



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 142**

51 Int. Cl.:
G01N 33/74 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05798099 .7**
96 Fecha de presentación : **25.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1807702**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **PIGF y Fit-1 como parámetros de diagnóstico en enfermedades cardiovasculares.**

30 Prioridad: **25.10.2004 DE 10 2004 051 847**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.12.2009

73 Titular/es:
**Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Gorzhauser Hof Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es: **Zeiber, Andreas, M.;
Heeschen, Christopher y
Dimmeler, Stefanie**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 331 142 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

PIGF y Flt-1 como parámetros de diagnóstico en enfermedades cardiovasculares.

5 La presente invención se refiere a un uso de un procedimiento *ex vivo*, que comprende la determinación de PIGF y sFlt-1 en una muestra, para el diagnóstico, estratificación del riesgo y/o control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para estimar la probabilidad de desarrollar una enfermedad de este tipo. La presente invención también se refiere al procedimiento terminado. Además, la invención se refiere a un kit de diagnóstico y su uso.

10 **Estado de la técnica**

En todos los estadios de una aterosclerosis, es decir, desde el origen de lesiones ateroscleróticas tempranas, pasando por su progresión hasta la erosión o ruptura de las lesiones con las correspondientes complicaciones trombóticas, los procesos inflamatorios desempeñan un papel fundamental. Hallazgos convincentes indican que en la desestabilización de una lesión aterosclerótica con la consecuencia de un síndrome coronario agudo también están involucrados mecanismos inflamatorios (1, 2).

Debido a la relación entre inflamación y aterosclerosis, se hace uso de marcadores de inflamación establecidos que se liberan en la sangre circulante también para la estratificación del riesgo de pacientes con una enfermedad cardíaca coronaria aguda. Contrariamente, por ejemplo, a las troponinas, que representan marcadores de una necrosis celular e indican así el estado final de un infarto de miocardio, los marcadores de inflamación pueden indicar un correspondiente riesgo antes de la aparición de un daño del miocardio, ya que reproducen los procesos inflamatorios que tienen como base un síndrome coronario agudo.

De los marcadores de inflamación establecidos, la proteína reactiva C (CRP, también aquí denominada hsCRP, es decir, "CRP altamente sensible") y el fibrinógeno llama la mayor atención, y el valor pronóstico de estos marcadores respecto de la mortalidad y los episodios isquémicos se comprobó unívocamente (22-24). En investigaciones retrospectivas se mostró que CRP y fibrinógeno tienen un significado propio como parámetros pronósticos y, por ello, se tienen en cuenta como marcadores adicionales a la troponina T (14, 25, 26). Para CRP se indica que este marcador es de utilidad para el pronóstico prolongado en caso de una enfermedad cardíaca coronaria, pero su valor como marcador en la fase aguda, es decir, en el marco de un síndrome coronario agudo, se evalúa de manera contradictoria (14, 27).

Un primer resultado del estudio CAPTURE era que en la fase temprana de 72 horas después de iniciados los síntomas de un síndrome coronario agudo sólo la troponina T permitió un pronóstico confiable, por el contrario, tanto la troponina T como también CRP eran parámetros pronósticos independientes de un riesgo en los siguientes seis meses (14). También se informó de resultados comparables para el estudio GUSTO IV-ACS (27). La fuente precisa de los mayores niveles de CRP en pacientes con enfermedad coronaria inestable sigue no siendo clara. En relación con la suposición de que un daño del miocardio también es un significativo estímulo inflamatorio, se debe reconocer que en un novedoso análisis combinado de FRISC-II y GUSTO-IV se halló un aumento de CRP durante un período de hasta 120 horas sólo en pacientes con mayores niveles de troponina (27). De modo similar, en pacientes con troponina positiva del estudio CAPTURE, los niveles de CRP eran significativamente mayores (14), lo cual indica que un proceso inflamatorio agudo, que se remite a una lesión del miocardio, superpone una inflamación crónica en la pared vascular, de modo que el proceso inflamatorio crónico no se puede estimar por medio de CRP en el marco de un síndrome coronario agudo. Además, se ha de remarcar que las citoquinas proinflamatorias también son liberadas por tejido graso, macrófagos tisulares y el miocardio lesionado.

Recién hace poco tiempo se mostró que el factor de crecimiento placentario (placental growth factor, PIGF), un miembro de la familia de VEGF (vascular endotelial growth factor, VEGF), se expresa marcadamente en lesiones ateroscleróticas tempranas y avanzadas (3). Originariamente identificado en la placenta (4), PIGF estimula el crecimiento de las células de la musculatura lisa, provoca que los macrófagos migren en lesiones ateroscleróticas, estimula la producción de diversos mediadores de la inflamación en macrófagos (factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), proteína quimiotáctica monocítica-1 (MCP-1), proteasas) y estimula la angiogénesis patológica en la pared vascular (3, 5). Una inhibición de los efectos de PIGF por bloqueo de sus receptor Flt-1 que está en la membrana (tirosina quinasa de tipo Fms 1) en un modelo animal de aterosclerosis reprimió el crecimiento de placas ateroscleróticas y mostró efectos favorables sobre su estabilidad, al inhibir la infiltración de macrófagos (3, 6). En pacientes con enfermedades cardíacas coronarias agudas, se mostró hace poco que las concentraciones de PIGF en plasma son elevadas y que la concentración sistémica de PIGF representa un marcador clínico apropiado para una inflamación vascular y las correspondientes consecuencias desventajosas para los pacientes (7).

Flt-1 une, además de PIGF, también el factor afín VEGF (8) y aparece en dos formas: por un lado, como tirosina quinasa receptora unida a membrana (Flt-1), que transmite las señales angiogénicas al interior de las células y, por otro lado, como un ectodominio soluble (Flt-1, sFlt-1 soluble), cuya función consiste en captar los factores libres PIGF o VEGF en la circulación (6). Como a la forma soluble de Flt-1 le falta un dominio citosólico, la función de sFlt-1 está limitada a regular la cantidad de PLGF o VEGF en circulación que están disponibles como factores libres para la activación de los receptores unidos a membrana Flt-1 y Flk-1 (quinasa hepática fetal-1) (9). Durante un síndrome cardíaco coronario agudo, se pueden comprobar mayores concentraciones del receptor de PIGF soluble sFlt-1 (10).

