057.1 (N.º Gl. 7133) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_001066 (N.º Gl. 7133). Un polipéptido humano ErBb3 puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_001005915.1 o NP_001973.2 (N.º Gl. 2065) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_001005915.1 o NM_001982.3 (N.º Gl. 2065). Un polipéptido humano NAP-2 puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_002695.1 (N.º Gl. 5473) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_002704 (N.º Gl. 5473). Un polipéptido humano angiotatina puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_000292 (N.º Gl. 5340) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_000301 (N.º Gl. 5340). Un polipéptido humano CCL25 puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_005615.2 (N.º Gl. 6370) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_005624 (N.º Gl. 6370). Un polipéptido humano ANGPTL4 puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_001034756.1 o NP_647475.1 (N.º Gl. 51129) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_001039667.1 o NM_139314.1 (N.º Gl. 51129). Un polipéptido humano MMP-3 puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_002413.1 (N.º Gl. 4314) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_002422 (N.º Gl. 4314). Un polipéptido humano TGF- α puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NP_003227.1 (N.º Gl. 7039) y puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos que se expone en el N.º de Registro de GenBank® NM_003236 (N.º Gl. 7039).

La expresión "nivel elevado", como se usa en el presente documento con respecto al nivel de un polipéptido (por ejemplo, una polipéptido eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angiotatina, CCL25, ANGPTL4 o MMP-3), es cualquier nivel que sea mayor que (por ejemplo, al menos aproximadamente un 10, 15, 20 o 25 por ciento mayor que) un nivel de referencia para ese polipéptido. La expresión "nivel reducido", como se usa en el presente documento con respecto al nivel de un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido ErBb3, NAP-2 o TGF- α), es cualquier nivel que sea menor que (por ejemplo, al menos aproximadamente un 10, 15, 20, o 25 por ciento menos que) un nivel de referencia para ese polipéptido. La expresión "nivel de referencia", como se usa en el presente documento con respecto a un polipéptido eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, ErBb3, NAP-2, angiotatina, CCL25, ANGPTL4, MMP-3, o TGF- α , es el nivel de expresión de ese polipéptido observado por lo general en seres humanos sanos o pacientes humanos con bajo riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor. Por ejemplo, un nivel de referencia de expresión de eotaxina-3 puede ser el nivel medio de expresión de eotaxina-3 que está presente en muestras obtenidas de una toma de muestras aleatoria de 50 seres humanos sanos sin evidencia de problemas cardíacos. Se ha de entender que se usan niveles de muestras comparables cuando se determina si un nivel particular es, o no es, un nivel elevado o un nivel reducido. En algunos casos, el nivel de referencia de la expresión de polipéptidos puede ser una relación de un valor de expresión de ese polipéptido en una muestra con respecto a un valor de expresión de un polipéptido de control en la muestra. Un polipéptido de control puede ser cualquier polipéptido que tenga una variación mínima en el nivel de expresión en diversas muestras del tipo para el que el polipéptido sirve como control. Por ejemplo, los polipéptidos albúmina, proteína C reactiva o NT-proBNP se pueden usar como polipéptidos de control. En algunos casos, el nivel de referencia de la expresión de polipéptido puede ser una relación de un valor de expresión de ese polipéptido en una muestra con respecto al nivel de proteína total en la muestra.

Un nivel elevado de expresión de los polipéptidos eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angiotatina, CCL25, ANGPTL4 o MMP-3 puede ser cualquier nivel siempre que el nivel sea al menos aproximadamente un 10 por ciento mayor que (por ejemplo, al menos aproximadamente un 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 por ciento mayor que) un nivel de referencia correspondiente. Por ejemplo, un nivel elevado de expresión de eotaxina-3 puede ser un 15 por ciento o más mayor que el nivel de referencia para la expresión de eotaxina-3.

Un nivel reducido de expresión de los polipéptidos ErBb3, NAP-2 o TGF- α puede ser cualquier nivel siempre que el nivel sea al menos aproximadamente un 10 por ciento menor que (por ejemplo, al menos aproximadamente un 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 por ciento menor que) un nivel de referencia correspondiente. Por ejemplo, un nivel reducido de expresión de ErBb3 puede ser un 15 por ciento o más menor que el nivel de referencia para la expresión de ErBb3.

Se puede usar cualquier método apropiado para determinar los niveles de expresión de un polipéptido en una muestra de suero. Por ejemplo, se pueden usar ELISA y otros ensayos inmunológicos para determinar el nivel de eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, ErBb3, NAP-2, angiotatina, CCL25, ANGPTL4, MMP-3 y/o TGF- α en una muestra de suero.

Una vez se han determinado los niveles de expresión uno o más de los polipéptidos eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNF α RI, TNF α R2, ErBb3, NAP-2, angiostatina, CCL25, ANGPTL4, MMP-3 y/o TGF- α en una muestra de un paciente, a continuación los niveles se pueden comparar con los niveles de referencia y usar para evaluar la probabilidad de que el paciente sufra un evento cardíaco adverso mayor. Aquellos pacientes que se determine que es probable que sufran un evento cardíaco adverso mayor, como se describe en el presente documento, se pueden someter a una mayor monitorización y/o se pueden tratar con una opción de tratamiento adecuada. Por ejemplo, un paciente que se ha identificado que es probable que sufra un evento cardíaco adverso mayor, como se describe en el presente documento, se puede tratar con farmacoterapia agresiva (por ejemplo, tratamientos de bloqueo de receptores beta adrenérgicos, tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, tratamientos de antagonismo de aldosterona y/o tratamiento con agentes antiplaquetarios), soporte hemodinámico (por ejemplo, bomba de balón intraaórtico y/o aumento mecánico del gasto cardíaco), intervención quirúrgica (por ejemplo injerto de derivación coronaria o colocación del dispositivo de asistencia ventricular izquierda) y/o intervención basada en dispositivo (por ejemplo, terapia de resincronización o desfibriladores cardíacos implantables).

En algunos casos, un paciente con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor (por ejemplo, un paciente que se ha identificado que es probable que sufra un evento cardíaco adverso mayor como se describe en el presente documento) se puede tratar por aumento del nivel de expresión del polipéptido NAP-2, por aumento del nivel de expresión del polipéptido TGF- α , por aumento del nivel de expresión del polipéptido ErBb3, o por aumento de los niveles de una combinación de dos cualesquiera de la expresión del polipéptido NAP-2, la expresión del polipéptido TGF- α , y la expresión del polipéptido ErBb3 (por ejemplo, una combinación de la expresión tanto del polipéptido NAP-2 como del polipéptido TGF- α). En algunos casos, un paciente con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor (por ejemplo, un paciente que se ha identificado que es probable que sufra un evento cardíaco adverso mayor como se describe en el presente documento) se puede tratar por aumento del nivel de expresión del polipéptido NAP-2, por aumento del nivel de expresión del polipéptido TGF- α , y por aumento del nivel de expresión del polipéptido ErBb3. Un nivel aumentado de polipéptido NAP-2, expresión de polipéptido TGF- α , y/o expresión de polipéptido ErBb3 se puede usar para reducir el tamaño cicatricial y la remodelación del tejido y para mejorar la función cardíaca. Por ejemplo, un área de fibrosis que refleja el tamaño cicatricial de la lesión se puede reducir de un 10 a un 100 por ciento (por ejemplo, de un 10 a un 90 por ciento, de un 10 a un 80 por ciento, de un 10 a un 70 por ciento, de un 10 a un 60 por ciento, de un 10 a un 50 por ciento, de un 20 a un 100 por ciento, de un 30 a un 100 por ciento, o de un 20 a un 60 por ciento) después de la administración de polipéptidos NAP-2 o ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, polipéptidos TGF- α o un ácido nucleico que codifica un polipéptido TGF- α , polipéptidos ErBb3 o ácido nucleico que codifica un polipéptido ErBb3, o las combinaciones de los mismos. En algunos casos, la remodelación de tejido cardíaco se puede reducir de un 10 a un 100 por ciento (por ejemplo, de un 10 a un 90 por ciento, de un 10 a un 80 por ciento, de un 10 a un 70 por ciento, de un 10 a un 60 por ciento, de un 10 a un 50 por ciento, de un 20 a un 100 por ciento, de un 30 a un 100 por ciento, o de un 20 a un 60 por ciento) después de la administración de polipéptidos NAP-2 o ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, polipéptidos TGF- α o un ácido nucleico que codifica un polipéptido TGF- α , polipéptidos ErBb3 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido ErBb3, o las combinaciones de los mismos. Algunos ejemplos de mejora de la función cardíaca incluyen, sin limitación, aumento de la supervivencia, reducción de la hospitalización, tolerancia sin síntomas a la actividad física, mejora del estado de forma física general, mejora de la fracción de eyección cardíaca, mejora del gasto cardíaco, mejora del volumen sistólico, mejora del índice de masa cardíaca, y reducción del tamaño cicatricial.

En algunos casos, el nivel de expresión de polipéptido NAP-2, polipéptido TGF- α y/o polipéptido ErBb3 se puede aumentar por administración de una composición que contiene los polipéptidos NAP-2, TGF- α y/o ErBb3. En algunos casos, el nivel de expresión de polipéptido NAP-2, polipéptido TGF- α y/o polipéptido ErBb3 se puede aumentar por administración de uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN) que codifican un polipéptido NAP-2, polipéptido TGF- α y/o polipéptido ErBb3 a las células del paciente (por ejemplo, células madre residentes o cultivadas exógenamente). Tal ácido nucleico puede codificar un polipéptido NAP-2 de longitud completa, un polipéptido TGF- α de longitud completa y/o un polipéptido ErBb3 de longitud completa. En algunos casos, un ácido nucleico que codifica un fragmento de un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 que retiene al menos cierta actividad biológica se puede usar, como se describe en el presente documento, para reducir el tamaño cicatricial y la remodelación de tejido y/o para mejorar la función cardíaca.

Se puede administrar un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 (o un fragmento de los mismos) a un paciente usando cualquier método apropiado. Por ejemplo, se puede administrar un ácido nucleico a un ser humano usando un vector tal como un vector viral.

Los vectores para administrar ácidos nucleicos (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 (o fragmentos de los mismos)) a un mamífero se conocen en la técnica y se pueden preparar usando materiales estándar (por ejemplo, empaquetamiento de líneas celulares, virus auxiliares, y construcciones de vectores). Véanse, por ejemplo, Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine), editado por Jeffrey R. Morgan, Humana Press, Totowa, NJ (2002) y Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, editado por Curtis A. Machida, Humana Press, Totowa, NJ (2003). Los vectores de suministro de ácido nucleico basados en virus se obtienen por lo general a partir de virus de animales, tales como adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus, virus vaccinia, virus herpes y virus del papiloma. Los lentivirus son un género

de retrovirus que se puede usar para infectar células. Los adenovirus contienen un genoma lineal de ADN de doble cadena que se puede diseñar para inactivar la capacidad del virus de replicarse en el ciclo de vida lítico normal. Los adenovirus y los virus adenoasociados se pueden usar para infectar células.

