

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 810**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2014** **PCT/EP2014/067120**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015** **WO15018936**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2014** **E 14753046 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024** **EP 3030901**

54 Título: **Métodos y equipos de reactivos para predecir el riesgo de sufrir un evento cardiovascular**

30 Prioridad:

09.08.2013 US 201361863987 P
31.01.2014 EP 14153519

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2024

73 Titular/es:

INOTREM (16.7%)
9 avenue de la Forêt de Haye
54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, FR;
APHP (ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE
PARIS) (16.7%);
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (16.7%);
UNIVERSITÉ DE LORRAINE (16.7%);
SORBONNE UNIVERSITÉ (16.7%) y
UNIVERSITÉ PARIS CITÉ (16.7%)

72 Inventor/es:

DERIVE, MARC;
GIBOT, SÉBASTIEN;
AIT-OUFELLA, HAFID;
BOUFENZER, AMIR;
SIMON, TABASOMME y
DANCHIN, NICOLAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes

ES 2 973 810 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

Métodos y equipos de reactivos para predecir el riesgo de sufrir un evento cardiovascular

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para predecir el riesgo de que un individuo desarrolle un evento cardiovascular recurrente o esté en riesgo de muerte después de un evento cardiovascular midiendo el nivel de TREM-1 soluble en una muestra, en donde dicho evento cardiovascular es un síndrome coronario agudo.

Antecedentes de la invención

10 La aterosclerosis da lugar a la enfermedad cerebrovascular y a la cardiopatía coronaria a través de una formación de lesiones y un estrechamiento luminal de las arterias que avanzan lentamente. Tras la rotura de placa y la trombosis, estas formas más comunes de enfermedad cardiovascular se manifiestan como síndrome coronario agudo (SCA), infarto de miocardio o ataque fulminante. Los estudios en humanos y animales han establecido que la aterosclerosis es impulsada por un proceso inflamatorio crónico dentro de la pared arterial que se inicia principalmente en respuesta a estructuras modificadas de forma endógena, en particular a lipoproteínas oxidadas que estimulan las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. La respuesta innata es promovida por la activación tanto de las células vasculares como de los monocitos/macrófagos; posteriormente, se desarrolla una respuesta inmunitaria adaptativa contra una serie de antígenos potenciales presentados a los linfocitos T efectores por células presentadoras de antígenos (Ait-Oufella, H. et al., 2011. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 31: 969-979.). Los modelos de ratones modificados genéticamente nos enseñaron que los monocitos circulantes eran reclutados en la pared vascular por quimiocinas y luego se convertían en macrófagos y células espumosas cargadas de lípidos. Los macrófagos de la íntima promueven el desarrollo de placas a través de la liberación de citocinas, la amplificación de la inflamación y la desestabilización de placas a través de la producción de proteasas y la acumulación de apoptosis (Libby, P. et al., 2011. Nature 473: 317-325.). Los monocitos/macrófagos son estimulados por varios mediadores denominados PAMP (por sus siglas en inglés (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos)) que interactúan con PRR (por sus siglas en inglés (Receptores de Reconocimiento de Patógenos)). Varios PRR están implicados en la fisiopatología de la aterosclerosis. Por ejemplo, los receptores de tipo Toll se expresan en lesiones ateroscleróticas de humanos y animales.

30 El infarto de miocardio o cerebral ejemplifica un síndrome clínico complejo que resulta de una isquemia dañina y perjudicial, permanente o transitoria. Por lo general, está causado por una oclusión de las arterias coronarias/cerebrales, lo que tiene como resultado un desequilibrio entre el suministro y la demanda de oxígeno. El infarto de miocardio se asocia con una respuesta inflamatoria multifásica. La isquemia inicial induce necrosis, formación de especies de oxígeno con radicales libres, activación del complemento, y una cascada de citocinas iniciada por la liberación de TNF-alfa. La fase de reperfusión de la zona infartada se asocia con un aumento y una aceleración de la reacción inflamatoria responsable del reclutamiento de leucocitos en el sitio de la isquemia. Los leucocitos reclutados también participan en una liberación sistémica e *in situ* de mediadores inflamatorios, lo que conduce en resumidas cuentas a un estado inflamatorio hiperactivado, responsable de las consecuencias fisiopatológicas del infarto.

40 En resumen, existe una gran cantidad de pruebas que demuestran que la inmunidad innata, especialmente los monocitos/macrófagos y los neutrófilos, desempeña un papel crucial en la fisiopatología de la aterosclerosis y la remodelación postisquémica del tejido cardíaco. El infarto de miocardio (IM) induce niveles altos de monocitos circulantes en la sangre durante varias semanas. Los niveles elevados de monocitos circulantes proporcionan un grupo ampliado de células inflamatorias disponibles para su reclutamiento en lesiones arteriales en crecimiento, lo que puede promover la rotura de placa. De hecho, la leucocitosis después de un IM predice un mayor riesgo de reinfarto y muerte (Swirski FK. y Nahrendorf M. 2013. Science. 339: 161-166., Sabatine, M. Set al. 2002. J. Am. Coll. Cardiol. 40: 1761-1768). De hecho, el IM aumenta la inflamación en las placas ateroscleróticas a distancia, lo que acelera la aterosclerosis crónica, y las células inmunitarias innatas son una fuerza impulsora de este fenómeno.

45 Los TREM-1 (por sus siglas en inglés (Receptores Desencadenantes Expresados en células Mieloides 1)) son unos inmunorreceptores expresados por células inmunitarias innatas (monocitos/macrófagos y neutrófilos). La activación de TREM-1 conduce a la producción de citocinas y quimiocinas (TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1 y -3, MIP-1 α ...) junto con una rápida desgranulación de neutrófilos y un estallido oxidativo (Derive, M. et al. 2010. Self Nonself 1: 225-230, Derive, M. et al. 2012. J. Immunol. Baltim. Md 1950). La función del TREM-1 es modular/amplificar, en lugar de activar/iniciar, la inflamación mediante una sinergia con PRR (incluidos los TLR) para desencadenar una respuesta inmunitaria exuberante.

La Proteína C Reactiva (PCR) se usa ampliamente en las pruebas de diagnóstico de eventos cardiovasculares. Sin embargo, no se reconoce en la técnica como un indicador de pronóstico muy específico.

55 Los procedimientos de diagnóstico actuales no han sido del todo satisfactorios, por ejemplo, a la hora de identificar a personas en riesgo de sufrir ciertos resultados. Se necesitan métodos y sistemas de diagnóstico y predictivos para la cardiopatía coronaria, tales como aquellos que no sean invasivos, que sean sensibles y que sean fiables para la

evaluación y predicción de resultados cardiovasculares adversos, en particular para las personas en riesgo de padecer la cardiopatía coronaria y sus consecuencias.

Dopheide et al., 2013 (Atherosclerosis. 2013 Aug;229(2):396-403) investiga el fenotipo de las células inflamatorias con respecto a la expresión de TREM-1 y sTREM-1 en pacientes con enfermedad arterial periférica. El documento WO2009/013319 se refiere al diagnóstico y tratamiento de trastornos inflamatorios tras la identificación de un ligando para el receptor TREM-1, es decir, CD177. En particular, el documento WO2009/013319 describe aplicaciones de diagnóstico que incluyen analizar una muestra de un individuo en cuanto a un ligando de TREM 1 o un ARNm de ligando de TREM-1 o proporcionar una forma soluble del ligando de TREM-1 o una variante soluble del mismo para la unión al receptor TREM-1. El documento WO2008/088849 divulga métodos para el tratamiento, la detección, y el seguimiento de la inflamación y la evaluación del tratamiento para la enfermedad inflamatoria basándose en el hallazgo de que la sobreexpresión de TREM-1 y/o DAP12/TyroBP está asociada con la presencia de una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria. En particular, el documento WO2008/088849 describe un método para detectar la presencia de una enfermedad inflamatoria que se basa en la detección de la expresión o actividad de TREM-1 unido a la membrana, TREM-1 soluble o DAP12/TyroBP en un individuo. Hermus et al., 2011 (Clin Biochem. 2011 Nov;44(16):1292-8) estudian cuatro biomarcadores séricos, que incluyen el sTREM-1, con el fin de determinar si dichos biomarcadores pueden usarse para identificar a los pacientes con estenosis de la arteria carótida con alto riesgo de desarrollar eventos isquémicos cerebrales. Cabe destacar que Hermus et al., 2011, enseñan que medir el nivel de sTREM-1 en un individuo con estenosis de la arteria carótida no es adecuado para determinar si dicho individuo tiene un alto riesgo de desarrollar placas inestables de la arteria carótida.

Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo proporcionar un método novedoso para identificar a un individuo en riesgo de desarrollar un evento cardiovascular.

Compendio

Un objeto de la invención es un método para identificar a un individuo en riesgo de desarrollar un evento cardiovascular recurrente o en riesgo de muerte después de un evento cardiovascular, comprendiendo dicho método:

- medir el nivel de Receptores Desencadenantes solubles Expresados en células Mieloides 1 (sTREM-1) en una muestra del individuo, y
- comparar el nivel de sTREM-1 con un valor de referencia, en donde un nivel de sTREM-1 superior al valor de referencia es indicativo de un riesgo de desarrollar un evento cardiovascular recurrente o de un riesgo de muerte después de un evento cardiovascular,

en donde dicho evento cardiovascular es un síndrome coronario agudo.

En una realización, el valor de referencia se obtiene a partir del nivel de sTREM-1 en una muestra de control obtenida de uno o más individuos que están sustancialmente sanos.

En una realización, la muestra es una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de plasma.

En una realización, dicho evento cardiovascular es un síndrome coronario agudo seleccionado entre una rotura de placa, infarto de miocardio y angina inestable. En una realización, dicho evento cardiovascular es un infarto de miocardio.

Otro objeto de la invención es un método para realizar un seguimiento de la eficacia de una terapia administrada a un individuo que sufre o ha sufrido un evento cardiovascular, comprendiendo dicho método:

- medir el nivel de Receptores Desencadenantes solubles Expresados en células Mieloides 1 (sTREM-1) en una muestra del individuo, y
- comparar el nivel de sTREM-1 con un valor de referencia personalizado del individuo, en donde dicho evento cardiovascular es un síndrome coronario agudo.

En una realización, la muestra es una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de plasma.

En una realización, el valor de referencia personalizado del individuo es el nivel de sTREM-1 medido en una muestra obtenida del individuo antes o al comienzo de la terapia.

En una realización, una disminución en el nivel de sTREM-1 medido en una muestra del individuo en comparación con el nivel de sTREM-1 medido en una muestra obtenida del individuo antes de la terapia es indicativa de un efecto positivo de la terapia en el individuo.

En una realización, dicho evento cardiovascular es un síndrome coronario agudo seleccionado entre una rotura de placa, infarto de miocardio y angina inestable. En una realización, dicho evento cardiovascular es un infarto de miocardio.

En una realización, la terapia administrada al individuo se basa en la administración de un modulador de la función, actividad o expresión de TREM 1. En una realización, el modulador de la función, actividad o expresión de TREM-1 es un péptido guiado al ligando de TREM-1. En una realización, el péptido guiado al ligando de TREM-1 es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO.: 4.

5 Definiciones

En la presente divulgación, los términos o expresiones siguientes tienen los significados siguientes:

“Evento cardiovascular” se usa indistintamente en la presente memoria con la expresión “evento cardíaco”, “evento arteriovascular agudo” o “evento arteriovascular” y se refiere a la muerte cardíaca súbita, los síndromes coronarios agudos tales como, pero no limitados a, la rotura de placa, el infarto de miocardio, la angina inestable, así como los eventos arteriovasculares agudos no cardíacos, tales como los coágulos sanguíneos de la pierna, los aneurismas o la evolución de aneurismas, ataque fulminante y otros eventos isquémicos arteriovasculares en los que el flujo sanguíneo arteriovascular y la oxigenación se interrumpen de forma transitoria o permanente.