La solicitud de patente WO 2004/046722 (Dimmeler *et al.*) revela un procedimiento para el análisis de muestras en relación con enfermedades cardiovasculares agudas, en donde el procedimiento comprende la medición de la concentración de un marcador, por ejemplo, PIGF, y eventualmente otro marcador, por ejemplo, de VEGF u otro marcador de inflamación.

5

De la solicitud de patente US 2004/126828 (Karumanchi *et al.*), se conoce un procedimiento para el diagnóstico de preeclampsia o eclampsia que comprende la medición de la concentración de sFlt-1, VEGF o PIGF. sFlt1 se ha descrito como un posible candidato para un factor de preeclampsia (17), ya que no sólo la placenta de embarazadas con preeclampsia produce mayores cantidades de sFlt-1, sino mayores niveles de sFlt-1 remite al posterior desarrollo de una preeclampsia (18). En el documento US 2004/126828, se considera una mayor concentración de sFlt-1, en especial niveles séricos > 2.000 ng/l, y una menor concentración de VEGF en este caso como indicadores de diagnóstico positivos de una preeclampsia. Si se vinculan los resultados obtenidos para los tres marcadores entre sí, a fin de determinar un así llamado “índice angiogénico”, se ha de comprobar una preeclampsia existente o un considerable riesgo de desarrollar una preeclampsia cuando el índice angiogénico, determinado según la fórmula [sFlt-1/VEGF + PIGF], es > 20, es decir, cuando la concentración de s-Flt-1 es más de 20 veces la de VEGF y PIGF juntos.

La solicitud de patente WO 2005/031364 (Tadhani y Karumanchi) describe un procedimiento para el diagnóstico o el pronóstico de una gestosis, como, por ejemplo, preeclampsia, que comprende la medición de la globulina que se une a la hormona sexual (SHBG) y PIGF, y en una forma de realización especial, sFlt-1.

20

Puede extraerse de la solicitud de patente WO 2005/017192 (Tadhani *et al.*) que los niveles séricos de PIGF medidos en el caso de una preeclampsia son claramente menores (aproximadamente 6 veces) y los de sFlt-1 eran mayores (aproximadamente 2 veces) que los valores medidos en muestras de control. Conforme a ello, la relación de sFlt-1 a PIGF era en el caso de una preeclampsia de 15 veces el factor determinado para una muestra de control.

25

La solicitud de patente WO 98/28006 divulga un procedimiento para el diagnóstico de hipertensión en el embarazo (preeclampsia), en el que se determina la cantidad de PIGF, VEGF y la de un receptor soluble de VEGF, como, por ejemplo, sFlt-1, en una muestra.

El cuadro clínico de preeclampsia o eclampsia se basa en una etiología completamente diferente que, por ejemplo, la enfermedad cardíaca coronaria, en especial estas gestosis no son el resultado de una enfermedad aterosclerótica. En este sentido, los procedimientos divulgados en el estado de la técnica no son transferibles a enfermedades vasculares con etiología aterosclerótica, como representa, por ejemplo, una enfermedad cardíaca coronaria.

Por ello, a partir del estado de la técnica, era objeto de la invención poner a disposición un procedimiento que permite sobre la base de la medición de biomarcadores una estimación de la probabilidad de un desarrollo, un diagnóstico, una estratificación del riesgo y/o un control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica.

Breve descripción de la invención

40

El objeto de la presente invención se soluciona poniendo a disposición los procedimientos, los usos y los dispositivos según la invención de acuerdo con las reivindicaciones de patente.

Una solución del objeto es un procedimiento para el diagnóstico, estratificación del riesgo y/o control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para estimar la probabilidad de desarrollar una enfermedad de este tipo, en donde el procedimiento comprende las siguientes etapas:

(a) facilitación de una muestra de un paciente que hay que analizar;

(b) cuantificación de PIGF en la muestra;

(c) cuantificación de sFlt-1 en la muestra.

Este procedimiento también puede comprender la siguiente etapa:

55

(d) formación de una relación entre el valor determinado en (b) de PIGF y el valor determinado en (c) de sFlt-1.

La “formación de la relación entre el valor de PIGF determinado en (b) y el valor determinado en (c) de sFlt-1” comprende tanto el cálculo del cociente “valor determinado en (b) de PIGF/ valor determinado en (c)” como también otras posibilidades de relacionar el valor determinado en (b) de PIGF con el valor determinado en (c) de sFlt-1.

Una solución del objeto es también un procedimiento para el diagnóstico, estratificación del riesgo y/o el control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para la estimación de la probabilidad de desarrollar una enfermedad de este tipo, donde el procedimiento comprende las siguientes etapas:

(a) facilitación de una muestra de un paciente que hay que analizar;

ES 2 331 142 T3

(b) cuantificación de PIGF en la muestra;

(c) cuantificación de sFlt-1 en la muestra; y

5 (d) comparación de los valores determinados en (b) y (c) de PIGF y sFlt-1 con un valor de referencia en cada caso y/o un valor determinado en cada caso en una muestra de referencia.

El procedimiento también puede comprender las siguientes etapas:

10

(a) facilitación de una muestra de un paciente que hay que analizar;

(b) cuantificación de PIGF en la muestra;

15

(c) cuantificación de sFlt-1 en la muestra.

(d') formación de una relación entre el valor de PIGF determinado en (b) y el valor de sFlt-1 determinado en (c), con preferencia, el cálculo del cociente PIGF/sFlt-1 y/o del cociente sFlt-1/PIGF; y

20

(e') comparación del valor determinado en (d') con un valor de referencia y/o un valor determinado en una muestra de referencia.