5 Los vectores para el suministro de ácidos nucleicos se pueden modificar genéticamente de un modo tal que se altere o elimine la patogenicidad del virus. El genoma de un virus se puede modificar para aumentar la infectividad y/o acomodar el empaquetamiento de un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 (o un fragmento de los mismos). Un vector viral puede ser competente en la replicación o defectuoso en la replicación, y puede contener menos genes virales que un virus de tipo natural correspondiente o ningún gen viral.

10 Además del ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 (o un fragmento de los mismos), un vector viral puede contener elementos reguladores unidos operativamente a un ácido nucleico que codifica el polipéptido o polipéptidos (o un fragmento de los mismos). Dichos elementos reguladores pueden incluir secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, elementos de respuesta, péptidos de señal, secuencias internas de entrada al ribosoma, señales de poliadenilación, terminadores, o elementos inducibles que modulan la expresión (por ejemplo, transcripción o traducción) de un ácido nucleico. La elección del elemento o elementos que se pueden incluir en un vector viral depende de varios factores, que incluyen, sin limitación, inducibilidad, focalización, y el nivel de expresión deseado. Por ejemplo, se puede incluir un promotor en un vector viral para facilitar la transcripción de un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3. Un promotor puede ser constitutivo o inducible (por ejemplo, en presencia de tetraciclina), y puede afectar la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 de forma general o específica para tejidos. Los promotores específicos para tejidos incluyen, sin limitación, un promotor de MHC cardíaco específico, un promotor de troponina, y un promotor de MLC2v.

25 Como se usa en el presente documento, "unido operativamente" se refiere al posicionamiento de un elemento regulador en un vector con respecto a un nucleico ácido de un modo tal que permita o facilite la expresión del polipéptido codificado. Por ejemplo, un vector viral puede contener un promotor específico cardíaco y un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3. En este caso, un promotor de MHC específico cardíaco está unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 de modo que impulse la transcripción en las células cardíacas.

30 En algunos casos, un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 (o un fragmento de los mismos) se puede administrar a células usando vectores no virales. Los expertos en la materia conocen métodos para usar vectores no virales para el suministro de ácidos nucleicos. Véase, por ejemplo, Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine), editado por Jeffrey R. Morgan, Humana Press, Totowa, NJ (2002). Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 se puede administrar a un mamífero por inyección directa de las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, plásmidos) que comprenden el ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3, o por administración de moléculas de ácido nucleico que forman un complejo con lípidos, polímeros o nanoesferas.

35 Un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 (o un fragmento de los mismos) se puede producir mediante técnicas convencionales, que incluyen, sin limitación, clonación molecular común, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnicas químicas de síntesis de ácidos nucleicos y las combinaciones de tales técnicas. Por ejemplo, se puede usar PCR o RT-PCR con cebadores de oligonucleótido diseñados para amplificar el ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN genómico) que codifica un polipéptido NAP-2, un polipéptido TGF- α y/o un polipéptido ErBb3 (o un fragmento de los mismos).

40 En algunos casos, un paciente con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor (por ejemplo, un paciente que se ha identificado que es probable que sufra un evento cardíaco adverso mayor como se describe en el presente documento) se puede tratar por reducción en el nivel de expresión de uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) de los siguientes polipéptidos: eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angioestatina, CCL25, ANGPTL4 y/o polipéptidos MMP-3. Se puede usar una reducción en el nivel de uno o más de estos polipéptidos para reducir el tamaño cicatricial y la remodelación de tejido y para mejorar la función cardíaca. Por ejemplo, un área de fibrosis que refleja el tamaño cicatricial de una lesión se puede reducir de un 10 a 100 por ciento (por ejemplo, de un 10 a 90 por ciento, de un 10 a 80 por ciento, de un 10 a 70 por ciento, de un 10 a 60 por ciento, de un 10 a 50 por ciento, de un 20 a 100 por ciento, de un 30 a 100 por ciento, o de un 20 a 60 por ciento) después de la administración de una composición diseñada para reducir la expresión o actividad de los polipéptidos eotaxina-3, catepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angioestatina, CCL25, ANGPTL4 y/o MMP-3. En algunos casos, la remodelación de tejido cardíaco se puede reducir de un 10 a 100 por ciento (por ejemplo, de un 10 a 90 por ciento, de un 10 a 80 por ciento, de un 10 a 70 por ciento, de un 10 a 60 por ciento, de un 10 a 50 por ciento, de un 20 a 100 por ciento, de un 30 a 100 por ciento, o de un 20 a 60 por ciento) después de la administración de una composición diseñada para reducir la expresión o actividad de los polipéptidos eotaxina-3,

cathepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angiostatina, CCL25, ANGPTL4, y/o MMP-3. Algunos ejemplos de mejora de la función cardíaca incluyen, sin limitación, aumento de la supervivencia, reducción de la hospitalización, tolerancia sin síntomas a la actividad física, mejora del estado de forma física general, mejora de la fracción de eyección cardíaca, mejora del gasto cardíaco, mejora del volumen sistólico, mejora del índice de masa cardíaca, y reducción del tamaño cicatricial.

En algunos casos, el nivel de expresión de los polipéptidos eotaxina-3, cathepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angiostatina, CCL25, ANGPTL4, y/o MMP-3 se puede reducir por administración de una composición que contiene una molécula de ARNi o antisentido (por ejemplo, una molécula de ARNip o una molécula de ARNhp) diseñada para reducir la expresión polipeptídica de un polipéptido eotaxina-3, cathepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angiostatina, CCL25, ANGPTL4 o MMP-3. En algunos casos, el nivel de actividad del polipéptido eotaxina-3, cathepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angiostatina, CCL25, ANGPTL4, o MMP-3 se puede reducir por administración de un inhibidor de la actividad del polipéptido eotaxina-3, cathepsina-S, DKK-1, folistatina, ST-2, GRO- α , IL-21, NOV, transferrina, TIMP-2, TNFaRI, TNFaRII, angiostatina, CCL25, ANGPTL4 o MMP-3.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - La firma diferencial de proteoma de suero coronario en seres humanos que padecen infarto agudo de miocardio identifica pacientes vulnerables

Diseño del estudio

Se sometieron pacientes de entre 40 y 82 años a una aspiración de trombo coronario antes de PCI para STEMI. Los aspirados coronarios frescos se almacenaron en tubos de EDTA y se centrifugaron a 4 °C. Se recogió el sobrenadante de suero, se trató con un inhibidor de proteasa, se dividió en alícuotas de trabajo, se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido, y se almacenó a -80 °C en los 60 minutos posteriores a la toma de muestras coronarias. Se utilizó el Modelo de Riesgo de la Clínica Mayo de puntuación de MACE y TIMI para la estratificación en el momento del infarto de miocardio, y se inscribieron y siguieron los pacientes identificados de riesgo no elevado (n = 25). Los que padecieron muerte, infarto recurrente, o insuficiencia cardíaca (MACE) en un período de seguimiento de dos años se clasificaron como vulnerables (n = 11), mientras que los que no se clasificaron como protegidos (n = 14).

Evaluación de la proteómica

Las muestras de suero coronario almacenadas se descongelaron solo una vez y se prepararon para análisis de matriz de anticuerpos basado en ELISA (Quantibody Human Array-6000, RayBiotech) para cuantificar 280 citoquinas distintas. Las muestras de suero se diluyeron 1:5 con diluyente de muestra. Los portaobjetos de matriz de proteína de vidrio se dejaron equilibrar y secar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Cada cámara dentro del portaobjetos se bloqueó durante 30 minutos. Los estándares para cada citoquina se prepararon como ocho diluciones seriadas y se añadieron a las cámaras respectivas, mientras que las cámaras restantes recibieron 100 μ l de suero. Después de incubación durante una noche a 4 °C, los portaobjetos se lavaron durante un total de 35 minutos. Se añadió un agente de marcaje biotinado a cada cámara y se incubó durante una noche a 4 °C. Los portaobjetos se lavaron durante 35 minutos adicionales y se incubaron con Cy3-estreptoavidina durante 1 hora con protección de la luz a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron y se centrifugaron durante 3 minutos a 1.000 rpm. Los portaobjetos secos se analizaron utilizando el software Axon GenePix Pro 6 de Molecular Devices para generar una curva estándar para cada citoquina y determinar las concentraciones individuales en suero coronario.

Análisis de red

Las proteínas de la matriz expresadas diferencialmente se enviaron para análisis de red utilizando Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPKB, Ingenuity Systems, "www" punto "ingenuity.com") para identificar las subredes funcionales asociadas. Estas se fusionaron en un interactoma compuesto en IPKB y se representaron usando el programa de visualización de red Cytoscape 2.8.2, caracterizándose la topología de red usando Network Analyzer (Smoot *et al.*, Bioinformatics, 27(3):431-2 (2011)). Las propiedades calculadas incluyeron grado de nodo (k), distribución de grado (P[k]) y distribución de coeficiente de agrupación (C[k]), cuya obtención se ha descrito en otras publicaciones (Arrell *et al.*, Stem Cells, 26(2):387-400 (2008)); Zlatkovic-Lindor *et al.*, Stem Cells, 28(8):1355-67 (2010); y Crespo-Diaz *et al.*, Cell Transplant., 20(6):797-811 (2011)). IPKB también priorizó funciones moleculares y fisiológicas sobrerrepresentadas y rutas canónicas asociadas a la red de interacción resuelta.

Estudios en animales

Se llevó a cabo cirugía en 48 ratones C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad con un 1-2 % de isoflurano. La arteria descendente anterior izquierda (LAD) se ligó temporalmente durante 60 minutos con el animal anestesiado durante todo este período de tiempo. Esto fue seguido por la restauración del flujo sanguíneo durante 5-10 minutos. La región suministrada por LAD se inyectó 5 veces con 2,5 µl de solución salina o factores de crecimiento. Las concentraciones utilizadas para las inyecciones de NAP-2 y TGF-α fueron de 5-25 ng por inyección y 4-20 ng por inyección, respectivamente.

La profilaxis del dolor se implementó mediante un régimen de acetaminofeno (100-300 mg/kg en agua potable) durante 2 días antes y 5 días después de la cirugía. Antes de la cirugía, los ratones se aleatorizaron en grupos de solución salina (n = 12) o tratados con factor de crecimiento (n = 6) en formato 2:1. Las personas implicadas en la realización de la cirugía y en la recogida y análisis de datos ecocardiográficos trabajaron en condiciones ciegas durante todo el estudio. La función y estructura cardíaca se cuantificaron prospectivamente por ecocardiografía utilizando un transductor de 30 MHz hasta 1 mes después de la lesión por isquemia-reperfusión. La fracción de eyección se definió como $[(LVVd - LVVs) / LVVd] \times 100$, donde LVVd es el volumen diastólico final de LV y LVVs es el volumen sistólico final de LV.

Análisis estadístico

Este trabajo se diseñó para evaluar los cambios serológicos en la concentración de 280 citoquinas. Los datos clínicos de los pacientes se analizaron como el valor medio \pm SD y se compararon entre los grupos con el ensayo t de Student de 2 muestras o la mediana \pm intervalo intercuartil. Las concentraciones de citoquinas se presentaron como la mediana \pm intervalo intercuartil y se analizaron mediante la estadística no paramétrica del ensayo U de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0,05$. Se construyeron curvas de característica operativa de receptor (ROC) para evaluar el potencial de pronóstico de cada citoquina para la estratificación del paciente de STEMI antes de PCI. Los valores p del análisis de red se calcularon utilizando el ensayo exacto de Fisher, que determina la probabilidad de que la asociación entre las proteínas y funciones del conjunto de datos o las vías canónicas se expliquen solo por casualidad. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software SAS JMP 9.0 y MedCalc, versión 12.2.1.