“Enfermedad cardiovascular” o **“enfermedad arteriovascular”**, tal como se definen en la presente memoria, son expresiones generales usadas para clasificar numerosos estados que afectan al corazón, las válvulas cardíacas, la sangre y la vasculatura del cuerpo y abarcan cualquier enfermedad que afecte al corazón o a los vasos sanguíneos, incluidos, pero no limitados a, el síndrome metabólico, el síndrome X, la aterosclerosis, la aterotrombosis, la cardiopatía coronaria, la angina de pecho estable e inestable, el ataque fulminante, las enfermedades de la aorta y sus ramas (tales como la estenosis aórtica, la trombosis o el aneurisma aórtico), la enfermedad arterial periférica, la enfermedad vascular periférica, la enfermedad cerebrovascular, e incluyendo, sin limitación, cualquier evento arteriovascular isquémico transitorio o permanente. Enfermedad arteriovascular, tal como se usa en la presente memoria, pretende referirse más comúnmente a la enfermedad isquémica o proisquémica, en lugar de generalmente a la enfermedad no isquémica. Tal como se usan en la presente memoria, “aterosclerosis” y “aterotrombosis” se refieren a estados de enfermedad inflamatoria sistémica asociados con respuestas inflamatorias complejas a patologías vasculares multifacéticas que implican la activación inflamatoria del endotelio, los leucocitos inflamatorios como fuente de estímulos trombogénicos, las células del músculo liso como fuente de procoagulantes y amplificadores de la respuesta inflamatoria durante la trombosis, y las plaquetas como mediadoras de la inflamación y la trombosis. Las arterias se endurecen y estrechan debido a la acumulación de un material llamado “placa” en sus paredes internas. A medida que la placa se desarrolla y aumenta de tamaño, el interior de las arterias se hace más estrecho (“estenosis”) y puede circular menos sangre a través de ellas. La estenosis o la rotura de placa pueden causar la oclusión parcial o completa de la vasculatura afectada. Los tejidos irrigados por la vasculatura se ven así privados de su fuente de oxigenación (isquemia) y puede producirse la muerte celular (necrosis). La “cardiopatía coronaria” o “CC” es una enfermedad arteriovascular que se produce cuando las arterias que suministran sangre al músculo cardíaco (las arterias coronarias) se vuelven ateroscleróticas, se calcifican y/o se estrechan. Con el tiempo, el flujo sanguíneo al músculo cardíaco se reduce y, dado que la sangre transporta el muy necesario oxígeno, el músculo cardíaco no puede recibir la cantidad de oxígeno que necesita y, a menudo, sufre necrosis. La cardiopatía coronaria abarca estados patológicos tales como los síndromes coronarios agudos (SCA), el infarto de miocardio (ataque cardíaco), la angina (estable e inestable) y la aterosclerosis y aterotrombosis que se producen en los vasos sanguíneos que suministran sangre rica en oxígeno al corazón. La “ECV” o “enfermedad cerebrovascular” es una enfermedad arteriovascular de los vasos sanguíneos que llevan sangre rica en oxígeno a la cara y al cerebro, tal como la aterosclerosis y la aterotrombosis. Esta expresión se usa con frecuencia para describir el “endurecimiento” de las arterias carótidas, que suministran sangre al cerebro. Es una enfermedad comórbida común con CC y/o EAP (enfermedad arterial periférica). También se conoce como enfermedad isquémica o enfermedad que provoca una falta de flujo sanguíneo. La ECV abarca estados patológicos tales como la isquemia cerebrovascular, el infarto cerebral agudo, el ataque fulminante, el ataque fulminante isquémico, el ataque fulminante hemorrágico, el aneurisma, el deterioro cognitivo leve (DCL) y los ataques isquémicos transitorios (AIT). Se cree que la ECV isquémica está estrechamente relacionada con la CC y la EAP; la ECV no isquémica puede tener múltiples fisiopatologías. Se estima que 5 millones de estadounidenses son sobrevivientes de eventos de ECV agudas diagnosticados en el pasado, y se estima que cada año se producen 700 mil eventos de ECV aguda. Como se divulga en la presente memoria, los individuos que se considera que tienen un riesgo bajo o nulo de ECV según las evaluaciones clínicas de los factores de riesgo de enfermedad arteriovascular tradicionales, o que no presentan síntomas tales como los AIT, el DCL o la cefalea intensa, aún pueden estar en riesgo de sufrir un evento de ECV aguda. La “EAP” o “enfermedad arterial periférica” abarca estados patológicos tales como la aterosclerosis y la aterotrombosis que se producen fuera del corazón y el cerebro. Es una enfermedad comórbida común con la CC. Los individuos que se considera que tienen un riesgo bajo o nulo de padecer EAP según una evaluación de los factores de riesgo tradicionales de la EAP (o enfermedad arteriovascular), o que son asintomáticos de la EAP o una enfermedad arteriovascular, pueden, no obstante, estar en riesgo de sufrir un evento arteriovascular, incluso en ausencia de claudicación. La claudicación se puede definir como dolor o molestia en los músculos de las piernas que se producen debido a una disminución de la cantidad de sangre que fluye hacia un músculo debido al estrechamiento de las arterias periféricas, lo que produce isquemia y, a menudo, oclusión arterial, lo que provoca necrosis del músculo esquelético y de las extremidades. El dolor o la molestia con frecuencia se presentan al caminar y desaparecen en condiciones de reposo (claudicación intermitente). Como resultado de la claudicación a menudo se experimentan dolor, tensión, calambres, cansancio o debilidad. La EAP no sólo provoca las alteraciones hemodinámicas comunes en la CC, sino que también tiene como resultado cambios metabólicos en el músculo esquelético. Cuando la EAP ha evolucionado hasta convertirse en una oclusión arterial periférica aguda y crónica

grave, la cirugía y la amputación de una extremidad suelen convertirse en las únicas opciones terapéuticas. La EAP se considera de forma generalizada una enfermedad infradiagnosticada, produciéndose la mayoría de los diagnósticos confirmados sólo después de que se manifiesten los síntomas, o sólo con otras enfermedades arteriovasculares, y cuando ya se ha producido un daño arteriovascular irreversible debido a tales eventos isquémicos.

5 **“Medir”** o **“medición”** o, como alternativa, **“detectar”** o **“detección”** significan evaluar la presencia, la ausencia, el volumen o la cantidad (que puede ser una cantidad eficaz) de una sustancia determinada en una muestra clínica u obtenida de un individuo, incluidas la obtención de los niveles de concentración cualitativos o cuantitativos de tales sustancias o una evaluación efectuada de otra manera de los valores o la categorización de los parámetros clínicos no relacionados con analitos de un individuo.

10 **“Riesgo”**, en el contexto de la presente invención, se refiere a la probabilidad de que ocurra un evento durante un período de tiempo específico, como en la conversión a eventos arteriovasculares, y puede significar el riesgo “absoluto” o el riesgo “relativo” de un individuo. El riesgo absoluto se puede medir, bien con referencia a la observación real posterior a la medición para la cohorte temporal relevante, bien con referencia a valores de índice desarrollados a partir de cohortes históricas estadísticamente válidas que se han seguido durante el período de tiempo relevante. El
15 riesgo relativo se refiere a la relación de los riesgos absolutos de un individuo comparados, bien con los riesgos absolutos de cohortes de bajo riesgo, bien con un riesgo poblacional promedio, que puede variar según la forma en que se evalúen los factores de riesgo clínicos. También se usan comúnmente las relaciones de probabilidades, la proporción de eventos positivos con respecto a eventos negativos para un resultado de ensayo determinado (las probabilidades están de acuerdo con la fórmula $p/(1-p)$ donde p es la probabilidad de un evento y $(1-p)$ es la probabilidad de que no se produzca ningún evento).
20

Una **“muestra”** en el contexto de la presente invención es una muestra biológica aislada de un individuo y puede incluir, a modo de ejemplo y no de limitación, fluidos corporales y/o extractos de tejidos tales como homogeneizados o tejido solubilizado obtenidos de un individuo. Los extractos de tejido se obtienen de forma rutinaria a partir de material de biopsia de tejido y autopsia. Los fluidos corporales útiles en la presente invención incluyen sangre, orina, saliva o
25 cualquier otra secreción corporal o derivado de la misma. Tal como se usa en la presente memoria, “sangre” incluye sangre completa, plasma, suero, células epiteliales circulantes, constituyentes o cualquier derivado de la sangre.

Los **“parámetros o indicios clínicos”** abarcan todos los biomarcadores no relacionados con muestras o con analitos del estado de salud del individuo u otras características, tales como, sin limitación, la edad (Edad), la etnicidad (Raza), el sexo (Sexo), la presión arterial diastólica (PAD) y la presión arterial sistólica (PAS), los antecedentes familiares (FamHX), la altura (AL), el peso (PE), la cintura (Cintura) y la circunferencia de la cadera (Cadera), el índice de masa corporal (IMC) y otros, tales como la Diabetes Mellitus Tipo I o Tipo II o la Diabetes Mellitus Gestacional (DM o DMG, denominadas aquí colectivamente Diabetes), y la frecuencia cardíaca en reposo.
30

Un **“individuo”** en el contexto de la presente invención es preferiblemente un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo o una vaca, pero no se limita a estos ejemplos. Pueden usarse ventajosamente mamíferos distintos de los humanos como individuos que representen modelos animales de enfermedad arteriovascular o eventos arteriovasculares. Un individuo puede ser masculino o femenino. Un individuo puede ser uno al que previamente se le haya diagnosticado o que previamente haya sido identificado como que padece una enfermedad arteriovascular o un evento arteriovascular y, opcionalmente, ya se haya sometido o esté sometiéndose a una intervención terapéutica para la enfermedad arteriovascular o el evento
35 arteriovascular. Como alternativa, un individuo también puede ser uno al que no se le haya diagnosticado previamente una enfermedad arteriovascular. Por ejemplo, un individuo puede ser uno que presente uno o más factores de riesgo de enfermedad arteriovascular, o un individuo que no presente factores de riesgo arteriovascular, o un individuo que sea asintomático de una enfermedad arteriovascular o eventos arteriovasculares. Un individuo también puede ser uno que padezca o esté en riesgo de desarrollar una enfermedad arteriovascular o un evento arteriovascular.
40

La expresión **“TREM-1 soluble”** (sTREM-1), tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una forma soluble del dominio extracelular del TREM-1 (número de entrada Q9NP99, SEQ ID NO.: 1). El sTREM-1 se libera mediante escisión del dominio extracelular del TREM-1. El sTREM-1 puede ser una forma soluble del TREM-1 generada por escisión proteolítica de la forma del TREM-1 unida a la membrana. Un estudio realizado por Gingras (Gingras et al, Mol Immunol 2002, Mar;38(11):817-24) intentó identificar la expresión de una variante alternativa de empalme de
45 ARNm TREM-1 (TREM-1sv) que podría traducirse en un receptor soluble. Sin embargo, nunca se demostró que esta forma soluble de TREM-1 (que es una secuencia de proteínas predicha a partir de una secuencia de nucleótidos hipotética) se encontrara en humanos. Posteriormente, en 2007 y 2012, Gomez-Pina (Gomez-Pina et al, J Immunol. 2007 Sep 15; 179(6):4065-73 y Gomez-Pina et al, J Leukoc Biol. 2012 Jun;91(6):933-45) demostró que el TREM-1 soluble se genera mediante la escisión proteolítica de la forma anclada a la membrana del TREM-1 por metaloproteinasas. De hecho, el TREM-1 es una glucoproteína transmembrana que posee un ectodominio similar a la Ig que las MMP desprenden fácilmente para generar sTREM-1. No se detectaron formas alternativas de empalme de
50 TREM-1 en leucocitos humanos.
55

“Aproximadamente”, antes de una cifra, significa más o menos un 10 % del valor de dicha cifra.

Descripción detallada

5 El TREM-1 (Receptor Desencadenante Expresado en células Mieloides 1) es un inmunorreceptor expresado por células inmunitarias innatas. Sin querer ceñirse a una teoría, los inventores afirman que el acoplamiento de los Receptores Tipo NOD (NLR, por sus siglas en inglés) (incluidos los receptores tipo Toll (TLR)) induce una mejora de la regulación de la expresión del TREM-1 y su exposición en la membrana. Dicha activación de NLR y TLR puede ocurrir en condiciones inflamatorias estériles mediante un enlace de los Patrones Moleculares Asociados a Peligro (DAMP, por sus siglas en inglés) o en condiciones infecciosas mediante un enlace del Patrón Molecular Asociado a Patógenos (PAMP). Esta activación de los NLR y los TLR induce una mejora de la regulación de las metaloproteinasas que, a su vez, entre una serie de dianas, inducirán la liberación de una forma soluble de TREM-1 mediante la escisión de su dominio extracelular [Gomez-Pina et al. J Immunol. 2007, 179(6):4065-73].

En una realización, sTREM-1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2, que corresponde a los aminoácidos 21 a 205 de la SEQ ID NO.: 1.

En otra realización, sTREM-1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 3, que corresponde a los aminoácidos 31 a 205 de la SEQ ID NO.: 1.

15 En una realización, sTREM-1 es una variante de la SEQ ID NO.: 2 o una variante de la SEQ ID NO.: 3.

En una realización, una variante de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 3 es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 25 aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 165, 170, 175, 180 o 185 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 3, respectivamente.

20 En otra realización, una variante de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 3 es una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 3 respectivamente y aminoácidos adicionales en el extremo C o en el extremo N de la SEQ ID NO.: 2 o 3, en donde el número de aminoácidos adicionales varía de 1 a 50, preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10 aminoácidos, tal como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos en el extremo C y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos en el extremo N.