El procedimiento también puede comprender las siguientes etapas:

25

(a) facilitación de una muestra de un paciente que hay que analizar;

(b) cuantificación de PIGF en la muestra;

30

(c) cuantificación de sFlt-1 en la muestra.

(d) comparación de los valores determinados en (b) y (c) de PIGF y sFlt-1 con un valor de referencia en cada caso y/o un valor determinado en cada caso en una muestra de referencia.

35

(d') formación de una relación entre el valor de PIGF determinado en (b) y el valor de sFlt-1 determinado en (c), con preferencia, el cálculo del cociente PIGF/sFlt-1 y/o del cociente sFlt-1/PIGF; y

(e') comparación del valor determinado en (d') con un valor de referencia y/o un valor determinado en una muestra de referencia.

40

Las etapas (b) y (c) se pueden llevar a cabo sucesivamente en este orden, en orden inverso o al mismo tiempo.

En la etapa (d) se compara el valor determinado en (d) con un valor de referencia para PIGF y/o con un valor determinado en una muestra de referencia para PIGF, y el valor determinado en (c) se compara con un valor de referencia para sFlt-1 y/o con un valor determinado en una muestra de referencia para sFlt-1. En la etapa (e') se compara el valor determinado en (d') (en especial del cociente PIGF/sFlt-1 y/o del cociente sFlt-1/PIGF) con un valor de referencia para la relación entre PIGF y sFlt-1 y/o un valor determinado en una muestra de referencia para esta relación.

50

En el caso de la presente invención, se trata de un procedimiento que se realiza *ex vivo*, es decir, se trata de un procedimiento *in vitro*.

La designación "enfermedad vascular con etiología aterosclerótica" excluye la enfermedad preeclampsia o eclampsia. La noción "aterosclerótica" se refiere tanto a una aterosclerosis estable como inestable.

55

La noción "facilitación" de una muestra que hay que analizar, tal como se emplea en la presente, debe equipararse con la "preparación" de una muestra. Con ello se da a entender que se pone a disposición una muestra para estudiar disponible para el procedimiento de la medición, por ejemplo, que se introduce en el instrumento de medición. La muestra objeto de análisis, preferentemente plasma o suero sanguíneo, y/o la muestra de referencia, pueden haber recibido un tratamiento preliminar, por ejemplo, por el hecho de habersele añadido un inhibidor de la coagulación, en especial EDTA, heparina o citrato, a sangre periférica. El concepto "poner a disposición" no abarca la extracción u obtención como tal de las muestras, por ejemplo la extracción invasiva de una muestra de un paciente por pinchado, o una obtención no invasiva de muestras como, por ejemplo, la obtención de una muestra de orina.

65

En una forma de realización preferida de la presente invención, el paciente es un mamífero, de manera especialmente preferida un ser humano. La noción "paciente" designa en especial una persona tratada por un médico o por una persona que forma parte de servicios médicos auxiliares (enfermero), y abarca tanto personas enfermas como sanas o aparentemente sanas.

ES 2 331 142 T3

La “cuantificación” de PIGF y/o sFlt-1 puede consistir en la determinación de una concentración, por ejemplo, una concentración de proteínas. Además de la determinación de una concentración, por ejemplo en plasma sanguíneo o en suero, la cuantificación también puede consistir en la determinación de la cantidad de moléculas, por ejemplo en un corte de tejidos histológicos. La “cuantificación” incluye también métodos de determinación semicuantitativos, que sólo detectan la cantidad o concentración aproximadas de PIGF y/o de sFlt-1 en la muestra, o que sólo pueden servir para una indicación relativa de cantidad o concentración, o que solamente indican que la cantidad o concentración de PIGF y/o de sFlt-1 en la muestra se halla en cada caso por debajo o por arriba de uno o más valores de referencia determinados.

La noción “valor de referencia” puede ser un valor prefijado o un valor determinado en una muestra de referencia. Una “muestra de referencia” puede provenir de personas sanas o de pacientes con o sin aterosclerosis estable o inestable con angina de pecho inestable o con un infarto agudo de miocardio. También puede tratarse de una muestra a la que se añadieron PIGF y sFlt-1 en una relación que se había medido anteriormente en personas sanas o en pacientes con una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica. Usualmente se emplean diversas muestras de referencia que indican los diversos pronósticos posibles, por ejemplo, desde “un episodio desfavorable es improbable” hasta “un episodio desfavorable es muy probable”. La facilitación de muestras de referencia tiene lugar preferentemente de la misma manera que la facilitación de la muestra que hay que analizar. En lugar de usar muestras de referencia, también pueden emplearse valores de referencia establecidos, que pueden tomarse, por ejemplo, de una tabla. Los valores de referencia de este tipo pueden establecer, por ejemplo, diversas regiones o entornos que indiquen la probabilidad de un episodio.

Es preferible que un valor de referencia y/o un valor determinado en una muestra de referencia sean un “valor de corte” o “valor límite”, es decir, un valor que indica un límite. Si se compara un valor determinado en una muestra con un valor de corte resulta que un valor de medición arriba del límite conduce a una evaluación distinta que para un valor de medición debajo del límite. En lo que a la presente invención se refiere, debería considerarse, por ejemplo, la concentración de PIGF como un valor de corte de PIGF adecuado, que separa ambos terciles superiores de un colectivo de referencia adecuado, con respecto al tercio inferior. Otro valor de corte adecuado para el PIGF es la concentración de PIGF que separa el tercio superior de un colectivo de referencia adecuado, con respecto al tercio medio. Un valor de corte adecuado para el sFlt-1 es, por ejemplo, la concentración de sFlt-1 que separa el tercio medio de un colectivo de referencia adecuado, con respecto al tercio inferior. Además de la determinación del correspondiente valor de corte por medio de terciles, es también posible determinar valores de corte adecuados para la invención mediante curvas ROC (receiver operating curve) y otros métodos usuales (ver entre otros, “A. PACIENTES Y MÉTODOS, 4. Procedimientos estadísticos”). Por consiguiente, una concentración mediana de PIGF o de sFlt-1 determinada en base a un colectivo de referencia adecuado puede servir de valor de corte adecuado para el PIGF o para el sFlt-1. En lo que a la presente invención se refiere, el paso por arriba de un valor de corte adecuado para el PIGF y el paso simultáneo por debajo de un valor de corte adecuado para el sFlt-1 indicarían que existe una elevada probabilidad de que el paciente del caso sufra un infarto de miocardio o un ataque de apoplejía y/o que muera de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica.