Resultados

Huella digital molecular del suero coronario

Se obtuvo un aspirado de trombo coronario de pacientes de STEMI con una lesión coronaria oclusiva. Se llevó a cabo la trombectomía antes de PCI con una endoprótesis vascular liberadora de fármaco (Figura 1A). Los aspirados de pacientes se incluyeron en el estudio si la intervención coronaria se realizó sin complicaciones y se restableció el flujo de TIMI-0 a TIMI-3. Todos los pacientes se manejaron de acuerdo con las directrices de prácticas ACC/AHA (Kushner *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol., 54 (23):2205-41 (2009)). El trombo aspirado y la sangre coronaria se procesaron para extracción de plasma y se sometieron a evaluación proteómica con generación de un mapa térmico que representa el perfil de expresión de proteínas plasmáticas para cada paciente (Figura 1B).

Discriminación de cohortes de STEMI vulnerables frente a protegidos

Durante un período de seguimiento de 2 años, los pacientes con eventos adversos cardíacos mayores se clasificaron como vulnerables (n = 11), y los pacientes sin eventos adversos cardíacos mayores se clasificaron como protegidos (n = 14). No se observaron diferencias en la demografía y los factores de salud cardiovascular (Tabla 1) entre las dos cohortes. Se calcularon varios modelos de estratificación de riesgo para cada paciente. En especial, la puntuación de riesgo TIMI para probabilidad de muerte durante la hospitalización y hasta 6 meses fue baja en ambas cohortes de pacientes ($5,5 \pm 2$ en vulnerables y $4 \pm 4,5$ en protegidos, $p = 0,08$) (Tabla 1) (Morrow *et al.*, JAMA, 286 (11):1356-9 (2001) y Morrow *et al.*, Circulation, 102 (17): 2031-7 (2000)). El Modelo de Riesgo de la Clínica Mayo de MACE validó la puntuación TIMI, colocando a ambos grupos en la categoría de riesgo no elevado ($5,5 \pm 3$ en vulnerable y 4 ± 2 en protegido, $p = 0,22$) (Figura 2A) (Singh *et al.*, J. Am. Coll Cardiol., 40 (3):387-93 (2002)). Sin embargo, la evaluación ecocardiográfica reveló una reducción importante en la fracción de eyección (-18 ± 7 %) en el grupo vulnerable en comparación con el cambio limitado ($-0,5 \pm 2,2$ %) en el grupo protegido (Figura 2D; $p < 0,05$). La supervivencia fue de un 65 % en el grupo vulnerable frente a un 100 % en el grupo protegido (Figura 2D).

Tabla 1. Características basales del grupo de pacientes de STEMI.

Características basales	Corte protegida n = 14	Corte vulnerable n = 11
Edad en años	67 (8)	69,5 (10)
Mujeres, %	50 %	40 %
Niveles de troponina, ng/ml mediana	4 (3,22)	8 (16,3)
Proteína C reactiva, mg/litro	3 (11,4)	3 (12,3)

Índice de riesgo TIMI	3 (3,5)	5,5 (3,5)
Niveles de WBC	11620 (3790)	12795 (8223)
Presentación de IM para balón, h	6 h	5 h
Puntuación NYHA, mediana	1 (0,5)	1 (0,75)
Historia familiar pasada de CAD	5	2
Hipercolesterolemia	4	4
Hipertensión	5	2
Fumadores	4	1
Diabetes Mellitus	1	2

La disección proteómica descubre biomarcadores de vulnerabilidad

5 Se evaluó el contenido proteico en los aspirados de suero coronario de cada paciente. Se generaron curvas estándares para cada una de las 280 sondas, lo que constituye un panel completo de citoquinas, para determinar la concentración. Inicialmente, se usó un valor de corte $p \leq 0,075$ para capturar un espectro de citoquinas candidatas con concentraciones diferenciales en muestras de pacientes protegidos frente a vulnerables. Estas incluyeron eotaxina-3, catepsina-S, Dickopf-1 (DKK-1), folistatina, supresión de tumorigenicidad-2 (ST-2), GRO-alfa (GRO- α), interleuquina-21 (IL-21), nefroblastoma sobreexpresado (NOV), transferrina, inhibidor tisular de metalopeptidasa-2 10 (TIMP-2), receptor 1 y 2 del factor de necrosis tumoral (TNFaRI y II), oncogén 3 viral de leucemia eritroblástica (ErBb3), proteína-2 activadora de neutrófilos (NAP-2), angiostatina, ligando 25 de quimioquina (CCL25), proteína 4 similar a angiopoyetina (ANGPTL4), metaloproteínasa-3 de la matriz (MMP-3) y factor- α de crecimiento transformante (TGF- α) (Figuras 3A y 4-10).

15 Las 19 citoquinas resultantes se sometieron a un límite más discriminatorio ($p \leq 0,025$) para producir seis citoquinas, a saber, NAP-2, angiostatina, CCL25, ANGPTL4, MMP-3 y TGF- α . Las concentraciones mediana para cada uno de los seis factores resueltos en el grupo protegido y vulnerable fueron: NAP-2 8,0 ng/ml y 5,0 ng/ml ($p = 0,005$), angiostatina 146 pg/ml y 242 pg/ml ($p = 0,01$), CCL25 no detectada y 3,8 ng/ml ($p = 0,025$), ANGPTL4 73,3 pg/ml y 152 pg/ml ($p = 0,019$), MMP-3 884 pg/ml y 2,7 ng/ml ($p = 0,014$), y TGF- α 2,1 ng/ml y no detectada ($p = 0,004$), respectivamente (Figura 3A). Para someter a ensayo el potencial discriminatorio de cada factor, se generó una curva de característica de operación de receptor (ROC) (Figura 3B) que produce el área bajo la curva (AUC) de la siguiente manera: TGF- α 0,834 ($p = 0,0003$), NAP-2 0,821 ($p = 0,0005$), Angiostatina 0,805 ($p = 0,001$), MMP-3 0,792 ($p = 0,003$), ANGPTL4 0,779 ($p = 0,006$) y CCL25 0,759 ($p = 0,009$). Esto, a su vez, permitió la proyección de sensibilidad y especificidad (Tabla 2). Se obtuvieron resultados de concentración (Figura 11), curvas de ROC (Figura 25 12) y resultados de sensibilidad y especificidad (Figura 13) para los 13 factores restantes ($0,03 \leq p \leq 0,075$).

Tabla 2. Citoquinas con sensibilidad y especificidad proyectadas; y papel patobiológico en el infarto de miocardio.

Biomarcador	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Papel biológico en IM
NAP-2	80	90	Activa las células leucocitarias y endoteliales dentro de la placa aterosclerótica.
Angiostatina	100	55	Inhibe la formación de vasculatura corosaria colateral.
CCL-25	85	64	Atrae macrófagos y otras células inflamatorias hacia la placa aterosclerótica.
ANGPTL-4	80	82	Inhibe potencialmente la neovascularización.
MMF-3	80	73	Remodelación de la matriz extracelular, asociada a disfunción ventricular izquierda.
TGF α	93	73	Se utiliza para estimular la secreción de células madre de VEGF para mejorar la función miocárdica posterior a IM.

Los mapas de biología de sistemas sobrerrepresentaron procesos en individuos propensos a MACE

30 La relación biológica entre todos los polipéptidos discriminatorios se sometió a ensayo mediante el análisis de redes complejas. Estos 19 factores se agruparon en una red organizada compuesta por 65 nodos unidos por 417 conexiones por pares (Figura 14A). La topología de red presentó una arquitectura no estocástica con tendencias jerárquicas (Figura 14B). La evaluación de las funciones moleculares y fisiológicas sobrerrepresentadas reveló la 35 priorización de funciones hematológicas, inmunológicas y cardiovasculares (Figura 14C). La evaluación de la ruta

canónica puntuó la regulación de calcio, la señalización de ácido retinoico y la inflamación endotelial como las más altamente correlacionadas con la red resuelta (Figura 14D). De ese modo, la obtención de la red no estocástica que abarca 19 factores identificados en el suero coronario, traza un mapa de los procesos fisiopatológicos activados que discriminan a los pacientes vulnerables de los protegidos en el momento de STEMI.

5 *Efecto terapéutico de proteína sérica coronaria en lesión por isquemia reperusión*

10 El día antes de la cirugía se recogieron 48 registros ecocardiográficos basales, y los ratones se aleatorizaron 2:1 en grupos tratados con solución salina y factor de crecimiento. Después de que se indujera lesión por isquemia reperusión, se inyectaron 5-25 ng de NAP-2 y 4-20 ng de TGF- α en la región suministrada por LAD (Figura 15A). Tres días después, los presentes inventores recogieron los corazones y se cuantificó la fibrosis en los grupos tratados con solución salina (n = 20) y factor de crecimiento (n = 10). Los corazones tratados con factores de crecimiento exhibieron un 14,3 \pm 6,2 % de fibrosis en la pared ventricular izquierda en comparación con un 33,8 \pm 8,37 % en el grupo de solución salina (p = < 0,01) (Figura 15B).

15 La recogida de ecocardiografías se llevó a cabo 1 y 10 días, y 4 semanas después de la lesión (Figura 15A). Se observó una mejora significativa durante las fases agudas de la lesión (Figura 15C) en los ratones tratados con factor de crecimiento. Los volúmenes diastólico y sistólico del ventrículo izquierdo mejoraron significativamente en la cohorte tratada con factor de crecimiento, lo que demuestra una reducción de la remodelación y descompensación orgánica. Estos resultados demuestran que los factores dentro del lecho coronario se pueden usar como terapia molecular para reducir el tamaño cicatricial, limitar la remodelación de tejido y mejorar la función cardíaca después de STEMI.