En otra realización, una variante de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 3 es una secuencia de aminoácidos que normalmente difiere de la SEQ ID NO.: 2 o 3 en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. En una realización, dichas sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones pueden afectar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos.

30 En otra realización, una variante de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 3 es una secuencia de aminoácidos de al menos 25 aminoácidos, preferiblemente de al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 165, 170, 175, 180 o 185 aminoácidos, que tiene al menos un 75 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 3 respectivamente.

35 El término "identidad" o "idéntica", cuando se utiliza en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere al grado de similitud de secuencia entre polipéptidos, determinado mediante el número de coincidencias entre series de dos o más residuos de aminoácido. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la menor de dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si las hay) abordadas mediante un modelo matemático o un programa informático concretos (es decir, "algoritmos"). La identidad de los polipéptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; y Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para dar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles al público. Los métodos de programa informático preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible al público en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (manual de BLAST; Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., supra). El muy conocido algoritmo de Smith Waterman también se puede utilizar para determinar la identidad.

En una realización, la variante de la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3 no es la SEQ ID NO.: 1.

55 En una realización, el sTREM-1 es un fragmento de la SEQ ID NO.: 2 o un fragmento de la SEQ ID NO.: 3.

En una realización, un fragmento de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 3 es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 25 aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 165, 170, 175, 180 o 185 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.: 2 o SEQ ID NO.: 3, respectivamente.

- 5 En una realización, el sTREM-1 corresponde al fragmento extracelular generado por escisión de la secuencia de TREM1 SEQ ID NO.: 1 mediante una metalopeptidasa de matriz, preferiblemente mediante la metalopeptidasa de matriz 9 (MMP9, por sus siglas en inglés).

Un objeto de la presente divulgación se refiere a un método para identificar a un individuo en riesgo de tener o desarrollar un evento cardiovascular o una enfermedad cardiovascular o en riesgo de muerte por cualquier causa, comprendiendo dicho método medir el nivel de sTREM-1 en una muestra del individuo, determinando así si el individuo está en riesgo de tener o desarrollar un evento o enfermedad cardiovasculares. El evento cardiovascular es el síndrome coronario agudo.

Otro objeto de la presente divulgación es un método para evaluar si un individuo está en riesgo de tener o desarrollar un evento cardiovascular o una enfermedad cardiovascular o en riesgo de muerte por cualquier causa, comprendiendo dicho método medir el nivel de sTREM-1 en una muestra del individuo, determinando así si el individuo está en riesgo de tener o desarrollar un evento o enfermedad cardiovasculares. El evento cardiovascular es el síndrome coronario agudo.

Según la presente divulgación, la muerte por cualquier causa se refiere a la muerte que se produce después de un evento o enfermedad cardiovasculares, tal como, por ejemplo, después de un primer evento o enfermedad cardiovasculares.

En un aspecto de la divulgación, el individuo puede ser un individuo sustancialmente sano, lo que significa que al individuo no se le ha diagnosticado previamente o que el individuo no ha sido identificado previamente como que tiene o padece una enfermedad cardiovascular, o que no ha desarrollado un evento cardiovascular.

En otro aspecto de la divulgación, el individuo también puede ser un individuo asintomático de la enfermedad cardiovascular. Tal como se usa en la presente memoria, un individuo "asintomático" se refiere a un individuo que no presenta los síntomas tradicionales de una enfermedad o evento cardiovascular, incluidos, pero no limitados a, dolor torácico y disnea por CC, claudicación por EAP y AIT, DCL y cefalea intensa por ECV.

En una realización de la invención, el individuo puede ser uno que esté en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular o un evento cardiovascular, según lo definido por indicios clínicos, tales como, por ejemplo: edad, sexo, concentración de LDL, concentración de HDL, concentración de triglicéridos, presión arterial, índice de masa corporal, concentración de PCR, puntuación de calcio coronario, circunferencia de cintura, tabaquismo, historial previo de enfermedad cardiovascular, antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, frecuencia cardíaca, concentración de insulina en ayunas, concentración de glucosa en ayunas, estado de diabetes y uso de medicamentos para la presión arterial alta.

En otra realización de la invención, el individuo puede ser uno al que previamente se le haya diagnosticado o que previamente haya sido identificado como que padece una enfermedad cardiovascular o un evento cardiovascular, tal como, por ejemplo, trastornos isquémicos crónicos sin necrosis miocárdica (por ejemplo, angina de pecho estable o de esfuerzo), trastornos isquémicos agudos sin necrosis miocárdica (por ejemplo, angina de pecho inestable), trastornos isquémicos con necrosis miocárdica (por ejemplo, infarto de miocardio con evaluación del segmento ST o infarto de miocardio sin elevación del segmento ST).

La isquemia tisular se define con frecuencia en términos relativos y se produce cuando las necesidades de oxígeno superan el suministro de oxígeno a los tejidos. Existe un desequilibrio entre las demandas y el suministro de oxígeno de los tejidos (por ejemplo, del miocardio). Este estado de privación de oxígeno puede ir acompañado de una eliminación inadecuada de los metabolitos como consecuencia de una reducción de la perfusión. La isquemia miocárdica se puede diagnosticar clínicamente (dolor torácico, por ejemplo), biológicamente (aumento de la actividad de la mieloperoxidasa, por ejemplo), metabólicamente mediante gammagrafía, analizando los trastornos del movimiento de la pared regional o mediante el uso de un electrocardiograma (modificaciones típicas del segmento ST, desviación del segmento ST superior o inferior, cambios típicos en la onda T, tales como la inversión de la onda T u ondas T positivas pronunciadas simétricas o de gran amplitud). La isquemia subclínica se diagnostica normalmente mediante gammagrafía o un registro de electrocardiograma de 24 horas.

La angina estable y de esfuerzo generalmente se manifiesta por un dolor torácico durante el ejercicio y se recupera lentamente en reposo. Por lo general, refleja la isquemia tisular durante el ejercicio.

La angina inestable es un aumento reciente en la frecuencia y/o la gravedad de la angina estable, un primer episodio de angina o una angina en reposo.

La necrosis miocárdica se diagnostica normalmente por un aumento de las enzimas miocárdicas (por ejemplo, troponina I, troponina T, CPK) en la sangre circulante.

En otra realización de la invención, el individuo puede ser uno que muestre una mejora en los factores de riesgo cardiovascular como resultado de tratamientos y/o terapias para enfermedades cardiovasculares. Tales mejoras incluyen una reducción del índice de masa corporal, una reducción del colesterol total, una reducción de los niveles de LDL, un aumento de los niveles de HDLC, una reducción de la presión arterial sistólica y/o diastólica, u otro factor de riesgo mencionado anteriormente o combinaciones de los mismos.

En una realización de la invención, no se ha diagnosticado el comienzo de ningún síntoma isquémico en el individuo. La isquemia miocárdica se puede diagnosticar clínicamente (dolor torácico, por ejemplo), biológicamente (aumento de la actividad de la mieloperoxidasa, por ejemplo), metabólicamente mediante gammagrafía, analizando los trastornos del movimiento de la pared regional o mediante el uso de un electrocardiograma (modificaciones típicas del segmento ST, desviación del segmento ST superior o inferior, cambios típicos en la onda T, tales como la inserción de la onda T u ondas T positivas pronunciadas simétricas o de gran amplitud).

En otra realización, se ha diagnosticado un comienzo de síntomas isquémicos en el individuo.

En una realización de la invención, la muestra usada para medir el nivel de sTREM-1 es una muestra de sangre, una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero o una muestra de orina.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "nivel" se refiere al nivel de expresión de sTREM-1. Puede referirse como alternativa al nivel de transcripción de sTREM-1 o a la traducción de sTREM-1. El nivel de expresión puede detectarse intracelularmente o extracelularmente. Los métodos para medir el nivel de sTREM-1 son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, RT-PCR, RT-qPCR, transferencia Northern, técnicas de hibridación tales como, por ejemplo, el uso de micromatrices, y combinaciones de los mismos, incluyendo, pero sin limitarse a, hibridación de amplicones obtenidos mediante RT-PCR, secuenciación tal como, por ejemplo, secuenciación de ADN de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) o ARN-Seq (también conocida como "Secuenciación de Escopeta de Transcriptoma Completo") y similares, inmunohistoquímica, métodos Multiplex (Luminex), transferencia western, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), ELISA de fase doble, ensayo de inmunoabsorción ligado a fluorescencia (FLISA, por sus siglas en inglés), inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés), radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés), citometría de flujo (FACS, por sus siglas en inglés).

Según la presente invención, el nivel de sTREM-1 se compara con un valor de referencia.

En una realización, el valor de referencia puede ser un valor de índice o puede obtenerse de uno o más algoritmos de predicción del riesgo o índices calculados para la enfermedad cardiovascular y/o el evento cardiovascular. Un valor de referencia puede ser relativo a un número o valor obtenido de estudios de población, incluidos, sin limitación, individuos que tengan un índice de masa corporal, niveles de colesterol total, niveles de LDL/HDL, presión arterial sistólica o diastólica similares, individuos del mismo grupo de edad o un grupo de edad similar, individuos del mismo grupo étnico o un grupo étnico similar, individuos con antecedentes familiares de aterosclerosis, aterotrombosis o CC, EAP o ECV, o relativo a la muestra inicial de un individuo en tratamiento para una enfermedad arteriovascular, tal como la aterosclerosis, aterotrombosis, CC, EAP o ECV.

Tales valores de referencia pueden obtenerse de análisis estadísticos y/o datos de predicción de riesgos de poblaciones obtenidos de algoritmos matemáticos e índices calculados de enfermedad arteriovascular, tales como, pero no limitados a, los algoritmos de los que se informa en el Estudio de Framingham, NCEP/ATP III, entre otros. El valor de referencia del Factor de Riesgo Cardiovascular también se puede construir y utilizar usando algoritmos y otros métodos de clasificación estadística y estructural.

En una realización, el valor de referencia es una referencia personalizada, es decir, el valor de referencia se determinó usando una muestra obtenida del individuo.

En una realización de la presente invención, el valor de referencia se obtiene del sTREM-1 en una muestra de control obtenida de uno o más individuos que están sustancialmente sanos, tal como se definió aquí anteriormente. Estos individuos que están sustancialmente sanos carecen de los factores de riesgo tradicionales de una enfermedad cardiovascular: por ejemplo, esos individuos tienen un nivel de colesterol sérico inferior a 200 mg/dL, una presión arterial sistólica inferior o igual a 120 mm Hg, una presión arterial diastólica inferior o igual a 80 mm Hg, no son actualmente fumadores, no tienen antecedentes de diabetes diagnosticada, no tienen síndrome coronario agudo o hipertensión diagnosticados previamente, entre otros factores de riesgo anteriormente mencionados, o pueden verificarse mediante otra prueba de diagnóstico invasiva o no invasiva de una enfermedad cardiovascular conocida en la técnica, tal como, pero no limitada a, electrocardiograma (ECG), ecografía carotídea en modo B (para medición del grosor íntimo-medial), tomografía computarizada con haz de electrones (EBCT, por sus siglas en inglés), puntuación de calcio coronario, tomografía computarizada multicorte de alta resolución, resonancia magnética nuclear, pruebas de esfuerzo, angiografía, ecografía intravascular (IVUS, por sus siglas en inglés), otras técnicas de diagnóstico por imágenes radioisotópicas y/o con contraste u otras técnicas de prueba de provocación.

En otra realización, se realiza un seguimiento de tales individuos y/o éstos se vuelven a someter a pruebas periódicamente durante un período de tiempo relevante para el diagnóstico ("estudios longitudinales") después de tal prueba para verificar la ausencia continua de enfermedad cardiovascular o eventos cardiovasculares agudos

(supervivencia sin enfermedad o evento). Tal período de tiempo puede ser de un año, dos años, dos a cinco años, cinco años, cinco a diez años, diez años o diez o más años a partir de la fecha de la prueba inicial para la determinación del valor de referencia. Además, se puede utilizar la medición retrospectiva del nivel de sTREM-1 en muestras de individuos históricas debidamente almacenadas en bancos para establecer estos valores de referencia, lo que acorta el tiempo de estudio requerido, suponiendo que se haya realizado un seguimiento adecuado de los individuos durante el período intermedio hasta el horizonte previsto de la reivindicación del producto.

En otra realización, un valor de referencia también puede obtenerse del nivel de sTREM-1 en una muestra obtenida de uno o más individuos a los que se les haya diagnosticado previamente o que hayan sido identificados previamente como que padecen una enfermedad cardiovascular o un evento cardiovascular mediante una de las técnicas invasivas o no invasivas anteriores, o que tengan un alto riesgo de desarrollar un evento cardiovascular, o que tengan un alto riesgo de desarrollar una rotura de placa aterosclerótica o aterotrombótica, o que hayan sufrido un evento cardiovascular o una rotura de placa.