Un procedimiento según la invención particularmente ventajoso es el uso de un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

(a) facilitación de una muestra de un paciente que hay que analizar;

(b) cuantificación de PIGF en la muestra;

(c) cuantificación de sFlt-1 en la muestra,

(d) comparación de los valores determinados en (b) y (c) de PIGF y sFlt-1 con un valor de referencia en cada caso y/o un valor determinado en cada caso en una muestra de referencia

para el diagnóstico, estratificación del riesgo y/o control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica en un paciente y/o para estimar la probabilidad para un paciente de desarrollar una enfermedad de este tipo.

El uso del procedimiento también puede comprender las siguientes etapas:

(a) facilitación de una muestra de un paciente que hay que analizar;

(b) cuantificación de PIGF en la muestra;

(c) cuantificación de sFlt-1 en la muestra.

(d') formación de una relación entre el valor de PIGF determinado en (b) y el valor de sFlt-1 determinado en (c), con preferencia, el cálculo del cociente PIGF/sFlt-1 y/o del cociente sFlt-1/PIGF; y

(e') comparación del valor determinado en (d') con un valor de referencia y/o un valor determinado en una muestra de referencia.

ES 2 331 142 T3

El uso del procedimiento también puede comprender las siguientes etapas:

(a) facilitación de una muestra de un paciente que hay que analizar;

5 (b) cuantificación de PIGF en la muestra;

(c) cuantificación de sFlt-1 en la muestra.

10 (d) comparación de los valores determinados en (b) y (c) de PIGF y sFlt-1 con un valor de referencia en cada caso y/o un valor determinado en cada caso en una muestra de referencia.

(d') formación de una relación entre el valor de PIGF determinado en (b) y el valor determinado en (c) de sFlt-1, con preferencia, el cálculo del cociente PIGF/sFlt- y/o del cociente sFlt-1/PIGF; y

15 (e') comparación del valor determinado en (d') con un valor de referencia y/o un valor determinado en una muestra de referencia.

Las etapas (b) y (c) se pueden llevar a cabo sucesivamente en este orden, en orden inverso o al mismo tiempo.

20 El objetivo de la invención se logra, además, mediante un kit de diagnóstico, que abarca al menos un agente para la cuantificación de PIGF y al menos un agente para la cuantificación de sFlt-1 en una muestra que hay que analizar, pudiendo el kit también consistir en paquetes separados y el kit además comprende un medio para la información (por ejemplo, documentos adjuntos a los paquetes), según lo cual: (i) una relación de [PIGF = alto : sFlt-1 = bajo] y/o (ii) una concentración de PIGF, que está en los dos tercios superiores de un colectivo de referencia, y una concentración de sFlt-1, que está en el tercio más inferior del colectivo de referencia, y/o (iii) un valor de PIGF por encima del valor de referencia para el PIGF y un valor de sFlt-1 por debajo del valor de referencia para el sFlt-1 indica por ejemplo un elevada probabilidad que suceda episodio desfavorable tal como, por ejemplo, muerte, infarto de miocardio no mortal y/o ataque apopléjico.

30 El objetivo de la presente invención también se logra mediante un uso de kit conforme a la invención para el diagnóstico, estratificación del riesgo y/o control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para estimar la probabilidad de desarrollar una enfermedad de este tipo.

35 El objetivo de la presente invención también se logra mediante un uso del kit conforme a la invención para la realización del procedimiento conforme a la invención.

40 A continuación, se completa la breve exposición con explicaciones detalladas y con otras formas de realización de la invención.

45 En una forma de realización del procedimiento y del uso del procedimiento, la enfermedad vascular se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad vascular relacionada con los órganos (en especial una enfermedad cardíaca coronaria o una enfermedad cerebrovascular) y/o una enfermedad vascular periférica (en especial una enfermedad arterial o venosa oclusiva). En otra forma de realización, la enfermedad vascular es un síndrome coronario agudo, con preferencia, una angina de pecho inestable o un infarto agudo de miocardio. En una forma de realización preferida del procedimiento, la enfermedad cardíaca coronaria es un síndrome coronario agudo. En una forma de realización preferida del procedimiento, se emplean solamente muestras de pacientes que sufren de una enfermedad vascular, como se indica arriba con más detenimiento, en especial de un síndrome coronario agudo (por ejemplo, de un infarto de miocardio) o de los cuales se sospecha que tienen una enfermedad de este tipo o que la desarrollarán en el futuro. Sin embargo, la muestra también puede provenir de pacientes elegidos "aleatoriamente", por ejemplo dentro de los alcances de un estudio y selección entre varias personas o de una investigación de prevención. El procedimiento conforme a la invención se emplea preferentemente en un caso de síndrome coronario agudo, como, por ejemplo, angina de pecho y/o infarto agudo de miocardio.

55 En el caso de la muestra por investigar, se trata preferentemente de sangre periférica o de una fracción de ella; se prefiere muy especialmente que la fracción sea plasma sanguíneo o suero sanguíneo. En otra forma de realización de la invención, también se emplean otros líquidos corporales (por ejemplo, orina o líquido cefalorraquídeo), así como muestras de tejidos, suspensiones de células de tejidos, tejidos homogeneizados o cortes histológicos, en calidad de muestra que hay que analizar. Dentro de los alcances de la invención, el término "muestra" se refiere a un material del que se supone que contiene las sustancias PIGF y sFlt-1 que deben detectarse. Es eventualmente posible someter las muestras a un tratamiento preliminar, para que las sustancias por detectar sean accesibles o para remover los componentes de la muestra que podrían interferir. Un tratamiento de este tipo puede incluir la separación o lisis de células, la precipitación, la hidrólisis o la desnaturalización de determinados componentes de la muestra, tales como, por ejemplo, proteínas, la centrifugación de muestras, el tratamiento de las muestras con solventes orgánicos, tales como, por ejemplo, con alcoholes, en especial metanol, o el tratamiento de las muestras con detergentes.