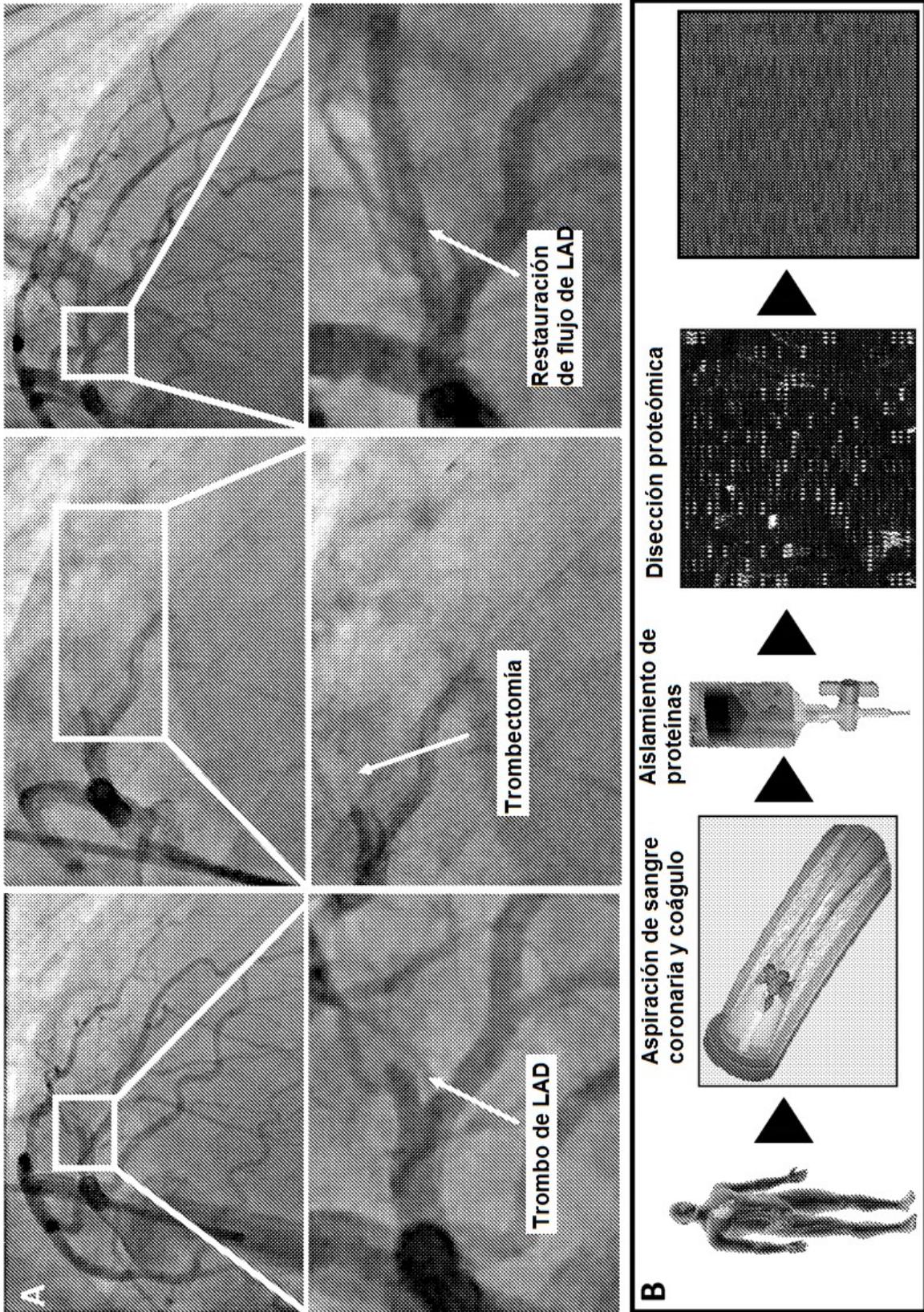
20 Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que marcadores tales como las 19 citoquinas que se describen en el presente se pueden usar para evaluar los resultados a largo plazo después de infarto. La proteómica de alto rendimiento puede proporcionar de ese modo una instantánea molecular de las entidades de la enfermedad a nivel tisular. Estos resultados también demuestran que el tratamiento con NAP-2, TGF- α , o ambos, durante la lesión por isquemia reperusión se pueden usar para reducir el tamaño cicatricial y la remodelación de tejido, y para mejorar la función cardíaca. Además, se puede llevar a cabo una monitorización en tiempo real de la respuesta del paciente a una lesión y/o el tratamiento para informar una gestión personalizada en el momento de la reperusión o durante diversas fases del tratamiento o posteriores al tratamiento.

OTRAS REALIZACIONES

35 Se ha de entender que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en mejorar la función cardíaca en un mamífero, comprendiendo la composición un polipéptido NAP-2 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido NAP-2.
2. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha composición comprende además un polipéptido TGF- α de longitud completa o un ácido nucleico que codifica un polipéptido TGF- α de longitud completa.
- 10 3. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha composición comprende además un polipéptido ErBb3 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido ErBb3 para su uso en un método de mejora de la función cardíaca en un mamífero.
- 15 4. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho mamífero es un ser humano, o en el que dicho mamífero es un paciente humano que se sometió a intervención coronaria percutánea para infarto de miocardio con elevación del segmento ST.
- 20 5. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho uso comprende proporcionar dicha composición durante una intervención coronaria percutánea.
- 25 6. Un método *in vitro* para identificar un mamífero con riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor, en el que dicho método comprende detectar la presencia de un nivel reducido de un polipéptido en una muestra de suero obtenida de un mamífero, en el que dicho polipéptido es NAP-2, solo o en combinación con TGF- α de longitud completa, y en el que la presencia de dicho nivel reducido indica que dicho mamífero se encuentra en riesgo de sufrir un evento cardíaco adverso mayor.
- 30 7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho método comprende detectar la presencia de un nivel reducido de ambos polipéptidos en dicha muestra de suero.
8. El método de la reivindicación 6, en el que dicho método comprende además opcionalmente detectar la presencia de un nivel reducido de ErBb3 en dicha muestra de suero.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho método comprende detectar la presencia de un nivel reducido de NAP-2 y TGF- α de longitud completa; el nivel reducido de NAP-2 y ErBb3; o el nivel reducido de NAP-2, TGF- α de longitud completa y ErBb3, en dicha muestra de suero.
- 40 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que dicho mamífero es un ser humano, o en el que dicho mamífero es un paciente humano que se sometió a intervención coronaria percutánea para infarto de miocardio con elevación del segmento ST.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que dicha muestra de suero es una muestra de suero coronario.