En otra realización de la invención, un valor de referencia también puede obtenerse del nivel de sTREM-1 en una muestra obtenida de uno o más individuos que muestren una mejora en los factores de riesgo cardiovascular como resultado de tratamientos y/o terapias para enfermedades cardiovasculares. Tales mejoras incluyen una reducción del índice de masa corporal, una reducción del colesterol total, una reducción de los niveles de LDL, un aumento de los niveles de HDLC, una reducción de la presión arterial sistólica y/o diastólica, u otro factor de riesgo mencionado anteriormente o combinaciones de los mismos.

En otra realización de la invención, un valor de referencia también puede obtenerse del nivel de sTREM-1 en una muestra obtenida de uno o más individuos que no muestren ninguna mejora en los factores de riesgo cardiovascular como resultado de tratamientos y/o terapias para enfermedades cardiovasculares. Tales mejoras incluyen una reducción del índice de masa corporal, una reducción del colesterol total, una reducción de los niveles de LDL, un aumento de los niveles de HDLC, una reducción de la presión arterial sistólica y/o diastólica, u otro factor de riesgo mencionado anteriormente o combinaciones de los mismos.

En una realización de la invención, el valor de referencia es un valor de índice o un valor base. Un valor de índice o valor base se obtiene de uno o más individuos que no tienen una enfermedad cardiovascular, tal como aterosclerosis, aterotrombosis, CC, EAP o ECV, o individuos que son asintomáticos de una enfermedad cardiovascular. Un valor base también puede obtenerse de un individuo que haya mostrado una mejora en los factores de riesgo cardiovascular (como resultado de tratamientos o terapias cardiovasculares). Tales mejoras incluyen, sin limitación, una reducción del índice de masa corporal, una reducción del colesterol total, una reducción de los niveles de LDL, un aumento de los niveles de HDLC, una reducción de la presión arterial sistólica y/o diastólica, o combinaciones de los mismos.

En una realización de la invención, dicho evento cardiovascular es un infarto de miocardio.

En un aspecto de la divulgación, cuando el nivel de sTREM-1 medido en una muestra de sangre es igual o superior a 265 pg/mL, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 360, 370, 380, 390 o 400 pg/mL, entonces se identifica al individuo como en riesgo de muerte relacionado con o causado por un evento cardiovascular o una enfermedad cardiovascular.

En una realización, se eligen individuos identificados como que tienen o están en un riesgo elevado de desarrollar un evento cardiovascular para recibir un régimen terapéutico para retrasar la evolución de una enfermedad cardiovascular, o disminuir o prevenir el riesgo de desarrollar un evento cardiovascular.

En otro aspecto de la divulgación, el método descrito aquí anteriormente es para realizar un seguimiento de la eficacia de un tratamiento para una enfermedad cardiovascular. La eficacia del tratamiento se reflejará en los cambios en el nivel de sTREM-1. Si un tratamiento tiene un efecto deseado, el nivel de sTREM-1 será menor en comparación con el obtenido antes del tratamiento. Por otro lado, si un tratamiento no tiene el efecto deseado, el nivel de sTREM-1 se mantendrá alto. En una realización, el nivel de sTREM-1 obtenido antes o al comienzo del tratamiento es el valor de referencia.

Por lo tanto, el practicante podrá adaptar el tratamiento (dosis, régimen) para conseguir una disminución del nivel de sTREM-1 a su nivel basal o al nivel obtenido en individuos sanos.

Los ejemplos de tratamientos para una enfermedad cardiovascular incluyen, pero no se limitan a, aspirina, clopidogrel, prasugrel, inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa, heparina de bajo peso molecular, heparina no fraccionada, fondaparinux, bivalirudina, estatina, agentes betabloqueantes, ACE-I o ARB.

Otros ejemplos de tratamiento para una enfermedad cardiovascular incluyen un tratamiento basado en la modulación de la función, actividad o expresión del TREM-1. Los ejemplos de moduladores de la función, actividad o expresión del TREM-1 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos guiados a TREM-1 y/o sTREM-1 o ligando de TREM-1 y/o sTREM-1, moléculas pequeñas que inhiban la función, actividad o expresión de TREM-1, péptidos que inhiban la función, actividad o expresión de TREM-1, ARNip guiados a TREM-1, ARNhc guiados a TREM-1, oligonucleótidos antisentido guiados a TREM-1, ribozimas guiadas a TREM-1 o aptámeros de TREM-1.

Un ejemplo concreto de tratamiento para una enfermedad cardiovascular es un tratamiento con un péptido guiado al ligando de sTREM-1, tal como, por ejemplo, LR12 (SEQ ID NO.: 4).

Por consiguiente, el nivel de sTREM-1 se mide en una muestra obtenida antes de la terapia (constituyendo dicho nivel el valor de referencia) y en al menos otra muestra obtenida durante la terapia. Una disminución en el nivel de sTREM-1 es entonces indicativa de un efecto positivo de la terapia en el individuo. A la inversa, un nivel similar o un nivel elevado de sTREM-1 es indicativo de la falta de eficacia de la terapia. En una realización de la invención, se obtiene una muestra del paciente antes de la terapia y cada mes durante la terapia, durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más o durante al menos 1 año, 2 años, 3 años o más.

En otra realización, el nivel de sTREM-1 se puede medir en una muestra obtenida al comienzo de la terapia (constituyendo dicho nivel el valor de referencia) y en al menos otra muestra obtenida durante la terapia. En una realización de la invención, se obtiene una muestra del paciente al comienzo de la terapia y cada mes durante la terapia, durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más o durante al menos 1 año, 2 años, 3 años o más. En una realización, el comienzo de la terapia corresponde al día de la primera administración del tratamiento.

Según la presente invención, un nivel más alto de sTREM-1 en la muestra de ensayo en comparación con el valor de referencia es indicativo de un riesgo de desarrollar un evento cardiovascular. En una realización, un nivel de sTREM-1 en la muestra de ensayo superior o igual al 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más en comparación con el valor de referencia es indicativo de un riesgo de desarrollar un evento cardiovascular.

En una realización, un nivel más alto de sTREM-1 en la muestra de ensayo en comparación con el valor de referencia es indicativo de un riesgo grave de desarrollar un evento cardiovascular. En una realización, un nivel de sTREM-1 en la muestra de ensayo superior o igual a aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más en comparación con el valor de referencia es indicativo de un riesgo grave de desarrollar un evento cardiovascular.

En una realización, el método de seguimiento de la invención comprende:

- i) medir el nivel de sTREM-1 en una muestra obtenida de dicho individuo antes de la terapia,
- ii) medir el nivel de sTREM-1 en una muestra obtenida de dicho individuo durante la terapia, preferiblemente cada mes durante la terapia, durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más o durante al menos 1 año, 2 años, 3 años o más,
- iii) comparar el nivel medido en la etapa ii) con el nivel de sTREM-1 medido en la etapa i), siendo una disminución en el nivel de sTREM-1 indicativa de un efecto positivo de la terapia en el individuo.

En otra realización, el método de seguimiento de la invención comprende:

- i) medir el nivel de sTREM-1 en una muestra obtenida de dicho individuo al comienzo de la terapia, preferiblemente el día de la primera administración del tratamiento,
- ii) medir el nivel de sTREM-1 en una muestra obtenida de dicho individuo durante la terapia, preferiblemente cada mes durante la terapia, durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más o durante al menos 1 año, 2 años, 3 años o más,
- iii) comparar el nivel medido en la etapa ii) con el nivel de sTREM-1 medido en la etapa i), siendo una disminución en el nivel de sTREM-1 indicativa de un efecto positivo de la terapia en el individuo.

En una realización, un nivel de sTREM-1 en la muestra de ensayo inferior o igual a aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más en comparación con el nivel de sTREM-1 medido antes o al comienzo de la terapia es indicativo de un efecto positivo de la terapia en el individuo.

En una realización, el valor de referencia es de aproximadamente o al menos 80 pg/mL, 100 pg/mL, o aproximadamente o al menos aproximadamente 150, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 520, 540, 560, 580, 600, 620, 640, 660, 680, 700 pg/mL o más.

En una realización, los niveles de sTREM-1 medidos en la población de referencia utilizada para obtener el valor de referencia se clasifican en percentiles, ordenándose los valores de nivel de sTREM-1 obtenidos por todos los individuos de la población de referencia de acuerdo con su valor numérico en orden ascendente. En una realización de la invención, los percentiles son percentiles de individuos, es decir, cada percentil comprende el mismo número de individuos. Por lo tanto, el primer percentil corresponde a los individuos con los niveles más bajos de sTREM-1, mientras que el último percentil corresponde a los individuos con los niveles más altos de sTREM-1.

En una realización, el valor de referencia corresponde al nivel más alto de sTREM-1 del primer percentil de la población de referencia.

En otra realización, el valor de referencia corresponde al nivel más alto de sTREM-1 del segundo, tercer... o penúltimo percentiles de la población de referencia.

En una realización, cuando se sacan tres percentiles, cada percentil se denomina tercil. Según esta realización, el valor de referencia corresponde al nivel más alto de sTREM-1 del primer o del segundo terciles.

- 5 En otra realización, cuando se sacan cuatro percentiles, cada percentil se denomina cuartil. Según esta realización, el valor de referencia corresponde al nivel más alto de sTREM-1 del primer, segundo o tercer cuartiles.

Según la invención, el nivel de sTREM-1 puede medirse mediante cualquier método conocido en la técnica.

- 10 Normalmente, los métodos pueden comprender poner en contacto la muestra con un partícipe de unión capaz de interactuar selectivamente con sTREM-1 en la muestra. En algunos aspectos, los partícipes de unión son anticuerpos, tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o aptámeros.

- 15 Los ejemplos de anticuerpos que permiten la detección del sTREM-1 incluyen, pero no se limitan a, el anticuerpo policlonal producido contra los aminoácidos Met1-Arg200 del TREM-1 humano, Ref AF1278 de R&D Systems; y el anticuerpo monoclonal producido contra el Ala21-Asn205 del TREM-1 humano, Ref MAB1278 de R&D Systems. Otros ejemplos no limitativos de anticuerpos que permiten la detección del sTREM-1 incluyen los anticuerpos de sTREM-1 y/o TREM-1 descritos en las siguientes patentes o solicitudes de patente: US2013/150559, US 2013/211050, US 2013/309239, WO2013/120553 y US8,106,165.

- 20 Los ensayos anteriormente mencionados implican generalmente la unión del partícipe (es decir, el anticuerpo o el aptámero) a un soporte sólido. Los soportes sólidos que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a, sustratos tales como la nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microtitulación); el cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); el látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); el fluoruro de polivinilidina; el papel diazotizado; las membranas de nailon; las perlas activadas, las perlas magnéticamente sensibles y similares. El nivel de sTREM-1 se puede medir mediante el uso de técnicas de inmunodiagnóstico estándar, incluidos los inmunoensayos, tales como los ensayos de competencia, reacción directa o tipo sándwich. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, pruebas de aglutinación; 25 inmunoensayos mediados y marcados por enzimas, tales como los ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación.

- 30 Una prueba bioquímica ejemplar para identificar proteínas específicas emplea un formato de prueba estandarizado, tal como la prueba ELISA, aunque la información proporcionada en la presente memoria puede aplicarse al desarrollo de otras pruebas bioquímicas o de diagnóstico y no se limita al desarrollo de una prueba ELISA (véase, por ejemplo, Molecular Immunology: A Textbook, editado por Atassi et al. Marcel Dekker Inc., Nueva York y Basilea 1984, para una descripción de las pruebas ELISA). Se entiende que están disponibles equipos de reactivos comerciales de ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) para diversos constituyentes plasmáticos. Por lo tanto, se puede utilizar el método ELISA, en donde los pocillos de una placa de microtitulación están revestidos con un conjunto de anticuerpos que reconocen el sTREM-1. A continuación, se añade una muestra que contiene o se sospecha que 35 contiene sTREM-1 a los pocillos revestidos. Tras un período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, se pueden lavar la o las placas para eliminar los restos no unidos y se puede añadir una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de la muestra recogida, se lava la placa y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando métodos bien conocidos en la técnica.

- 40 Los ejemplos de ensayos ELISA incluyen, pero no se limitan a, el equipo de reactivos TREM-1 Quantikine ELISA de R&D Systems; el Human TREM-1 DuoSet, Ref DY1278B y DY1278BE de R&D Systems, el sTREM-1 ELISA, Ref sTREM-1 ELISA de IQProducts.