65 En una forma de realización preferida de la presente invención, el paciente es mamífero, y con preferencia muy especial, un ser humano con una enfermedad vascular, como se describió mejor con anterioridad, con preferencia,

con un síndrome coronario agudo tal como, por ejemplo, un infarto de miocardio. En una forma de realización muy especial del procedimiento conforme a la invención, se miden solamente muestras de pacientes en las que puede excluirse la existencia de un embarazo o por lo menos excluirse con una probabilidad predominante.

5 En una forma de realización preferida, se emplea el procedimiento conforme a la invención para la estratificación del riesgo de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica, o el procedimiento abarca la realización de una estratificación del riesgo. La estratificación del riesgo abarca la determinación de una probabilidad de que un paciente sufra un episodio desfavorable, tales como, por ejemplo, muerte, infarto de miocardio no mortal o ataque apopléjico. El episodio desfavorable también puede ser un episodio secundario desfavorable, consistente por ejemplo en sufrir
10 otro infarto de miocardio no mortal, o después de un primer infarto de miocardio no mortal, experimentar un ataque apopléjico o fallecer.

Los procedimientos conformes a la invención muestran: (i) para un valor de PIGF por encima del valor de referencia de PIGF y un valor de sFlt-1 por debajo del valor de referencia de sFlt-1, y/o: (ii) para una concentración de PIGF,
15 que está en los dos tercios superiores de un colectivo de referencia, y para una concentración de sFlt-1 que está en el tercio inferior del colectivo de referencia, y/o: (iii) para una relación de [PIGF = alto : sFlt-1 = bajo], una elevada probabilidad de un episodio desventajoso.

La noción “colectivo de referencia” designa por lo general un grupo de individuos de referencia, que con preferencia se seleccionaron aleatoriamente entre la totalidad de una población, y que satisfacen determinados criterios de selección. Por motivos prácticos, es frecuente que en lugar de una selección puramente aleatoria de individuos tomados de un conjunto de una población, o de un colectivo global, se elabore un colectivo de referencia en base a consideraciones prácticas a partir de los individuos disponibles. Entre los criterios de selección definidos lo más claramente posible, se encuentran por ejemplo enfermedades definidas y típicas, por ejemplo una angina de pecho inestable, un infarto agudo de miocardio, etc. Además, también tienen relevancia los universos de referencia de individuos sanos, para
25 determinar valores de referencia basados en la población, para el colectivo correspondiente. El colectivo de referencia preferido para los fines de la presente invención consiste en una cantidad suficientemente grande para fines estadísticos, de individuos que sufren de una enfermedad vascular de etiología aterosclerótica, en especial de un síndrome coronario agudo como, por ejemplo, una angina de pecho inestable o un infarto agudo de miocardio. Los universos de referencia también pueden reclutarse entre pacientes que presentan un índice de episodios acrecentada o disminuida.
30

Además de los valores de referencia, que se basan en un colectivo de referencia, también pueden intervenir “valores de referencia basados en sujetos”. Los valores de referencia basados en sujetos son valores ya disponibles (por ejemplo, la concentración de un biomarcador como el PIGF o el sFlt-1) de un único individuo, que se determinaron en un momento en que el individuo se halla en un estado de salud o de enfermedad definido.
35

En una forma de realización preferida del procedimiento conforme a la invención, como valor de referencia se usa un valor de corte para el PIGF, $\geq 17,7$ ng/l. En otra forma de realización preferida del procedimiento conforme a la invención, como valor de referencia se usa un valor de corte para el PIGF, $\geq 23,3$ ng/l. También puede emplearse
40 un valor de corte para el PIGF, $\geq 15,6$ ng/l. Se prefiere un corte para el PIGF en el intervalo 15,6-23,3 ng/l, con especial preferencia, en el intervalo de 10-50 ng/l, con preferencia muy especial, en el intervalo de 5-100 ng/l y más preferentemente aún, en el intervalo de 1-500 ng/l.

En una forma de realización preferida del procedimiento conforme a la invención, como valor de referencia se usa un valor de corte para el sFlt-1, $\leq 37,4$ ng/l. En otra forma de realización preferida del procedimiento conforme a la invención, como valor de referencia se usa un valor de corte para el sFlt-1, $\leq 56,5$ ng/l. Se emplea preferentemente un valor de corte para el sFlt-1, en el intervalo de 37,4-56,5 ng/l, con preferencia especial, en el intervalo de 25-100 ng/l, con preferencia muy especial, en el intervalo de 1-250 ng/l y más preferentemente aún, en el intervalo de 5-500 ng/l.
45

En una forma de realización preferida especial del procedimiento conforme a la invención, una concentración de PIGF $> 17,7$ ng/l significa una concentración elevada de PIGF, y una concentración de PIGF $< 17,7$ ng/l significa una concentración baja de PIGF. En una forma de realización alternativa especialmente preferida del procedimiento conforme a la invención, una concentración de PIGF $> 23,3$ ng/l significa una concentración elevada de PIGF, 15,6-23,3 ng/l representa una concentración media de PIGF, y una concentración $< 15,6$ ng/l representa una concentración
50 baja de PIGF.
55