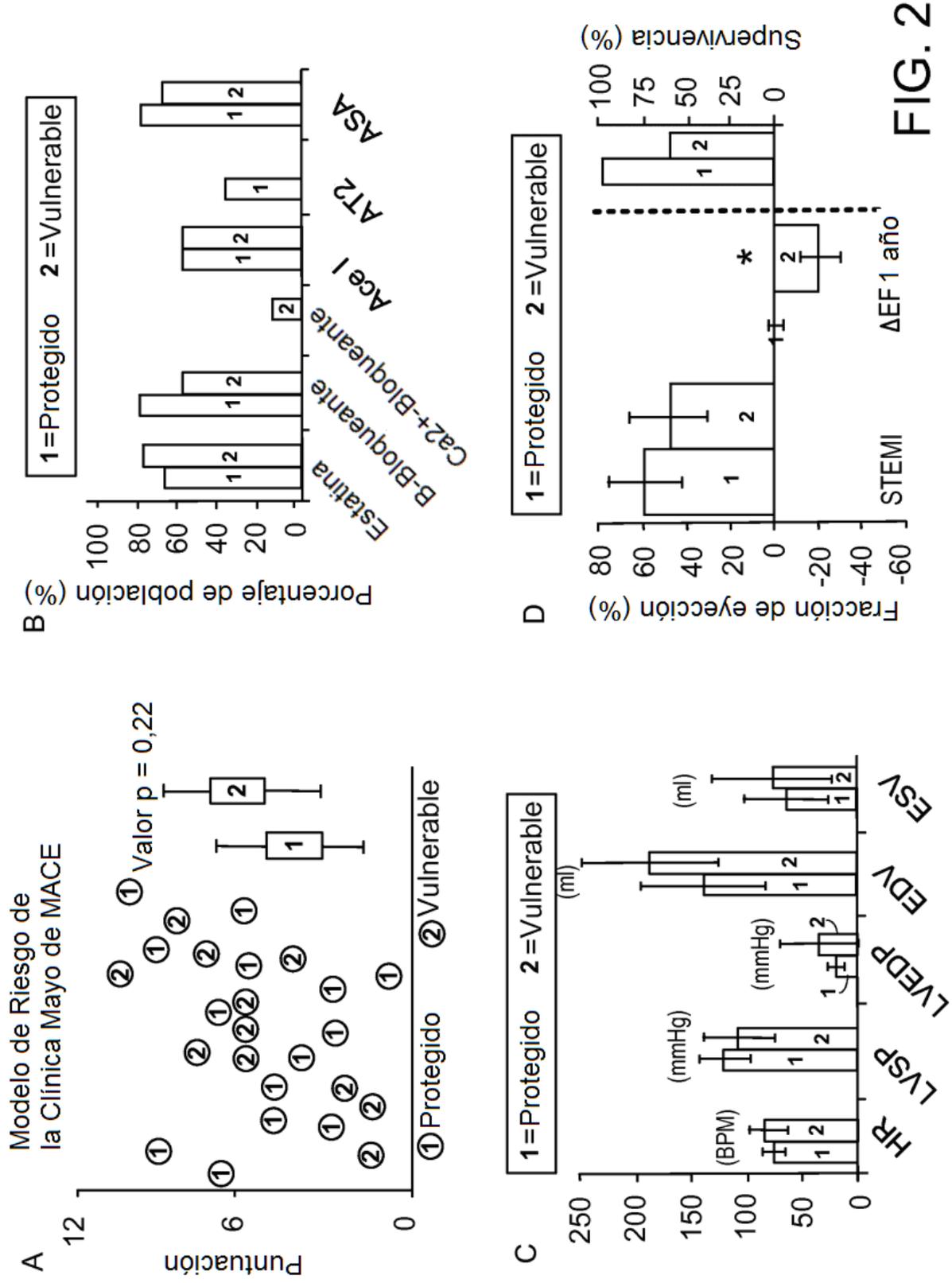


FIG. 2

Figura 3

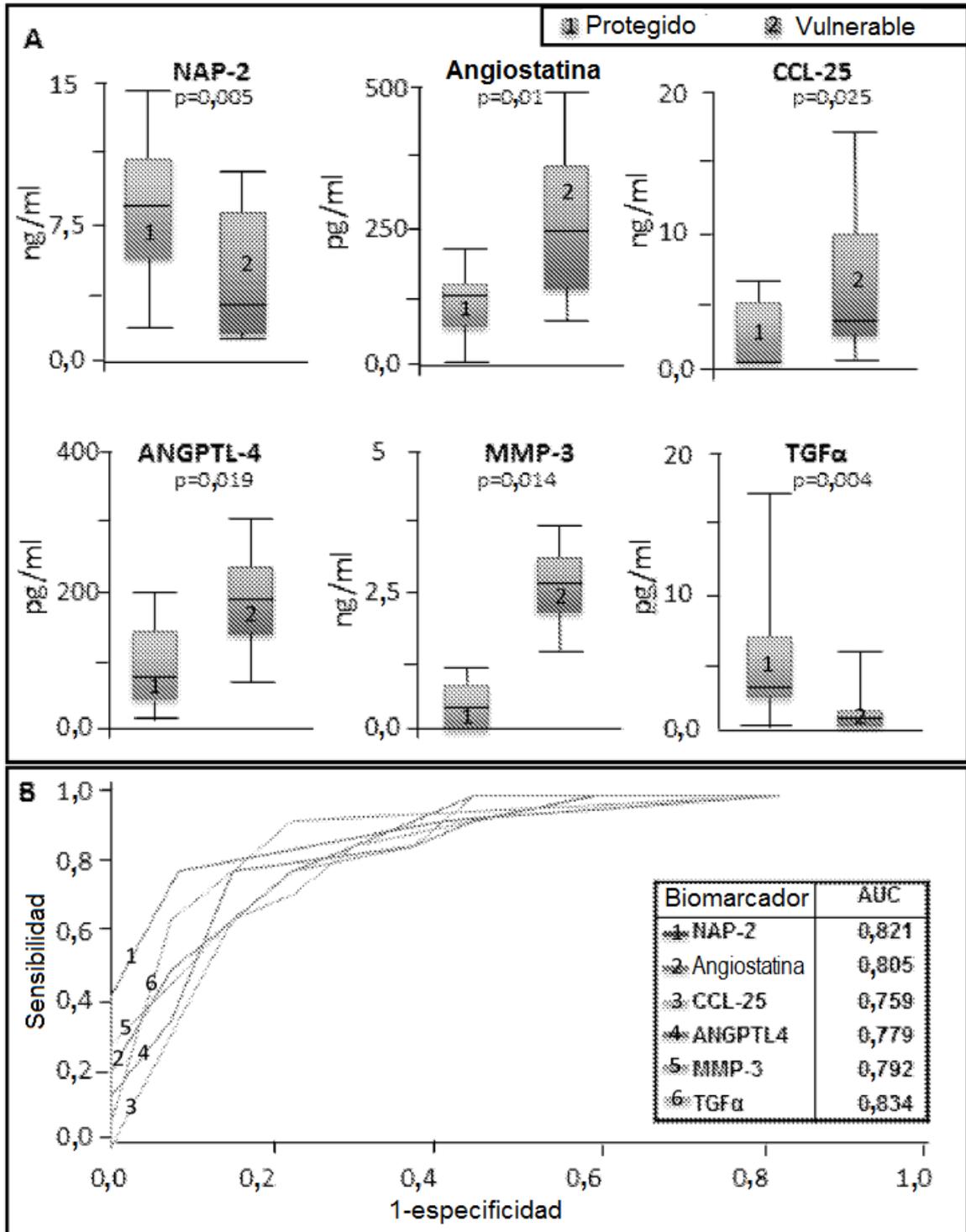


Figura 4

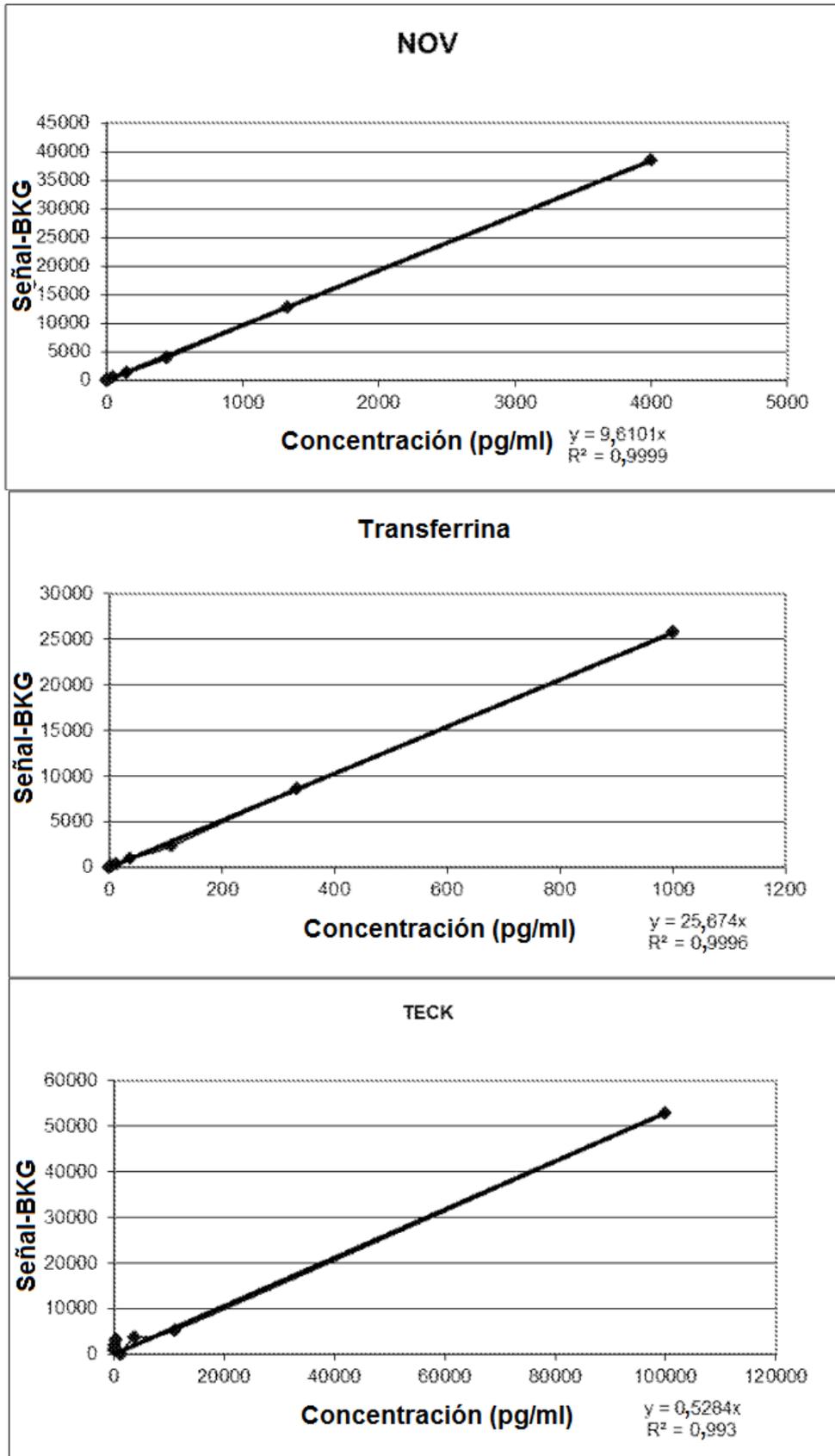


Figura 5

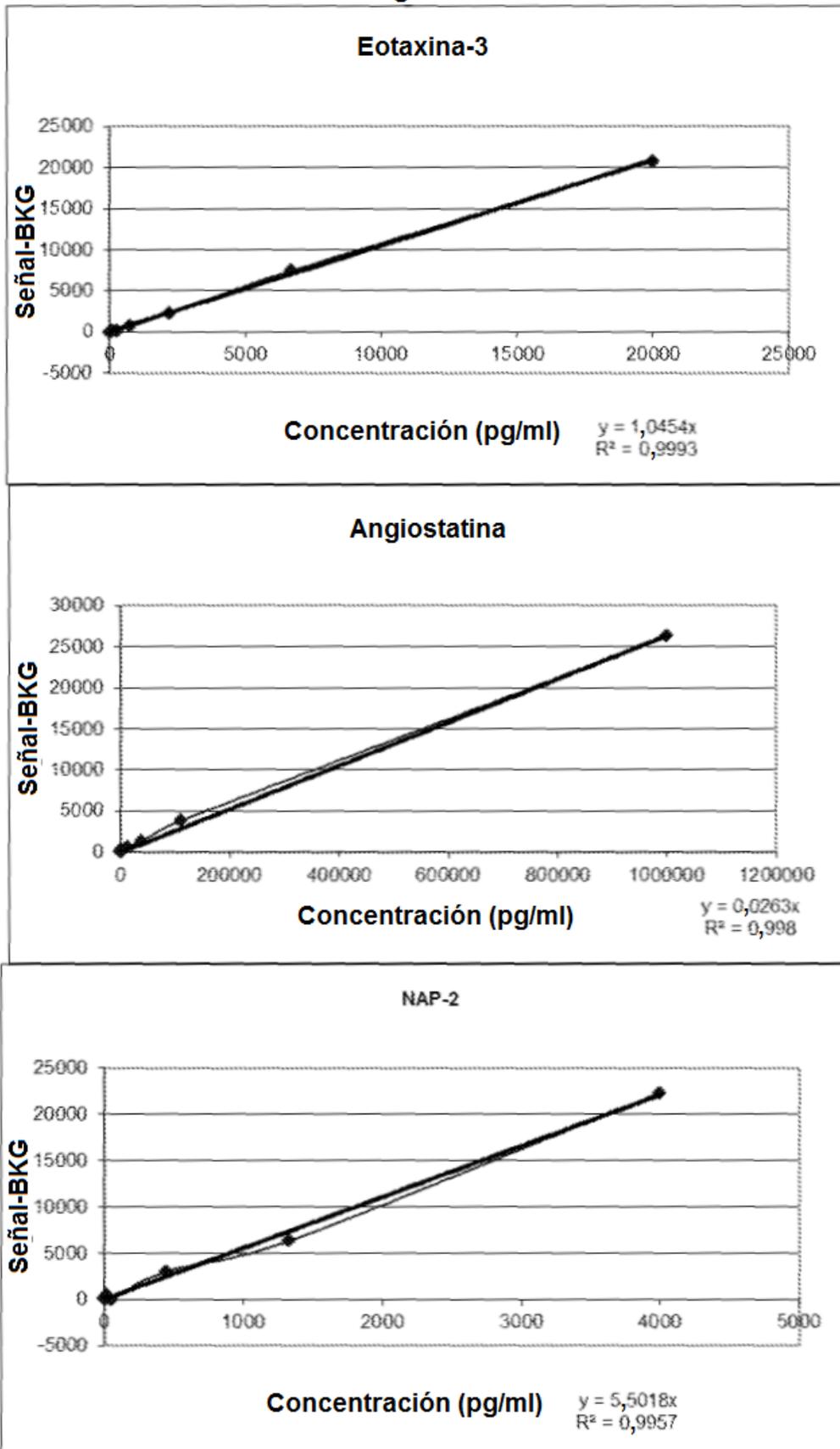


Figura 6

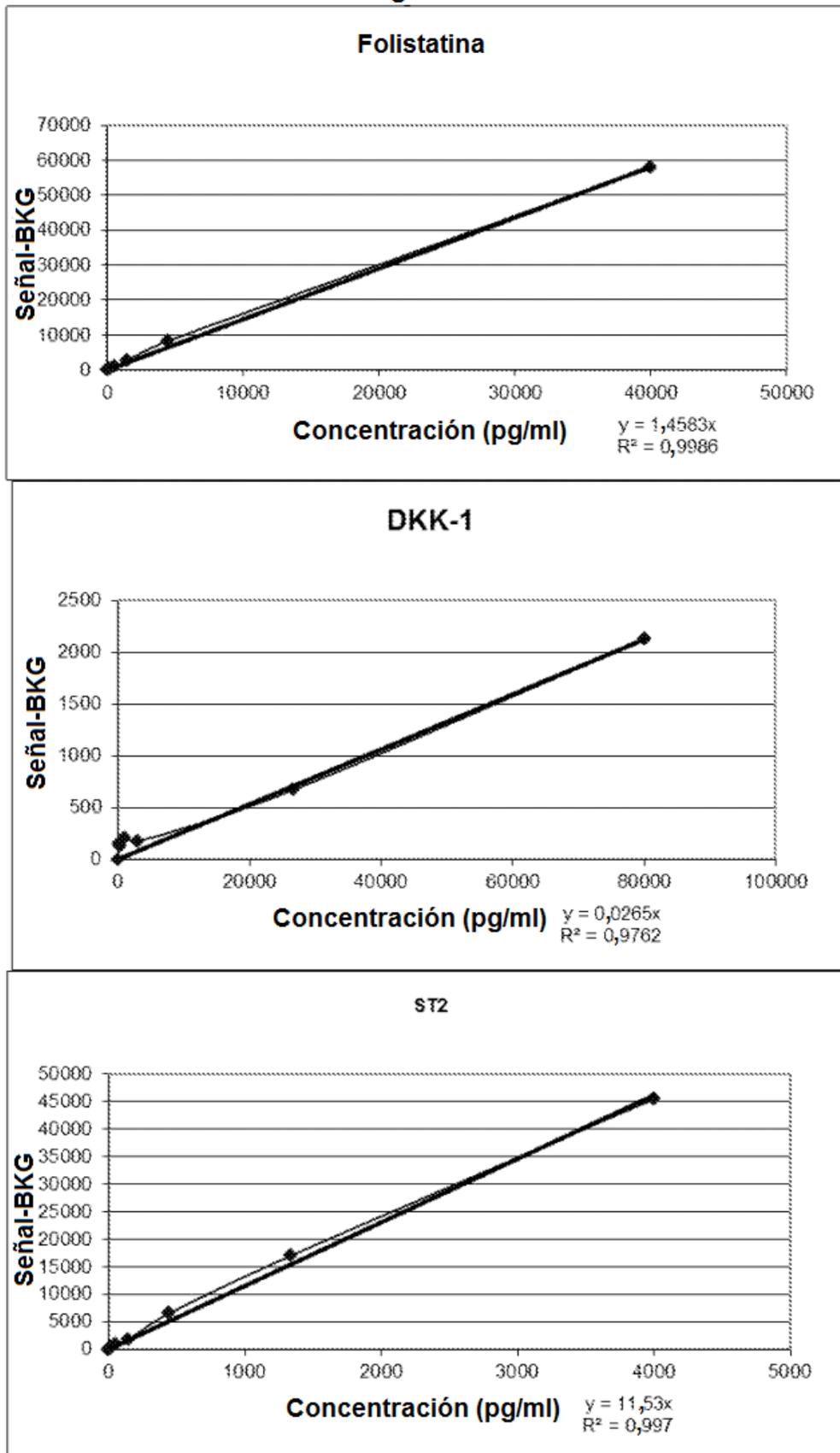