- 45 La medición del nivel de sTREM-1 (con o sin métodos basados en inmunoensayos) también puede incluir la separación de los compuestos: centrifugación basada en el peso molecular del compuesto; electroforesis basada en la masa y la carga; HPLC basada en la hidrofobicidad; cromatografía de exclusión por tamaños basada en el tamaño; y afinidad en fase sólida basada en la afinidad del compuesto por la fase sólida concreta que se usa. Una vez separados, dichos compuestos pueden identificarse basándose en el conocido "perfil de separación", por ejemplo, el tiempo de retención, para ese compuesto y medirse usando técnicas estándar.

- 50 Como alternativa, los compuestos separados pueden detectarse y medirse, por ejemplo, mediante un espectrómetro de masas.

Por lo general, los niveles de sTREM-1 en una muestra pueden medirse mediante un ensayo inmunométrico sobre la base de una técnica tipo "sándwich" de doble anticuerpo, con un anticuerpo monoclonal específico para sTREM-1.

Breve descripción de los dibujos

- 55 La **Figura 1** es un gráfico que representa la concentración plasmática de TREM-1 soluble y los resultados cardiovasculares tras un infarto de miocardio en la cohorte FAST-MI-2005.

La **Figura 2** es un gráfico que representa el área bajo la curva (ABC) ROC de los niveles de sTREM-1 en el modelo ajustado de la cohorte FAST-MI-2005.

La **Figura 3** es un gráfico que representa la concentración plasmática de TREM-1 soluble y la muerte tras un infarto de miocardio en la cohorte FAST-MI-2010.

- 5 La **Figura 4** es una combinación de histogramas que representan los niveles plasmáticos de sTREM-1 después de un evento isquémico cardíaco y en ratones ateroscleróticos.

10 (A) Unos ratones Balb/c machos adultos (20-23 g) se sometieron a isquemia miocárdica y se agruparon aleatoriamente (n = 10 por grupo) para recibir inyecciones i.p. repetidas de LR12 (100 µg en 0.2 mL de NaCl al 0.9 % una vez al día durante 5 días) o LR12 aleatorizado (100 µg en 0.2 mL de NaCl al 0.9 % una vez al día durante 5 días). Se obtuvieron muestras de sangre a las 24, 72 y 168 horas después del evento isquémico cardíaco para medir los niveles plasmáticos de sTREM-1. La base fisiológica se calcula a partir de la dosis en animales sanos. N = 10 por grupo y por punto temporal.

15 (B) Unos ratones ateroscleróticos se aleatorizaron para recibir inyecciones i.p. de LR12 (100 µg en 0.2 mL de NaCl al 0.9 % una vez al día durante 4 semanas) o LR12 aleatorizado (100 µg en 0.2 mL de NaCl al 0.9 % una vez al día durante 4 semanas). Se obtuvieron muestras de sangre al final del tratamiento (4 semanas) para evaluar las concentraciones plasmáticas de sTREM-1. La base fisiológica se calcula a partir de la dosis en animales sanos. N=10 por grupo.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

20 Métodos

Población de estudio 1

25 La población y los métodos del registro Francés de Infarto Agudo de Miocardio con y sin elevación del ST (FAST-MI, por sus siglas en inglés) se han descrito en detalle en publicaciones anteriores (Cambou, J.-P et al., 2007. Arch. Mal. Coeur Vaiss. 100: 524-534, Simon, T., et al. 2009. N. Engl. J. Med. 360: 363-375.). En resumen, se incluyó en el registro a todos los individuos mayores de 18 años si tenían marcadores séricos elevados de necrosis miocárdica superiores al doble del límite superior normal de creatina quinasa, creatina quinasa MB o troponinas elevadas, y síntomas compatibles con un IM agudo y/o cambios electrocardiográficos en al menos dos derivaciones contiguas con ondas Q patológicas (>0.04 s) y/o una elevación o depresión persistentes del ST >0.1 mV. El tiempo desde el comienzo de los síntomas hasta el ingreso en la unidad de cuidados intensivos tenía que ser inferior a 48 h. Los individuos se gestionaron de acuerdo con la práctica habitual; el tratamiento no se vio afectado por la participación en el registro. De los 374 centros de Francia que trataban a individuos con IM agudo en ese momento, 223 (el 60 %) participaron en el registro y reclutaron a 3670 pacientes. Entre éstos, 100 centros reclutaron a 1061 pacientes que contribuyeron al banco de suero.

35 Sus características base eran comparables a las de la población general del registro. Más del 99 % de los individuos eran caucásicos. El seguimiento se reunió mediante contactos con los médicos de los individuos, los propios individuos o sus familiares y las oficinas de registro de su lugar de nacimiento. El seguimiento de un año se completó en más del 99 %. El estudio fue revisado por el Comité para la Protección de los Individuos Humanos en la Investigación Biomédica del Hospital Universitario de Saint Antoine y el archivo de datos fue declarado a la Commission Nationale Informatique et Libertés.

40 Población de estudio 2

45 Aquí se utiliza un segundo estudio de confirmación, denominado FAST-MI-2010. Esta cohorte se ha descrito en detalle en publicaciones anteriores (Hanssen M et al. Heart. 2012 May;98(9):699-705). En resumen, todos los individuos mayores de 18 años se incluyeron en el registro si tenían elevación de marcadores séricos de necrosis miocárdica (troponinas o creatina quinasa MB), con al menos uno de los siguientes: síntomas compatibles con la isquemia miocárdica, desarrollo de nuevas ondas Q anormales, cambios del ST-T compatibles con la isquemia miocárdica (elevación o depresión del segmento ST, inversión de la onda T). El tiempo desde el comienzo de los síntomas hasta el ingreso en la unidad de cuidados intensivos tenía que ser inferior a 48 h. Los individuos se gestionaron de acuerdo con la práctica habitual; el tratamiento no se vio afectado por la participación en el registro. 213 centros (el 76 % de los centros que trataban a pacientes con IAM en ese momento) participaron en el registro y reclutaron a 4169 pacientes, comenzando la inclusión el 1 de octubre de 2010. FAST-MI 2010 se creó para realizar una nueva encuesta con objetivos similares a los del registro de 2005. El seguimiento de un año se completó en más del 99 %.

Muestreo y mediciones de sangre

Las muestras de sangre utilizadas para este estudio se obtuvieron en el momento del ingreso en la unidad de cuidados intensivos (<48 h desde el comienzo de los síntomas). Las muestras de sangre se almacenaron a -80 °C. Todas las

muestras se identificaron sólo por número y se analizaron en orden aleatorio. Las concentraciones séricas de sTREM-1 se determinaron mediante ELISA (TREM-1 Duo-Set, RnDsystems) utilizando un límite de detección de 46.9 pg/mL. En la primera cohorte (FAST-MI-2005), entre los 1061 individuos que contribuyeron a un banco, se obtuvieron los resultados de los niveles de sTREM-1 en 1015 individuos (faltaban medidas). En la segunda cohorte FAST-MI-2010, se obtuvieron los resultados de los niveles de sTREM-1 en 1293 individuos.

Se determinaron los niveles séricos de sTREM-1 en ratones mediante ELISA (equipo de reactivos de ELISA para ratones TREM-1 Quantikine, RnDsystems) usando un límite de detección de 31.3 pg/mL.

Análisis estadístico

Un evento de valoración se definió como la muerte por cualquier causa o un IM no mortal durante el período de seguimiento de 2 años. El criterio de valoración principal, una combinación de muertes por cualquier causa e IM no mortal, definido como el índice de episodios en el momento de la inclusión, fue juzgado por un comité, cuyos miembros desconocían las medicaciones de los pacientes, y las mediciones de sangre. Las variables continuas se describen como media $\pm$ DE y las variables categóricas como frecuencias y porcentajes. Los niveles plasmáticos de sTREM-1 y proteína C reactiva se transformaron logarítmicamente para eliminar la asimetría positiva, antes de usarse como variables continuas. Las características demográficas y clínicas base, los factores de tratamiento y la gestión terapéutica durante la hospitalización se compararon según lo especificado previamente entre los terciles de los niveles de sTREM-1 mediante χ^2 o pruebas exactas de Fisher para variables discretas, y mediante la prueba del orden con signo de Wilcoxon o la prueba de Kruskal-Wallis para las variables continuas. Los terciles de los niveles de sTREM-1 se construyeron basándose en los datos de toda la muestra.

Las curvas de supervivencia según los terciles de sTREM-1 se estiman utilizando el estimador de Kaplan-Meier.

Usamos un modelo multivariable de riesgos proporcionales de Cox para evaluar el valor de pronóstico independiente de las variables con el criterio de valoración principal durante el período de seguimiento de 2 años. El modelo multivariable incluyó el sexo, la edad, el tabaquismo anterior o actual, el índice de masa corporal, los antecedentes familiares de enfermedad coronaria, los antecedentes de hipertensión, el IM agudo previo, la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia renal, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la diabetes, la frecuencia cardíaca al ingreso, la clase de Killip, la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, la gestión hospitalaria (incluida la terapia de reperfusión, las estatinas, los betabloqueantes, el clopidogrel, los diuréticos, los digitálicos, la heparina) y los niveles logarítmicos de proteína C reactiva. Los resultados se expresan como cocientes de riesgos para los modelos de Cox con intervalos de confianza (IC) del 95 %. La sensibilidad frente a la frecuencia de falsos positivos (1-especificidad) para los resultados cardiovasculares durante el seguimiento asociados con los niveles de sTREM-1 se analizó mediante una curva de eficacia diagnóstica (ROC, por sus siglas en inglés). El índice de Youden se calculó para los niveles de sTREM-1 mediante la siguiente fórmula: sensibilidad + especificidad - 1; correspondiendo el valor máximo del índice de Youden al punto límite óptimo (Youden WJ. Cancer. 1950;3:32-35).

Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y se realizaron con la versión 9.3 del software SAS.

Péptidos

El LR12 es un péptido de 12 aminoácidos (LQEEDTGEYGCV, SEQ ID NO.: 4) que se sabe que se dirige específicamente al ligando de TREM-1. Se sintetizó químicamente (Pepscan Presto BV, Lelystad, Países Bajos) como un péptido amidado con Cter para ensayos *in vivo*. Los péptidos correctos se obtuvieron con rendimientos >95 % y fueron homogéneos después de la purificación preparativa, como se confirmó mediante espectrometría de masas y cromatografía líquida analítica de alta resolución en fase inversa. Estos péptidos estaban libres de endotoxina. El péptido aleatorizado correspondiente se sintetizó de manera similar y sirvió de péptido de control (el LR12 aleatorizado, compuesto de los mismos aminoácidos que el LR12, pero en una secuencia aleatorizada que se sabe que no muestra propiedades inhibitoras de TREM-1).

Animales

Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité local para el cuidado y el uso de animales de laboratorio y se realizaron de acuerdo con las directrices internacionales sobre experimentación con animales. Los ratones y las ratas se obtuvieron de Charles River (Estrasburgo, Francia).

Modelo de ratón de infarto de miocardio

Todos los procedimientos se realizaron en ratones macho C57BL/C de edades comprendidas entre 6 y 8 semanas. Los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de xilazina (60 mg/kg) y se fijaron en posición supina. La tráquea se intubó y se ventiló (el volumen tidal era de 200 μ L/25 g y la frecuencia respiratoria era de 120 respiraciones/min). Tras una toracotomía izquierda, se identificó la arteria coronaria izquierda y se ligó con una sutura quirúrgica de prolene 8-0 a 1.0 mm en dirección distal de la punta de la aurícula izquierda. La oclusión de la LAD se confirmó mediante un cambio en el color del miocardio de rojo a blanco en el área de la isquemia (ventrículo izquierdo). Se cerró el pecho y se suturó la piel con seda 6-0. Los animales regresaron a su jaula, donde son supervisados hasta su completa recuperación.

Los ratones se aleatorizaron para recibir o no péptidos (inyección ip diaria durante 5 días, 5 mg/kg) y se sacrificaron después de 24 h, 72 h y 168 h (n = 6 por grupo) mediante anestesia seguida de una sobredosis de pentobarbital sódico para la toma de muestras de sangre.

Aterosclerosis en ratones

- 5 A ratones ApoE^{-/-} machos de 12 y 24 semanas de edad se les administraron una dieta de grasas (15 % de lípidos, 1.25 % de colesterol, sin colato) o pienso y un tratamiento mediante una inyección intraperitoneal diaria de péptidos (100 µg/día). Después de 4 semanas de tratamiento, los ratones se sacrificaron para tomar muestras de sangre.