En una configuración especialmente preferida del procedimiento conforme a la invención, una concentración de sFlt-1 $> 56,5$ ng/l representa una concentración elevada de sFlt-1, y una concentración $< 56,6$ ng/l representa una concentración baja de sFlt-1. En una forma de realización alternativa especialmente preferida del procedimiento conforme a la invención, una concentración de sFlt-1 $> 91,4$ ng/l representa una concentración elevada de sFlt-1, una concentración de 37,4-91,4 representa una concentración media de sFlt-1, y una concentración $< 37,4$ ng/l representa una concentración baja de sFlt-1.
60

La formación de una “relación” entre PIGF y sFlt-1 puede tener lugar mediante el cálculo de un coeficiente de PIGF/sFlt-1. Como alternativa, también es posible formar un cociente de sFlt-1/PIGF. Es preferible que un cociente $\geq 0,31$, que parta de una relación [PIGF $> 17,7$ ng/l: sFlt-1 $< 56,6$ ng/l], represente un alto riesgo de un episodio desfavorable.
65

ES 2 331 142 T3

Se prefiere especialmente un cociente de $\geq 0,42$, [PIGF > 15,6 ng/l: sFlt-1 < 37,4 ng/l] como indicador de un elevado riesgo de un episodio desfavorable. De una manera muy especialmente preferida, un cociente de $\geq 0,62$, [PIGF > 23,3 ng/l: sFlt-1 < 37,4 ng/l] es un indicador de un riesgo elevado de un episodio desfavorable. La formación de una relación también puede significar que los valores de PIGF y sFlt-1 se correlacionan entre sí, por ejemplo mediante una comparación simple.

En una forma de realización, el procedimiento según la invención comprende una cuantificación de al menos otro biomarcador. En una forma de realización preferida, el otro biomarcador está seleccionado del grupo compuesto por VEGF, sCD40L, PAPP-A (pregnancy associated plasmaprotein-A), MPO (mieloperoxidasa), cistatina C, mioglobina, creatina-quinasa, en especial creatina-quinasa MB (CK-MB, troponina, en especial troponina I, troponina, T y/o sus complejos, CRP, péptidos natriuréticos, tales como, por ejemplo, ANP (atrial natriuretic peptide), BNP (B-type natriuretic peptide) o NT-proBNP. Otros biomarcadores son también hematopoyetina, como, por ejemplo, EPO (eritropoyetina), GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), LIF (leukemia inhibition factor), oncostatina, CNTF (ciliary neurotrophic factor), mioglobina, Lp-PLA₂ (lipoprotein associated phospholipase A₂), IMA (Ischemia modified albumin), albúmina cisteinilada, GP-BB (Glycogen phosphorilase isoenzym BB), H-FABP (heartype fatty-acid-binding protein), colina, PPARs (peroxisome proliferator activator receptors), ADMA (asymmetric dymethylarginine), SAA (serum amiloid A protein), fibrinógeno, FFAs (unbound free fatty acids), dímero D, homocisteína, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1), P-selectina, E-selectina soluble, hemoglobina A1c, urodilatina, tromboxano (por ejemplo, tromboxano A₂ y 11-deshidro-tromboxano B₂), isozimas de adenilato quinasa mitocondriales, proMBP (Eosinophil Major Basic Protein), OPG (osteoprotegerina), leptina, adiponectina, FSAP (factor seven activating protease; en especial su así llamada mutante de Marburg I), IL-6 (interleuquina-6), MIF (macrophage migration inhibition factor), CALCR (receptor de calcitonina), glicoforina (en especial glicoforina truncada), hormona del crecimiento, prolactina e interleuquina, quimioquina como, por ejemplo, factor plaquetario 4, PBP (platelet basic protein), MIF (macrophage inflammatory protein), interferonas, TNF (factor de necrosis tumoral), moléculas de adhesión como, por ejemplo, ICAM (intracellular adhesion molecule) o VCAM (vascular adhesion molecule), citoquinas y otros factores de crecimiento tales como, por ejemplo, FGF (fibroblast growth factor). El término “biomarcador” designa sustancias endógenas, por ejemplo, proteínas que indican, por ejemplo, la presencia de un episodio fisiopatológico en un organismo.

En una forma de realización, el control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica consiste en supervisar un paciente que es tratado con uno o varios agentes terapéuticos, que reducen el riesgo de un trastorno vascular, con preferencia, un trastorno cardiovascular.

En otra forma de realización, el procedimiento según la invención se usa para identificar un paciente que saca provecho probablemente del tratamiento con uno o varios agentes terapéuticos, que reducen el riesgo de un trastorno vascular, con preferencia, un trastorno cardiovascular. El “provecho” puede consistir en reducir el riesgo de padecer un episodio desventajoso como, por ejemplo, muerte, infarto de miocardio no mortal o ataque apopléjico. Además, el provecho se puede optimizar por medio de una selección específica de pacientes en alto riesgo por medio de un tratamiento dirigido individualmente.

Los agentes de reducir el riesgo de un trastorno vascular, con preferencia, un trastorno cardiovascular incluyen aquellos que están seleccionados del grupo compuesto por sFlt-1, agentes antiinflamatorios, agentes antitrombóticos, agentes antiplaquetarios, agentes fibrinolíticos, agentes reductores de lípidos, inhibidores directos de trombina e inhibidores del receptor de glucoproteína IIb/IIIa. En una forma de realización preferida, el agente deriva de sFlt-1 o sFlt-1. A modo de ejemplo, se puede tratar de sFlt-1 recombinante, un fragmento o uno de sus derivados.