Figura 7

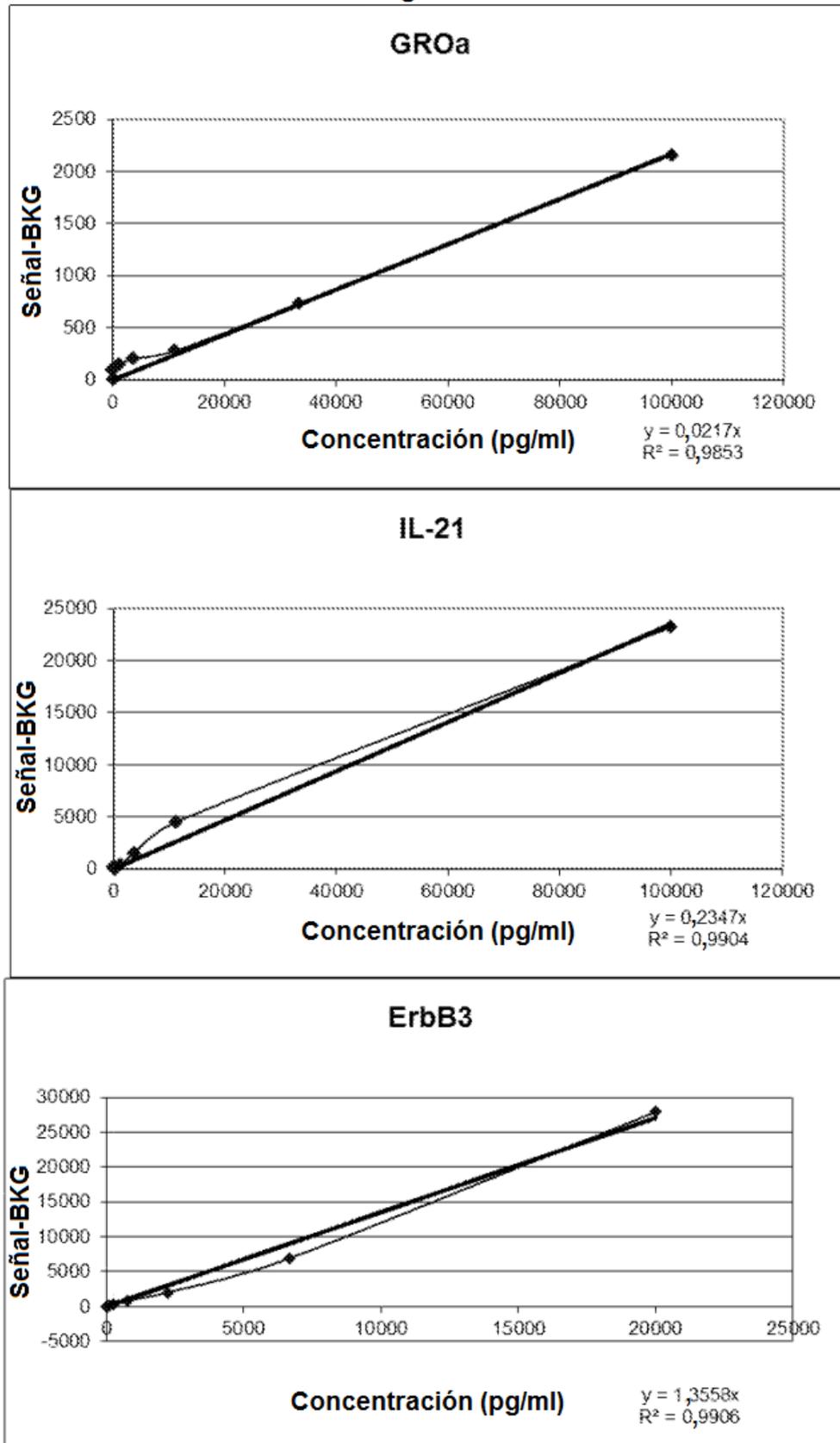


Figura 8

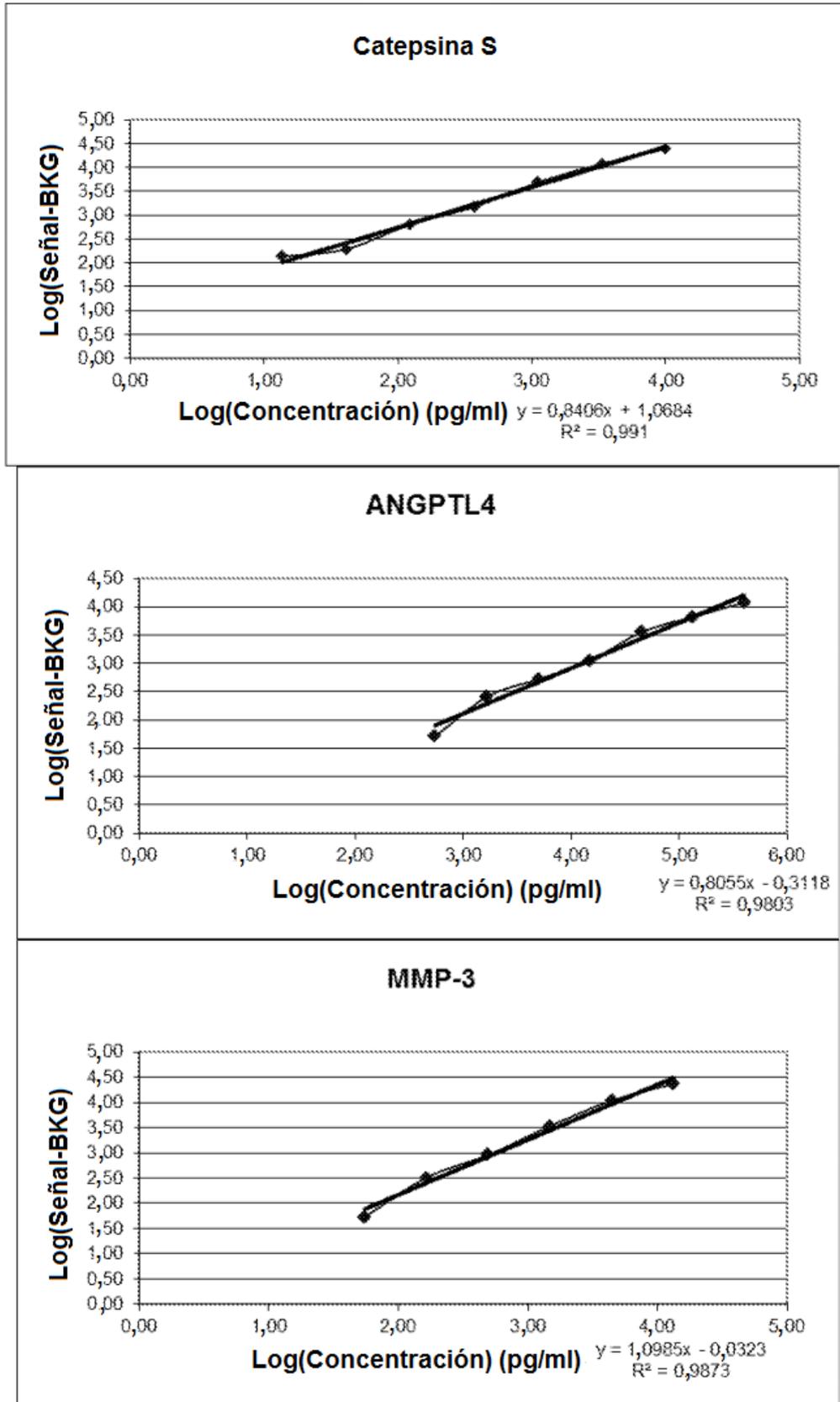


Figura 9

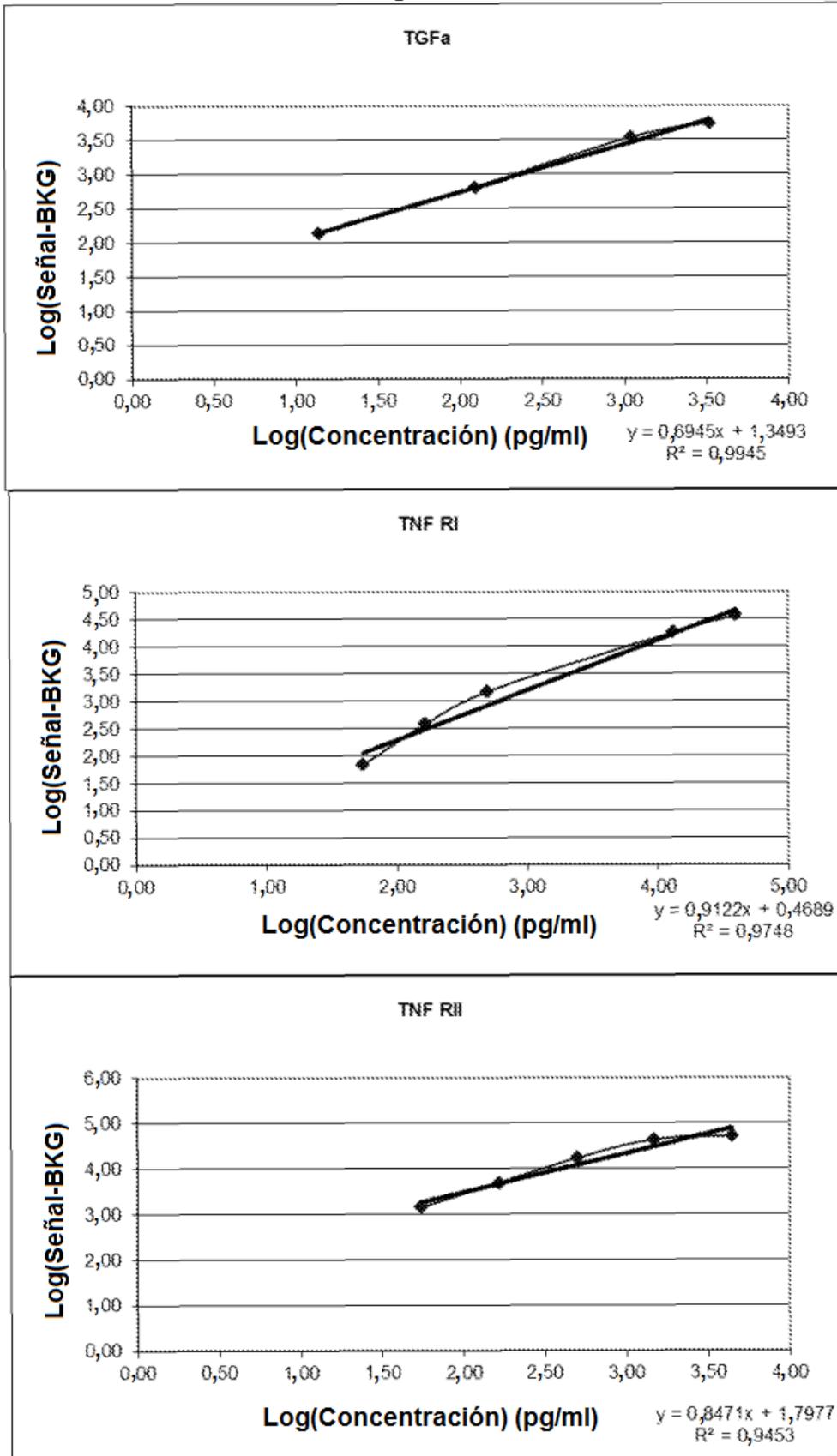


Figura 10

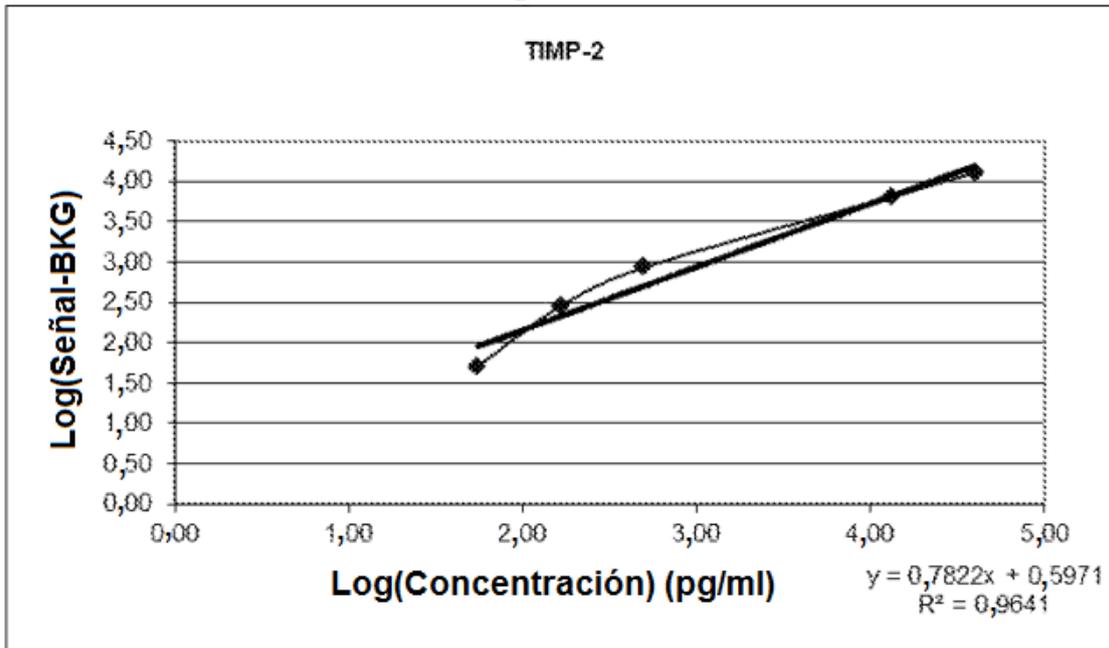
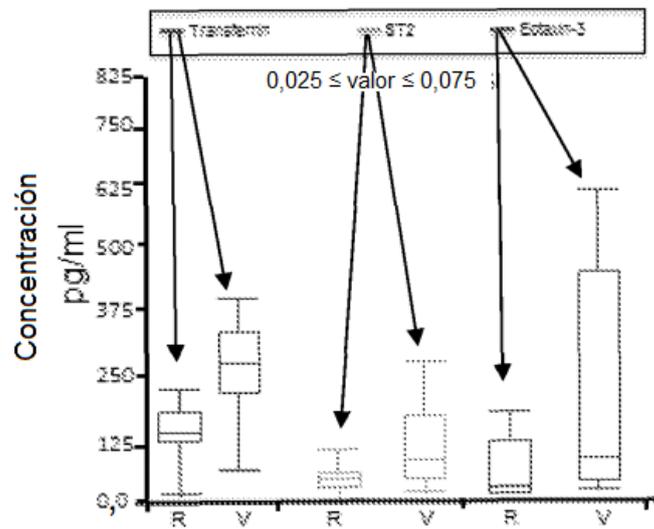