Resultados 1

- 10 Nuestro objetivo era evaluar la relación entre los niveles de TREM-1 soluble y los resultados cardiovasculares en los pacientes inscritos en el registro Francés de Infarto de Miocardio con elevación Aguda o sin elevación del ST (FAST-MI, NCT00673036) dentro de las 48 horas posteriores a un infarto agudo de miocardio. Los niveles séricos de sTREM-1 se asociaron con el riesgo de muerte por cualquier causa y de IM recurrente a los uno y dos años, y un nivel alto de sTREM-1 indicaba un peor resultado. De los 1015 pacientes inscritos, 183 pacientes (18 %) murieron o tuvieron un IM durante el período de seguimiento de 2 años.
- 15 Los pacientes que murieron o tuvieron un IM durante el seguimiento eran de edad más avanzada (75 ± 12 frente a 64 ± 13 años), con una mayor proporción de mujeres (42 frente al 27 %), que los que no presentaron ningún evento de valoración. También tenían una tasa más alta de hipertensión, diabetes, insuficiencia cardíaca previa, IM previo, ataque fulminante previo o evento isquémico transitorio, insuficiencia renal crónica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- 20 Tenían menos probabilidades de recibir terapia con estatinas (68 frente al 81 %), betabloqueantes (50 frente al 76 %), clopidogrel, heparina, pero más probabilidades de tomar diuréticos o digoxina en comparación con los pacientes sin ningún resultado durante el seguimiento. Los pacientes que tuvieron un evento tenían un mayor riesgo de muerte hospitalaria según la puntuación de riesgo GRACE (por sus siglas en inglés (Registro Global de Eventos Coronarios Agudos)) y menos pacientes se sometieron a una angioplastia coronaria ICP (43 frente al 73 %) o trombólisis (9 frente al 17 %) durante la hospitalización.
- 25

Las características de los pacientes según sus resultados se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1

2 años de seguimiento	Pacientes sin evento de valoración n = 832	Pacientes con evento de valoración n = 183	p†
Factores demográficos y de riesgo			
Sexo masculino, NO. (%)	605 (73 %)	107 (58 %)	0.0001
Edad, años ‡	64 ± 13	75 ± 12	<0.0001
Hipertensión, NO. (%)	483 (58 %)	147 (80 %)	<0.0001
Hipercolesterolemia, NO. (%)	435 (52 %)	99 (54 %)	0.6562
Diabetes mellitus, NO. (%)	225 (27 %)	94 (51 %)	<0.0001
Antecedentes familiares de CC, NO. (%)	221 (27 %)	24 (13 %)	0.0001
Fumadores anteriores o actuales, NO. (%)	484 (58 %)	77 (42 %)	<0.0001
Infarto de miocardio previo, NO. (%)	124 (15 %)	54 (30 %)	<0.0001
ICP o IDAC previos, NO. (%)	133 (16 %)	44 (24 %)	0.0093
Ataque fulminante o AIT previos, NO. (%)	52 (6 %)	25 (14 %)	0.0006
Insuficiencia cardíaca previa, NO. (%)	26 (3 %)	27 (15 %)	<0.0001
Insuficiencia respiratoria previa, NO. (%)	29 (3 %)	25 (14 %)	<0.0001
Insuficiencia renal crónica, NO. (%)	25 (3 %)	26 (14 %)	<0.0001
Presentación clínica			

Índice de masa corporal (kg/m ²) ‡	27 ± 5	26 ± 5	0.0232
Presión arterial sistólica en el momento del ingreso ‡	141 ± 28	138 ± 31	0.1434
Presión arterial diastólica en el momento del ingreso ‡	81 ± 17	76 ± 17	0.0001
Frecuencia cardíaca en el momento del ingreso ‡	78 ± 20	86 ± 24	<0.0001
STEMI, NO. (%)	456 (55 %)	73 (40 %)	0.0003
Clase Killip entree = 2 o más, NO. (%)	170 (21 %)	98 (55 %)	<0.0001
Puntuación GRACE ‡	158 ± 36	186 ± 35	<0.0001
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo ‡	54 ± 12	47 ± 14	<0.0001
Exámenes biológicos base			
PCR (mg/L) ‡	10.3 ± 14.2	16.0 ± 17.6	<0.0001
sTREM-1 (pg/mL) ‡	330 ± 386	541 ± 633	<0.0001
Gestión hospitalaria			
ICP, NO. (%)	608 (73 %)	79 (43 %)	<0.0001
Trombólisis, NO. (%)	144 (17 %)	17 (9 %)	0.0075
Cirugía de derivación arterial coronaria, NO. (%)	31 (4 %)	6 (3 %)	0.7701
Estatinas, NO. (%)	674 (81 %)	124 (68 %)	<0.0001
Betabloqueantes, NO. (%)	635 (76 %)	92 (50 %)	<0.0001
Bloqueantes de los canales de calcio, NO. (%)	162 (19 %)	48 (26 %)	0.041
Inhibidores de la ECA o BRA, NO. (%)	455 (55 %)	98 (54 %)	0.78
Derivados nitrados, NO. (%)	427 (51 %)	105 (57 %)	0.1376
Aspirina, NO. (%)	771 (93 %)	158 (86 %)	0.0054
Clopidogrel, NO. (%)	758 (91 %)	139 (76 %)	<0.0001
Heparina, NO. (%)	702 (84 %)	138 (75 %)	0.0037
Heparina de bajo peso molecular, NO. (%)	543 (65 %)	96 (52 %)	0.0012
Diuréticos, NO. (%)	225 (27 %)	118 (64 %)	<0.0001
Inhibidor de la glucoproteína IIb/IIIa, NO. (%)	351 (41 %)	54 (30 %)	0.0015
Glucósidos digitálicos, NO. (%)	9(1 %)	11 (6 %)	<0.0001

† p se obtiene mediante la prueba del orden con signo de Wilcoxon o la prueba de Kruskal-Wallis (para variables continuas) y la prueba exacta de Pearson χ^2 o de Fisher (para variables categóricas), ‡ media ± d.e. ECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o BRA: bloqueantes de los receptores de angiotensina, ICP: angioplastia coronaria percutánea, IDAC: cirugía de derivación arterial coronaria.

Las características de los pacientes según los terciles sTREM-1 se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2

sTREM-1 (pg/mL)	Tercil 1 < 212.4	Tercil 2 [212.4-354[	Tercil 3 ≥ 354	p†
Factores demográficos y de riesgo				
Sexo masculino, NO. (%)	239 (71 %)	240 (71 %)	233 (69 %)	0.7677
Edad, años ‡	64 ± 12	65 ± 14	70 ± 14	<0.0001
Hipertensión, NO. (%)	200 (59 %)	190 (56 %)	240 (71 %)	0.0002
Hipercolesterolemia, NO. (%)	179 (53 %)	179 (53 %)	176 (52 %)	0.9489
Diabetes mellitus, NO. (%)	112 (33 %)	88 (26 %)	119 (35 %)	0.031
Antecedentes familiares de CC, NO. (%)	87 (26 %)	96 (28 %)	62 (18 %)	0.006
Fumadores anteriores o actuales, NO. (%)	187 (55 %)	207 (61 %)	167 (49 %)	0.0064
Infarto de miocardio previo, NO. (%)	52 (15 %)	54 (16 %)	72 (21 %)	0.0872
ICP o IDAC anteriores, NO. (%)	55 (16 %)	59 (18 %)	63 (19 %)	0.7199
Ataque fulminante o AIT previos, NO. (%)	15 (4 %)	19 (6 %)	43 (13 %)	<0.0001
Insuficiencia cardíaca previa, NO. (%)	6 (2 %)	11 (3 %)	36 (11 %)	<0.0001
Insuficiencia respiratoria previa, NO. (%)	9 (3 %)	15 (4 %)	30 (9 %)	0.0011
Insuficiencia renal crónica, NO. (%)	4 (1 %)	6 (2 %)	41 (12 %)	<0.0001
Presentación clínica				
Índice de masa corporal (kg/m²) ‡	28 ± 5	27 ± 4	27 ± 5	0.0132
Presión arterial sistólica en el momento del ingreso ‡	143 ± 28	140 ± 27	138 ± 31	0.0925
Presión arterial diastólica en el momento del ingreso ‡	81 ± 16	80 ± 16	79 ± 18	0.0471
Frecuencia cardíaca en el momento del ingreso ‡	75 ± 17	80 ± 23	83 ± 22	<0.0001
STEMI, NO. (%)	172 (51 %)	181 (54 %)	176 (52 %)	0.7385
Clase Killip entree = 2 o más, NO. (%)	37 (11 %)	81 (24 %)	150 (45 %)	<0.0001
Puntuación GRACE ‡	151 ± 31	161 ± 37	177 ± 38	<0.0001
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo ‡	56 ± 11	53 ± 12	49 ± 14	<0.0001
Exámenes biológicos base				
PCR (mg/L) ‡	7.1 ± 9.3	11.7 ± 16	15.3 ± 17.4	<0.0001
sTREM-1 (pg/mL) ‡	139 ± 48	278 ± 40	686 ± 660	<0.0001
Gestión hospitalaria				
ICP, NO. (%)	251 (74 %)	241 (72 %)	195 (58 %)	<0.0001
Trombólisis, NO. (%)	48 (14 %)	58 (17 %)	55 (16 %)	0.5602

Cirugía de derivación arterial coronaria, NO. (%)	18 (5 %)	7 (2 %)	12 (4 %)	0.0803
Estatinas, NO. (%)	272 (80 %)	274 (81 %)	252 (74 %)	0.0586
Betabloqueantes, NO. (%)	258 (76 %)	247 (73 %)	222 (65 %)	0.0064
Bloqueantes de los canales de calcio, NO. (%)	66 (19 %)	65 (19 %)	79 (23 %)	0.3459
Inhibidores de la ECA o BRA, NO. (%)	171 (50 %)	184 (55 %)	198 (58 %)	0.1143
Derivados nitrados, NO. (%)	170 (50 %)	176 (52 %)	186 (55 %)	0.4674
Aspirina, NO. (%)	316 (93 %)	311 (92 %)	302 (89 %)	0.1287
Clopidogrel, NO. (%)	313 (92 %)	298 (88 %)	286 (84 %)	0.0053
Heparina, NO. (%)	289 (85 %)	289 (86 %)	262 (77 %)	0.0047
Heparina de bajo peso molecular, NO. (%)	238 (70 %)	227 (67 %)	174 (51 %)	<0.0001
Diuréticos, NO. (%)	63 (19 %)	106 (31 %)	174 (51 %)	<0.0001
Inhibidor de la glucoproteína IIb/IIIa, NO. (%)	139 (41 %)	148 (44 %)	118 (35 %)	0.0473
Glucósidos digitálicos, NO. (%)	1 (0.4 %)	8 (2 %)	11 (3 %)	0.0178

†p se obtiene mediante la prueba del orden con signo de Wilcoxon o la prueba de Kruskal-Wallis (para variables continuas) y la prueba exacta de Pearson χ^2 o de Fisher (para variables categóricas), ‡ media $\pm$ d.e.
 ECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o BRA: bloqueantes de los receptores de angiotensina, ICP: angioplastia coronaria percutánea, IDAC: cirugía de derivación arterial coronaria.

Se midió el nivel de sTREM-1 (pg/mL) (Tabla 3).

La mediana del nivel de sTREM-1 para toda la población fue de 273 pg/mL (intervalo 50-7069; primer tercil <212.4 pg/mL, n=339; tercer tercil >354 pg/mL, n=339).

5

Tabla 3

NO. en riesgo									
Días	0	90	180	270	360	450	540	630	720
Tercil sTREM-1	339	319	314	306	302	298	295	282	238
Tercil sTREM-1	337	310	304	296	292	288	283	258	234
Tercil sTREM-1	339	281	263	251	243	237	232	206	176

La probabilidad de los eventos de valoración en función del nivel base de sTREM-1 se presenta en la Figura 1.

Al cabo de 1 año, las tasas de eventos de mortalidad e IM fueron del 6 % para el primer tercil, del 9 % para el segundo tercil y del 24 % para el tercer tercil.

10 Al cabo de 2 años, las tasas de eventos de mortalidad e IM fueron del 9 % para el primer tercil, del 14 % para el segundo tercil y del 31 % para el tercer tercil.

15 El CR ajustado de muerte e IM recurrente durante los 2 años de seguimiento, asociado con un aumento de 1 unidad pg/mL de log (sTREM-1), fue de 1.70 (IC del 95 % 1.33-2.17; $p < 0.0001$). También probamos la tendencia en los terciles de sTREM-1 para examinar la asociación en un intervalo más amplio de niveles de sTREM-1. En comparación con el tercil 1, elegido como referencia, el CR ajustado fue de 1.38 (IC del 95 % 0.83-2.28) y de 2.08 (IC del 95 % 1.28-3.39) para el tercil 2 y el tercil 3, respectivamente (p general = 0.006). La prueba de tendencias de Cochran-Armitage fue significativa ($p < 0.0001$).

El área bajo la curva (ABC) ROC de los niveles de sTREM-1 en el modelo ajustado que predijo con precisión los resultados cardiovasculares después de un seguimiento de 2 años fue de 0.847 (Figura 2).