Los agentes antiinflamatorios incluyen alclofenac, dipropionato de alclometasona, acetono de algestona, alfa-amilasa, amcinafal, amcinafida, anfenac sodio, clorhidrato de amiprilosa, anakinra, anirolac, anitrazafeno, apazona, balsalazida disodio; bendazac, benoxaprofeno, clorhidrato de bencidamina, bromelaína, broperamol, budesonida, carprofeno, cicloprofeno, cintazona, cliprofeno, propionato de clobetasol, butirato de clobetasona, clopirac, propionato de cloticasona, acetato de cormetasona, cortodoxona, deflazacort, desonida, desoximetasona, dipropionato de dexametasona, diclofenac potasio, diclofenac sodio, diacetato de diflorasona, diflumidona sodio, diflunisal, difluprednato, diftalona, dimetilsulfóxido, drocinonida, endrisona, enlimomab, enolicam sodio, epirizol, etodolac, etofenamato, felbinac, fenamol, fenbufeno, fenclofenac, fenclorac, fendosal, fempipalona, fentiazac, flazalona, fluazacort, ácido flufenámico, flumizol, acetato de flunisolida, flunixina, meglumina de flunixina, fluocortina-butilo, acetato de fluormetolona, fluquazona, flurbiprofeno, fluretofeno, propionato de fluticasona, furaprofeno, furobufeno, halcinonida, propionato de halobetasol, acetato de halopredona, ibufenac, ibuprofeno, ibuprofeno aluminio, ibuprofeno-piconol, ilonidap, indometacina, indometacina sodio, indoprofeno, indoxol, intrazol, acetato de isoflupredona, isoxepac, isoxicam, cetoprofeno, clorhidrato de lofemizol, lomoxicam, etabonato de loteprednol, meclofenamato sodio, ácido meclofenámico, dibutirato de meclorisona, ácido mefenámico, mesalamina, meseclazona, suleptanato de metilprednisolona; morniflumato, nabumetona, naproxeno, naproxeno sodio, naproxol, nimazona, olsalazina sodio, orgoteína, orpanoxina, oxaprozina, oxifenbutazo, clorhidrato de paranilina, polisulfato de pentosano sodio, glicerato sódico de fenbutazona, pifrenidona, piroxicam, cinnamato de piroxicam, piroxicam-olamina, pirprofeno, prednazato, prifelona, ácido prodólico, proquazona, proxazol, citrato de proxazol, rimexolona, romazarita, salcolex, salnacedina, salsalato, salicilato, cloruro de sanguinario, seclazona, sermetacina, sudoxicam, sulindac, suprofeno, talmetacina, talniflumato, talosalato, tebufelona, tenidap, tenidap sodio, tenoxicam, tesicam, tesimida, tetricidamina, tiopinac, pivalato de tixocortol, tolmetina, tolmetina sodio, triclónida, triflumidato, zidometacina, glucocorticoides y zomepirac sodio.

ES 2 331 142 T3

Los agentes de acción antitrombótica y/o fibrinolítica incluyen plasminógeno (respecto de plasmina por acción de precalicreína, quininógenos, factor XII, factor XIIIa, proactivador de plasminógeno y activador de plasminógeno tisular [TPA]), estreptoquinasa, uroquinasa, complejo de activador de plasminógeno-estreptoquinasa anisoiado, pro-uroquinasa (Pro-UK); rTPA (alteplasa o activasa; r = recombinante); rPro-UK; abboquinasa; eminasas; clorhidrato de esreptasa anagrelida, bivalirudina, dalteparina sodio, danaparoides sodio, clorhidrato de dazoxibeno, sulfato de efegatrano, enoxaparina sodio, ifetrobano, ifetrobano sodio, tinzaparina sodio, retaplasa, trifenagrel, warfarina y dextranos.

Los agentes antiplaquetarios incluyen clopidogrel, sulfpirazona, aspirina, dipiridamol, clofibrato, carbamato de piridinol, PGE, glucagón, agentes antiserotonina, cafeína, teofilina-pentoxifilina, ticlopidina y anagrelida.

Los agentes reductores de lípidos incluyen gemfibrozilo, colistiramina, colestipol, ácido nicotínico, probucol-lovastatina, fluvastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina y cirivastatina.

Los inhibidores directos de trombina incluyen hirudina, hirugeno, hirulog, agatrobano, PPACK, aptámeros de trombina.

Los inhibidores del receptor de glucoproteína IIb/IIIa son tanto anticuerpos como también no anticuerpos e incluyen ReoPro® (abciximab), lamifibano y tirofibanos, sin estar limitados a ellos.

La detección de PIGF y/o de sFlt-1 puede realizarse mediante procedimientos inmunológicos, por ejemplo ELISA, en la que también se halla incluida una detección de fragmentos de PIGF y/o de sFlt-1, así como de isoformas de PIGF y/o de sFlt-1. Como alternativa, es por ejemplo posible detectar el ARNm del PIGF y/o del sFlt-1. Además del ELISA mencionado arriba, es también posible aplicar otros procedimientos inmunológicos para la cuantificación del PIGF y/o del sFlt-1, conforme a la invención. Son especialmente adecuados los inmunoensayos en sándwich heterogéneos u homogéneos, pero también es posible emplear inmunoensayos competitivos. Usualmente, para tales procedimientos de ensayo se emplean anticuerpos monoclonales o policlonales como pares de enlace específicos, pero en lugar de anticuerpos también pueden emplearse otras sustancias (por ejemplo, aptámeros) que tienen la capacidad de ligarse específicamente al PIGF o al sFlt-1. Bajo la noción "anticuerpo" cabe entender no solamente anticuerpos completos sino también expresamente partes, derivados u homólogos de anticuerpos, como por ejemplo fragmentos de anticuerpos, preferiblemente Fab, Fv, F(ab')₂, Fab', anticuerpos quiméricos, humanizados, bi- u oligoespecíficos, o monocatenarios, y también agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas.

Los anticuerpos u otros pares de enlace específicos para PIGF o sFlt-1 empleados en los inmunoensayos pueden estar ligados a un portador consistente en material poroso y/o no poroso, por lo general insoluble en agua, y que puede presentar las formas más diversas posibles. El portador puede ser parte componente de un dispositivo tal como un recipiente, un tubo, una placa de microtitulación, varilla o tira, así como papel filtro o de cromatografía.