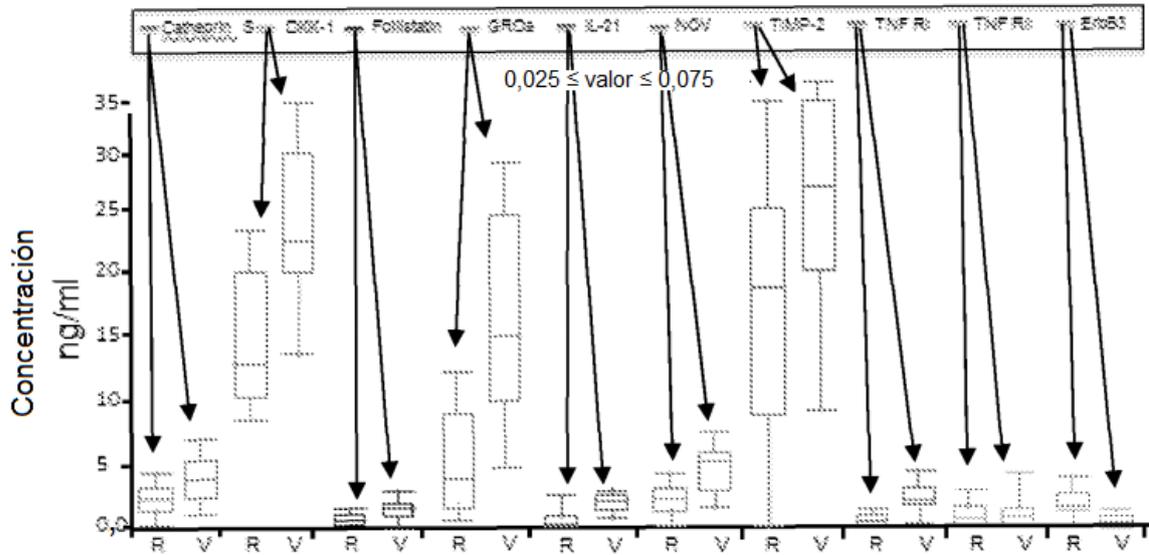


Figura 11



Biomarcador	AUC
1 Eotaxina-3	0,692
2 Catepsina S	0,753
3 DKK-1	0,753
4 Folistatina	0,724
5 ST2	0,714
6 GROa	0,733
7 IL-21	0,714
8 NOV	0,730
9 Transferrina	0,730
10 TIMP-2	0,721
11 TNF RI	0,731
12 TNF RII	0,740
13 EroB3	0,714