Teniendo en cuenta los valores más altos de sensibilidad combinados con los valores más bajos de (1-especificidad), el mejor límite para el nivel de sTREM-1 utilizando el índice de Youden fue de 343 pg/mL (sensibilidad = 0.61 y especificidad = 0.70).

Resultados 2

- 5 Los resultados de la primera cohorte FAST-MI-2005 se confirmaron con una segunda cohorte FAST-MI-2010. FAST-MI 2010 se creó para realizar una nueva encuesta con criterios y objetivos similares a los del registro de 2005. En esta cohorte, los niveles de sTREM-1 se asociaron con el riesgo de muerte por cualquier causa un año después de un infarto agudo de miocardio.
- 10 Las características de los pacientes según los terciles sTREM-1 se enumeran en la Tabla 4 y la Tabla 5. El intervalo de sTREM-1 es de 112 a 7038, primer tercil <264.552 pg/mL n = 430, tercer tercil >444.287 pg/mL n = 432).
- La probabilidad de muerte por cualquier causa en función del nivel base de sTREM-1 se presenta en la Figura 3. El CR ajustado de muerte durante el seguimiento de 1 año, asociado con un aumento de 1 unidad pg/mL de log (sTREM-1), fue de 3.784 (IC del 95 % 2.440 - 5.869; $p < 0.0001$).
- 15 En comparación con el tercil 1, elegido como referencia, el CR ajustado fue de 2.996 (IC del 95 % 0.631-14.220) y de 9.375 (IC del 95 % 2.147 - 40.936) para el tercil 2 y el tercil 3, respectivamente (p global = 0.0005). La prueba de tendencias de Cochran-Armitage fue significativa ($p < 0.0001$).

Tabla 4

NO. en riesgo					
Días	0	90	180	270	360
Tercil 1 sTREM-1	430	423	423	423	421
Tercil 2 sTREM-1	431	416	414	407	405
Tercil 3 sTREM-1	432	390	379	370	366

Tabla 5

sTREM-1 (pg/mL)	Tercil 1 < 264.552	Tercil 2 [264.552-444.287]	Tercil 3 ≥ 444.287	p†
Factores demográficos y de riesgo				
Sexo masculino, NO. (%)	325 (76 %)	313 (73 %)	312 (72 %)	0.4753
Edad, años ‡	61 ± 12	63 ± 14	69 ± 15	<0.0001
Hipertensión, NO. (%)	196 (46 %)	208 (48 %)	275 (64 %)	<0.0001
Hipercolesterolemia, NO. (%)	187 (44 %)	188 (44 %)	179 (41 %)	0.7676
Diabetes mellitus, NO. (%)	78 (18 %)	73 (17 %)	108 (25 %)	0.0061
Antecedentes familiares de CC, NO. (%)	152 (35 %)	130 (30 %)	71 (16 %)	<0.0001
Fumadores actuales, NO. (%)	138 (32 %)	189 (44 %)	168 (39 %)	0.0017
Infarto de miocardio previo, NO. (%)	50 (12 %)	61 (14 %)	74 (17 %)	0.0695
Ataque fulminante o AIT previos, NO. (%)	14 (3 %)	13 (3 %)	24 (6 %)	0.1066
Insuficiencia cardíaca previa, NO. (%)	4 (1 %)	12 (3 %)	26 (6 %)	0.0001
Insuficiencia respiratoria previa, NO. (%)	14 (3 %)	17 (4 %)	38 (9 %)	0.0004
Insuficiencia renal crónica, NO. (%)	2 (0.5 %)	3 (1 %)	48 (11 %)	<0.0001
Presentación clínica				

Índice de masa corporal (kg/m ²) ‡	27 ± 4	27 ± 5	26 ± 5	0.011
Presión arterial sistólica en el momento del ingreso ‡	148 ± 27	145 ± 28	143 ± 30	0.0153
Frecuencia cardíaca en el momento del ingreso ‡	77 ± 18	78 ± 18	80 ± 22	0.0527
STEMI, NO. (%)	235 (55 %)	238 (55 %)	232 (54 %)	0.9029
Clase Killip entree = 2 o más, NO. (%)	45 (10 %)	50 (12 %)	146 (34 %)	<0.0001
Puntuación GRACE ‡	126 ± 28	133 ± 31	156 ± 39	<0.0001
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo ‡	55 ± 10	53 ± 11	48 ± 12	<0.0001
Exámenes biológicos base				
PCR (mg/L) ‡	9 ± 26	12 ± 25	28 ± 51	<0.0001
sTREM-1 (pg/mL) ‡	173 ± 64	346 ± 50	773 ± 521	<0.0001
Gestión hospitalaria				
ICP, NO. (%)	351 (82 %)	346 (80 %)	310 (72 %)	0.0008
Cirugía de derivación arterial coronaria, NO. (%)	18 (4 %)	11 (3 %)	13 (3 %)	0.3779
Estatinas, NO. (%)	390 (91 %)	400 (93 %)	364 (84 %)	0.0001
Betabloqueantes, NO. (%)	379 (88 %)	359 (83 %)	316 (73 %)	<0.0001
Bloqueantes de los canales de calcio, NO. (%)	98 (23 %)	124 (29 %)	107 (25 %)	0.1216
Inhibidores de la ECA o BRA, NO. (%)	295 (69 %)	298 (69 %)	255 (59 %)	0.002
Derivados nitrados, NO. (%)	215 (50 %)	223 (52 %)	190 (44 %)	0.0571
Aspirina, NO. (%)	420 (98 %)	424 (98 %)	414 (96 %)	0.0593
Clopidogrel, NO. (%)	338 (79 %)	335 (78 %)	340 (79 %)	0.9291
Heparina de bajo peso molecular, NO. (%)	269 (63 %)	262 (61 %)	215 (50 %)	0.0002
Diuréticos, NO. (%)	79 (18 %)	99 (23 %)	183 (42 %)	<0.0001
Inhibidor de la glucoproteína IIb/IIIa, NO. (%)	166 (39 %)	188 (44 %)	120 (28 %)	<0.0001
Glucósidos digitálicos, NO. (%)	2 (0.5 %)	1 (0.2 %)	7 (2 %)	0.0854
‡p se obtiene mediante la prueba del orden con signo de Wilcoxon o la prueba de Kruskal-Wallis (para variables continuas) y la prueba exacta de Pearson χ^2 o de Fisher (para variables categóricas), ‡ media ± d.e. ECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o BRA: bloqueantes de los receptores de angiotensina, ICP: angioplastia coronaria percutánea, IDAC: cirugía de derivación arterial coronaria.				

Resultados 3

5 Nuestro segundo objetivo fue evaluar si un tratamiento podría afectar los niveles plasmáticos de sTREM-1. Se trataron ratones ateroscleróticos (ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas de edad con una dieta rica en grasas) con el péptido LR12, que se dirige al ligando de TREM-1, o con un péptido de control LR12 aleatorizado. Mostramos que los niveles de

sTREM-1 eran elevados después de 4 semanas de tratamiento (311.8 pg/mL) y que el tratamiento con LR12 está relacionado con una disminución de la concentración plasmática de sTREM-1 (189.8 pg/mL) (Figura 4B).

También mostramos en ratones infartados que los niveles de sTREM-1 habían disminuido con el tratamiento con LR12 24 y 72 horas después de un evento isquémico (Figura 4A).

- 5 Dado que la administración de LR12 está relacionada con un mejor resultado después de un evento isquémico cardíaco, así como durante la aterosclerosis (datos no mostrados), estos resultados sugieren que la dosificación de sTREM-1 podría usarse en combinación con un tratamiento para evaluar la evolución de la enfermedad.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar a un individuo en riesgo de desarrollar un evento cardiovascular recurrente o en riesgo de muerte después de un evento cardiovascular, comprendiendo dicho método:
 - 5 - medir el nivel de Receptores Desencadenantes solubles Expresados en células Mieloides 1 (sTREM-1) en una muestra del individuo, y
 - comparar el nivel de sTREM-1 con un valor de referencia, en donde un nivel de sTREM-1 superior al valor de referencia es indicativo de un riesgo de desarrollar un evento cardiovascular recurrente o de un riesgo de muerte después de un evento cardiovascular,

en donde dicho evento cardiovascular es un síndrome coronario agudo.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde el valor de referencia se obtiene a partir del nivel de sTREM-1 en una muestra de control obtenida de uno o más individuos que están sustancialmente sanos.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde la muestra es una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de plasma.
- 15 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho evento cardiovascular es un síndrome coronario agudo seleccionado entre una rotura de placa, infarto de miocardio y angina inestable.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho evento cardiovascular es un infarto de miocardio.
- 20 6. Un método para realizar un seguimiento de la eficacia de una terapia administrada a un individuo que sufre o ha sufrido un evento cardiovascular, comprendiendo dicho método:
 - medir el nivel de Receptores Desencadenantes solubles Expresados en células Mieloides 1 (sTREM-1) en una muestra del individuo, y
 - comparar el nivel de sTREM-1 con un valor de referencia personalizado del individuo,

en donde dicho evento cardiovascular es un síndrome coronario agudo.
- 25 7. El método según la reivindicación 6, en donde la muestra es una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de plasma.
8. El método según la reivindicación 6 o 7, en donde el valor de referencia personalizado del individuo es el nivel de sTREM-1 medido en una muestra obtenida del individuo antes o al comienzo de la terapia.
9. El método según la reivindicación 8, en donde una disminución en el nivel de sTREM-1 medido en una muestra del individuo en comparación con el nivel de sTREM-1 medido en una muestra obtenida del individuo antes de la terapia es indicativa de un efecto positivo de la terapia en el individuo.
- 30 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde dicho evento cardiovascular es un síndrome coronario agudo seleccionado entre una rotura de placa, infarto de miocardio y angina inestable.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde dicho evento cardiovascular es un infarto de miocardio.
- 35 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde la terapia administrada al individuo se basa en la administración de un modulador de la función, actividad o expresión de TREM-1.
13. El método según la reivindicación 12, en donde el modulador de la función, actividad o expresión de TREM-1 es un péptido guiado al ligando de TREM-1.
- 40 14. El método según la reivindicación 13, en donde el péptido guiado al ligando de TREM-1 es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO.: 4.

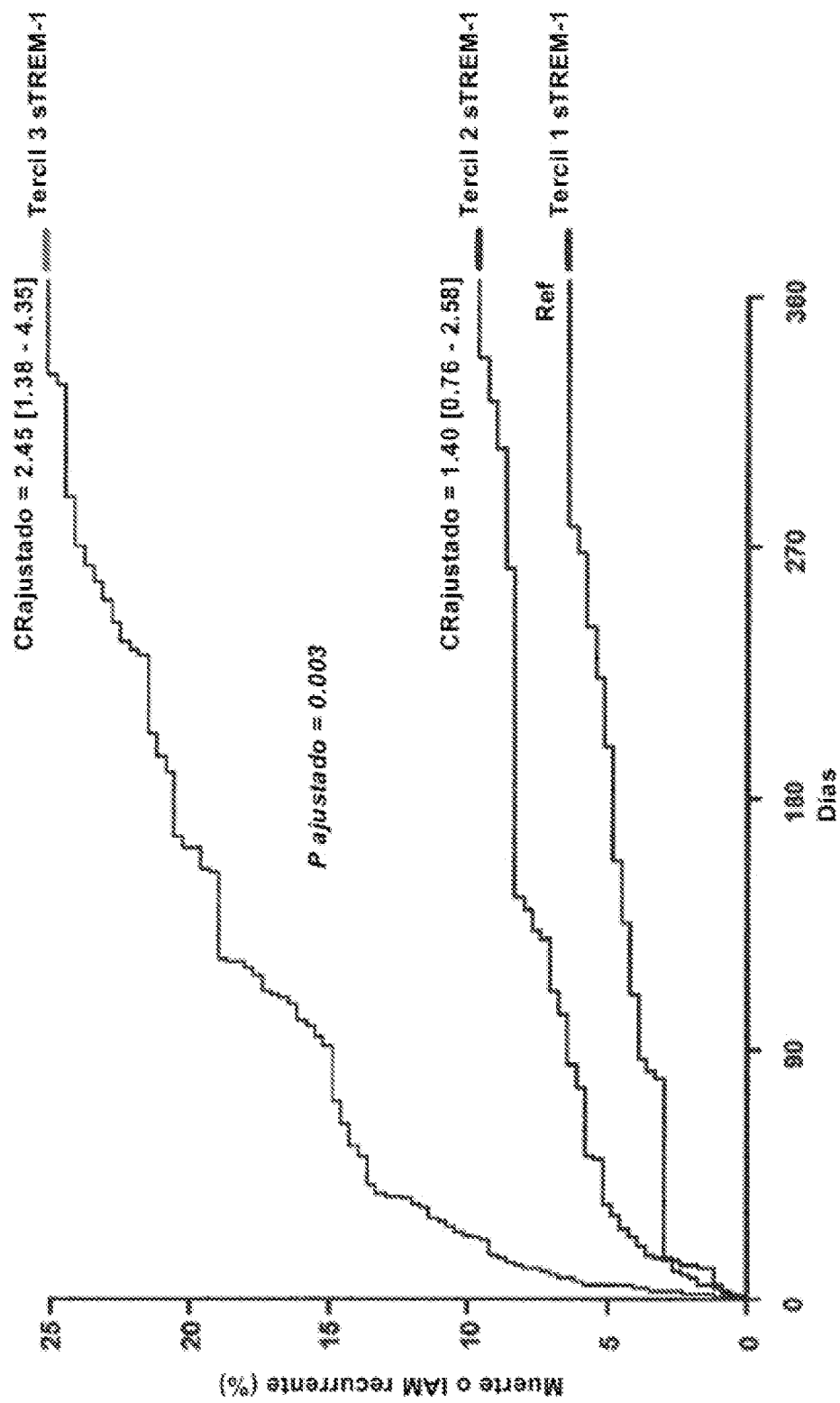


FIG. 1

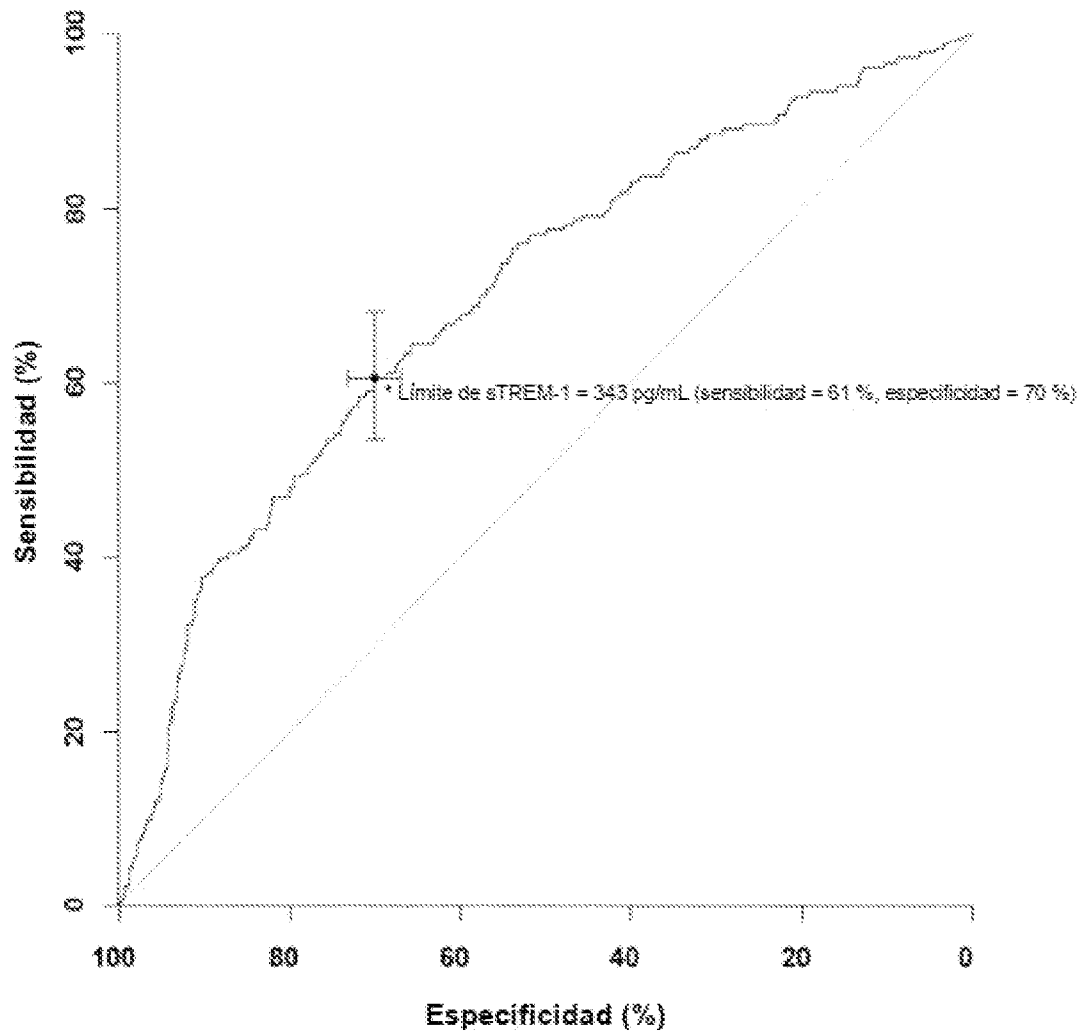


FIG. 2

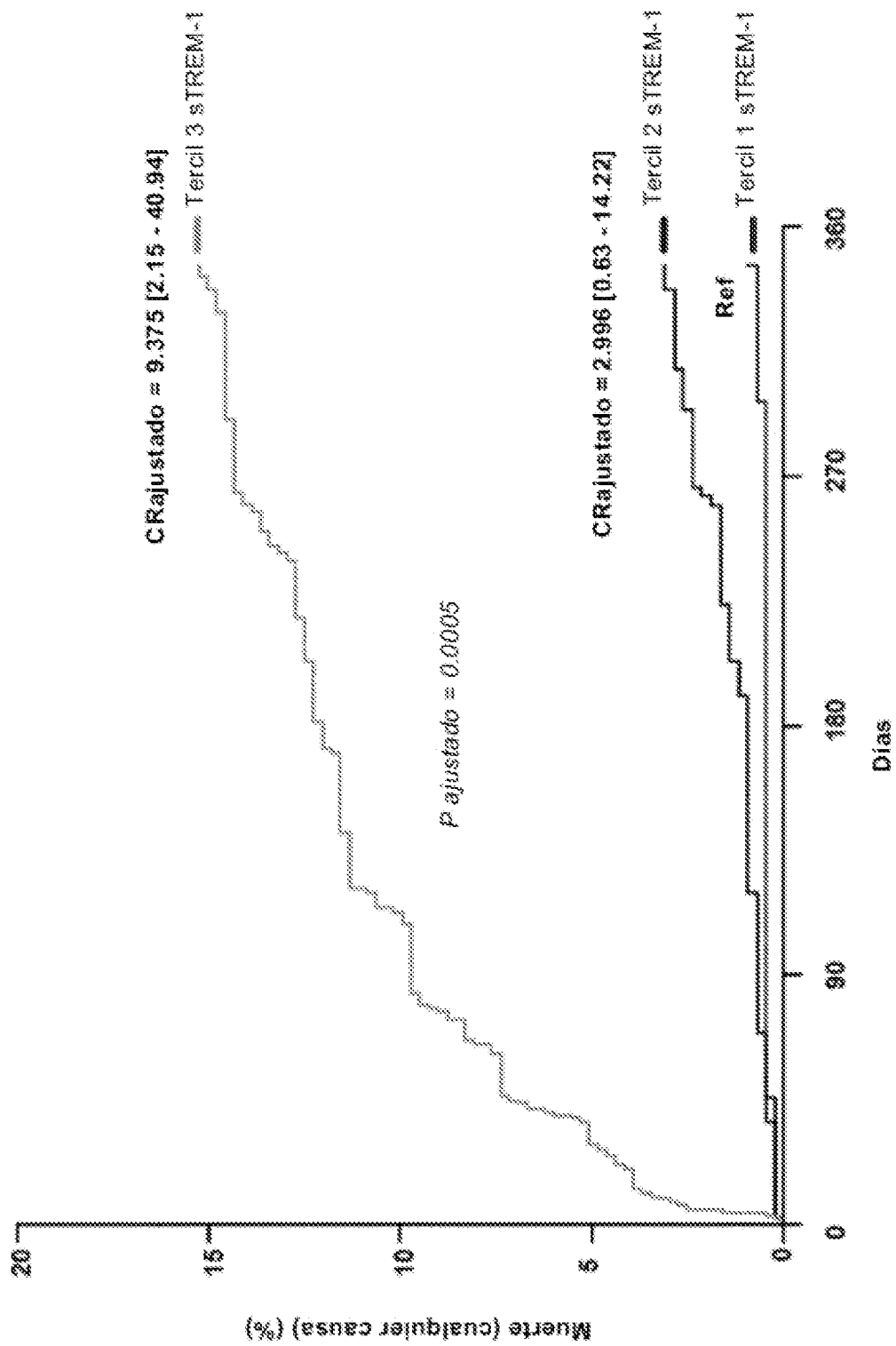


FIG. 3

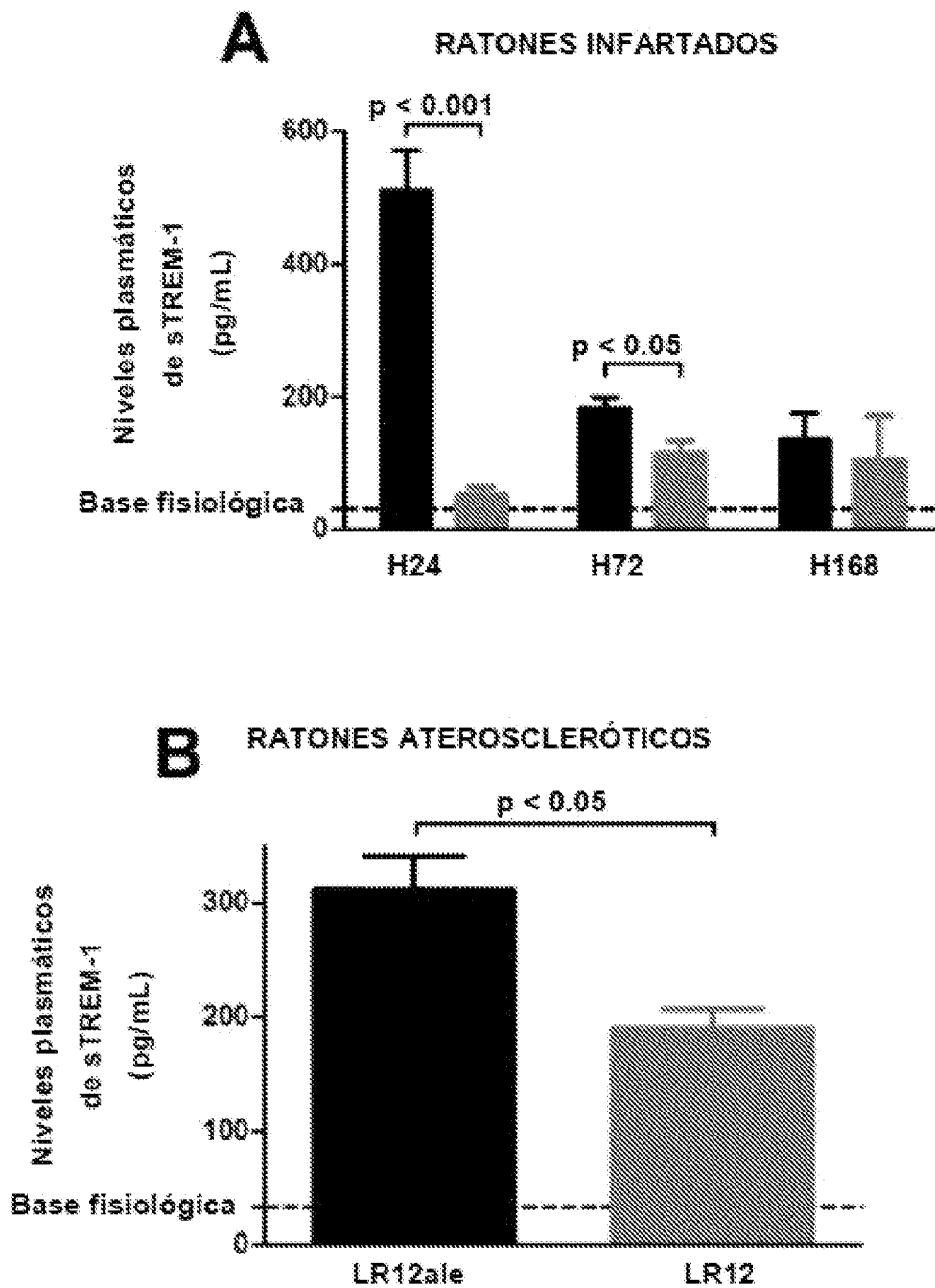
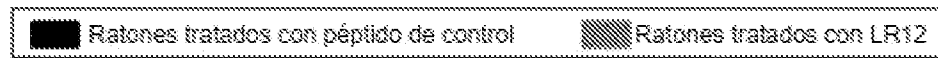


FIG. 4A-B