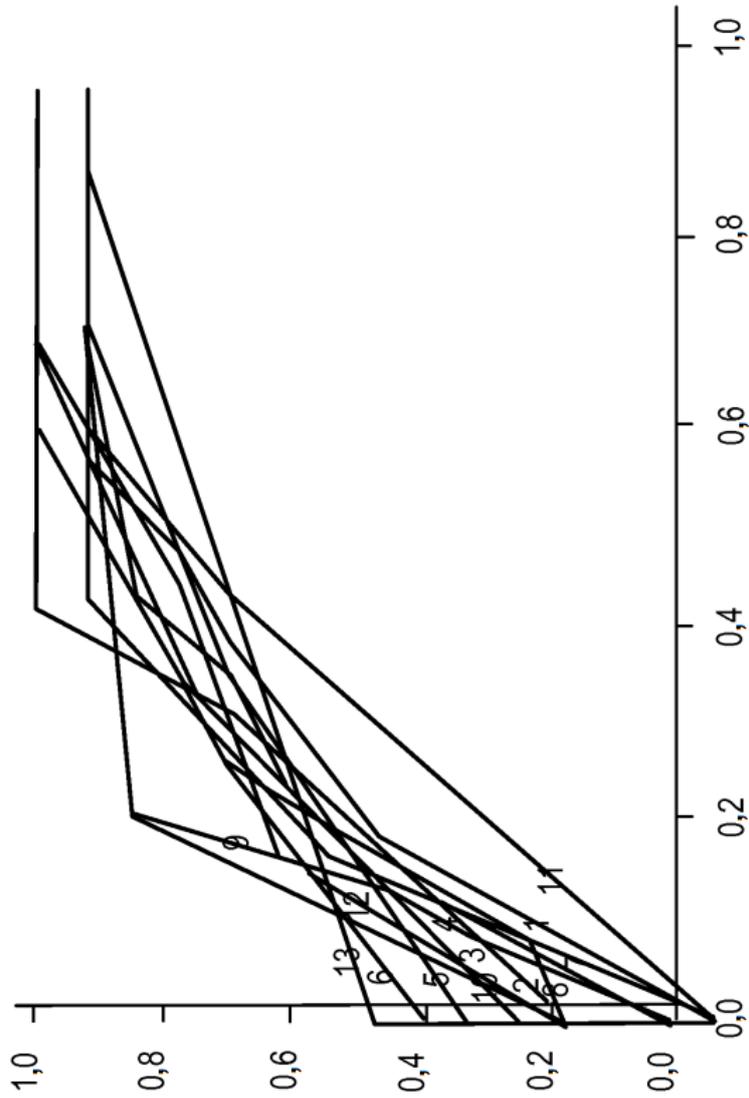


FIG. 12

Figura 13

Biomarcador	Sensibilidad	Especificidad	Papel biológico en IM
Eotaxina-3	70	70	Quimioatracción de eosinófilos. Papel desconocido en IM.
Catepsina S	71	73	Aumento de la actividad elastolítica y colagenolítica en arterias enfermas. Expresión inducida durante aterogénesis.
DKK-1	64	82	Aumento de los niveles en suero en pacientes que padecen angina. Expresado en placas ateroscleróticas, puede contribuir al proceso inflamatorio.
Folistatina	86	55	No se ha descrito ningún papel biológico para la Folistatina en IM; sin embargo, el miembro de la familia de Folistatina Fstl1 es cardioprotector en isquemia reperusión.
ST-2	93	45	Aumento de los niveles en pacientes con MI. Bloquea la señalización antihipertrófica en sobrecarga de presión.
GRO α	64	82	Regulación positiva en el corazón después de IM.
IL-21	92	55	Aumenta la respuesta de linfocitos T durante inflamación. Datos limitados para papel en IM.
NOV	100	56	Expresión detectada en cardiomiocitos y células del músculo liso. Datos limitados para el papel en IM.
Transferrina	86	76	Peroxidación de lípidos y entorno prooxidativo en lesiones ateroscleróticas por hierro.
TIMP-2	79	64	Atenúa el desarrollo de placa aterosclerótica y reduce la actividad de MMP.
TNFR1	80	64	Proporciona crioprotección en lesión por isquemia/reperusión. Puede contribuir a necrosis y apoptosis durante IM.
TNFR2	71	73	Véase anteriormente.
ErB3	50	100	Ausente en el miocardio postnatalmente. Ningún papel en IM hasta la fecha.

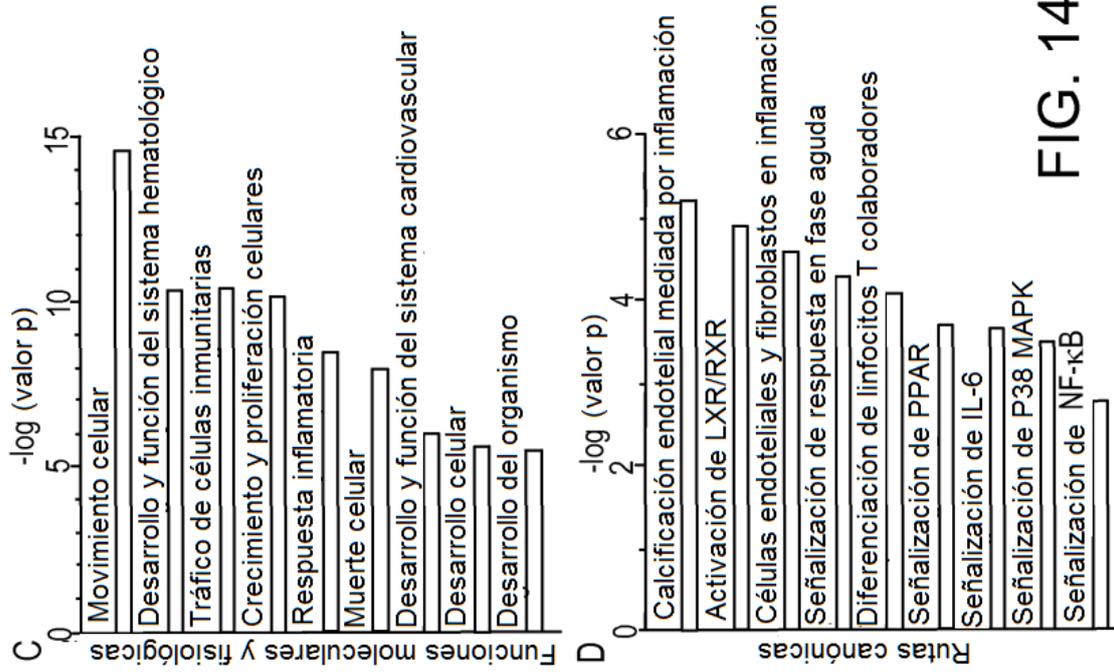
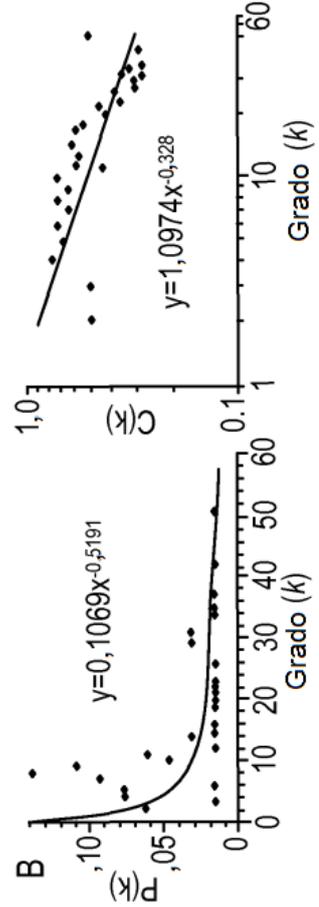
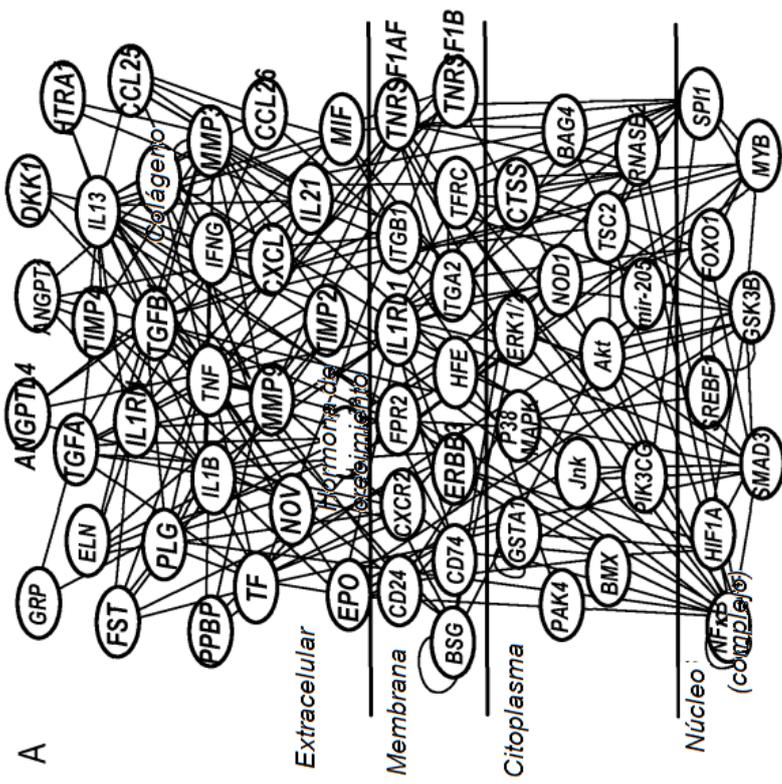


FIG. 14



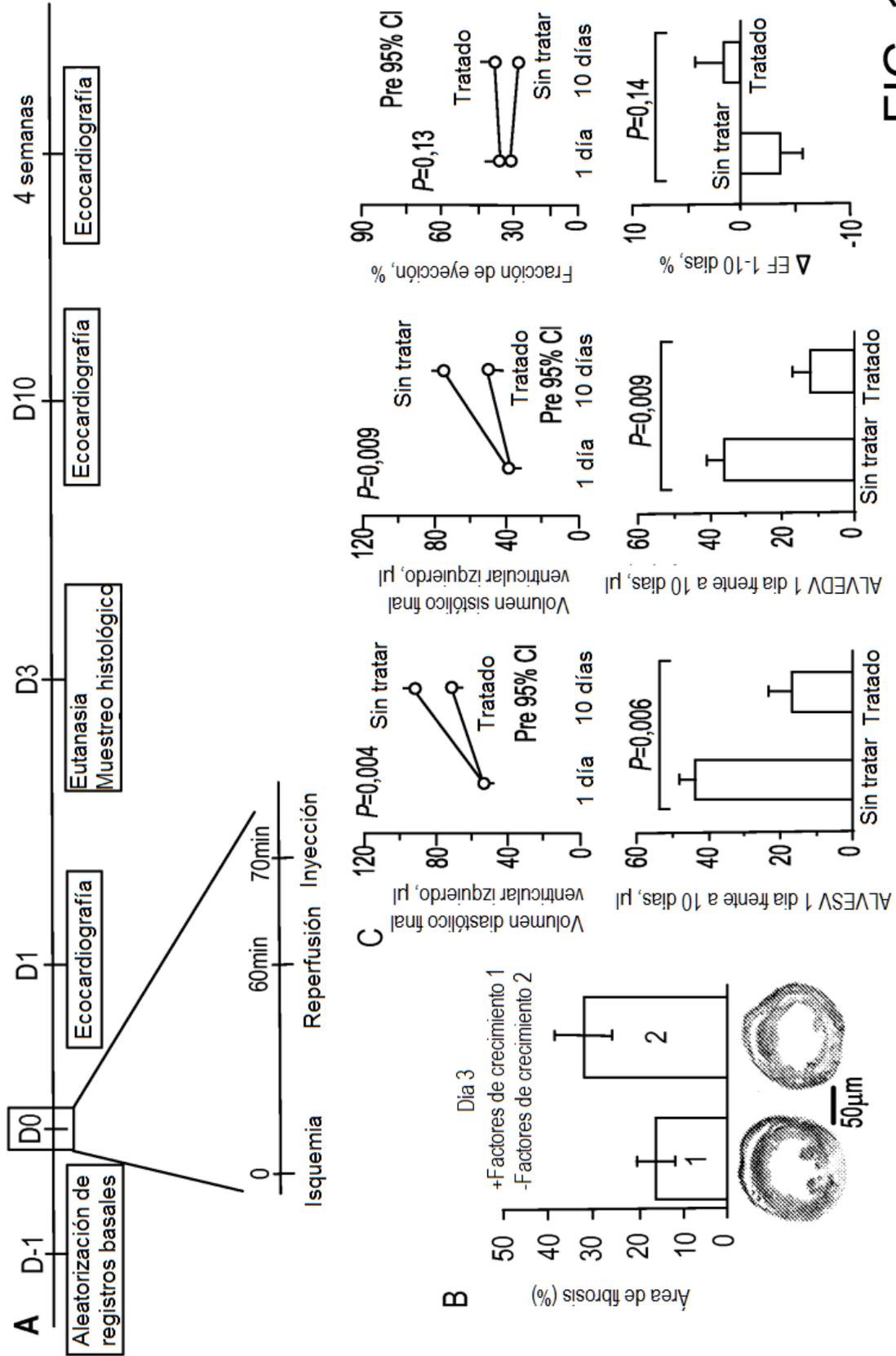


FIG. 15