Los anticuerpos u otros compañeros de enlace específicos para PIGF o sFlt-1 pueden estar unidos a un medio de detección ("etiqueta"), que de por sí produce una señal o que puede inducir la producción de una señal, tales como, por ejemplo, una sustancia fluorescente, una sustancia radioactiva, una enzima, una micropartícula (por ejemplo, una partícula de látex no teñida, teñida o marcada de alguna otra manera, una partícula de oro, etc.), o una sustancia quimioluminiscente o que sirve como intermediario (por ejemplo, etiqueta de biotina) para un sistema de detección (por ejemplo, un complejo avidina-peroxidasa).

Dentro de los alcances de la invención, es particularmente ventajoso el uso de procedimientos de ensayo que permiten la cuantificación del PIGF y del sFlt-1 en un preparado de ensayo. Esto puede efectuarse por ejemplo añadiendo a la muestra compañeros de enlace específicos para PIGF y sFlt-1, que están ligados a diversos agentes de detección (por ejemplo, sustancias que son fluorescentes bajo diversas longitudes de onda), por lo que después de terminada la reacción inmunoquímica es posible medir por separado las señales de medición resultantes. Una forma de realización muy especialmente ventajosa de un procedimiento de ensayo de este tipo se basa en la medición, espacialmente separada, de las señales de medición que correlacionan el PIGF y el sFlt-1, por ejemplo mediante un elemento de ensayo inmunocromatográfico, como se usa en principios para la detección de drogas y de hormonas relacionadas con el embarazo.

En una forma del procedimiento conforme a la invención, para la cuantificación del PIGF y de sFlt-1, las muestras, y suponiendo que no estén ya disponibles en el elemento de ensayo, preferentemente en forma seca, los anticuerpos anti-PIGF y anticuerpos anti-sFlt-1, asociados con un agente de detección, se aplican sobre la zona de aplicación del elemento de ensayo. Son marcadores especialmente adecuados, por ejemplo, las partículas de látex coloreadas, oro coloidal, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias radiactivas o sustancias quimioluminiscentes. Suponiendo que haya PIGF y/o sFlt-1 contenidos en la muestra, se ligarán complejos PIGF/anticuerpos y/o complejos sFlt-1/anticuerpos. Estos complejos y moléculas de PIGF o de sFlt-1 libres todavía presentes, se mueven por ejemplo por fuerza capilar, en la dirección de una región (zona de detección) del elemento de prueba, en la que los otros anticuerpos anti-PIGF y anticuerpos anti-sFlt-1, espacialmente separados entre sí, están fijados en forma de dos cintas, o llegan a fijarse en el transcurso del procedimiento de ensayo (por ejemplo, por medio de un puente de biotina-avidina). Si en la muestra había PIGF y/o sFlt-1 presentes, en dicha zona de detección se formarán complejos sándwich de PIGF/anticuerpos, marcados, y/o complejos sándwich sFlt-1/anticuerpos, marcados. La intensidad de la correspondiente señal en la zona de detección es proporcional a la concentración de PIGF o de sFlt-1 en la muestra. Si bien se prefiere muy especialmente el procedimiento de inmunoensayo sándwich arriba descrito, también es posible un

ES 2 331 142 T3

procedimiento de ensayo competitivo para la cuantificación del PIGF y del sFlt-1 en base a estos elementos de ensayo. Como ya se mencionó con anterioridad, en lugar de uno o varios anticuerpos podrían emplearse otras sustancias que tienen la capacidad de ligarse específicamente al PIGF o al sFlt-1.

5 Otro objeto de esta invención es por ello también un elemento de ensayo, por ejemplo un elemento de ensayo inmunocromático, que abarca una zona para la aplicación de la muestra, pudiendo tratarse de, por ejemplo, un papel filtro o de otro medio cromatográfico, sobre el que es posible aplicar la muestra, y suponiendo que aún no se hallen presentes en el elemento de ensayo, preferentemente secos, los anticuerpos anti-PIGF y los anticuerpos anti-sFlt, marcados, y estando la zona de aplicación de la muestra en contacto con la zona de detección, de manera tal que un fluido aplicado sobre la zona para la aplicación de la muestra pueda llegar a la zona de detección, por ejemplo gracias a fuerza capilar, y la zona de detección abarca regiones especialmente separadas para la unión específica de PIGF y sFlt-1, por lo que allí las moléculas de PIGF o de sFlt-1 eventualmente presentes en el líquido pueden ligarse. Además, el elemento de ensayo también puede abarcar una zona de absorción preferentemente consistente en un material muy absorbente (por ejemplo papel filtro), en el que se transportan los componentes no ligados de la corriente del líquido.

10 En otra forma de realización de este elemento de ensayo conforme a la invención, éste presenta otros agentes que permiten una asociación de la intensidad de las señales con respecto a la concentración del PIGF o del sFlt-1, en especial en el campo de decisiones clínico (preferentemente en el intervalo de corte). En una forma de realización alternativa de este elemento de ensayo conforme a la invención, se hace uso de un inmunoensayo competitivo en lugar del inmunoensayo sándwich. En una forma de realización de la invención, se usa el elemento de ensayo para realizar el procedimiento conforme a la invención. En otra forma de realización de la invención, se usa el elemento de ensayo para el diagnóstico, estratificación de los riesgos y/o supervisión de una enfermedad vascular de etiología aterosclerótica en un paciente y/o para la evaluación de la probabilidad de que un paciente desarrolle una enfermedad de este tipo. En lugar de uno o más anticuerpos también podrían emplearse, como mencionado arriba, otras sustancias que tiene la capacidad de ligarse específicamente al PIGF o al sFlt-1.

25 El elemento de ensayo, que puede ser una tira de ensayo de uno o más elementos, puede presentar una zona para la aplicación de la muestra y en cada caso una zona para a detección de PIGF o de sFlt-1. En una forma de realización, el elemento de ensayo consiste en dos tiras de prueba paralelas, que en cada caso pueden estar compuestas de varios elementos yuxtapuestos y/o que en la zona de aplicación de la muestra o en la zona de absorción pueden estar en contacto o unidos entre sí. En una forma de realización, se ponen a disposición dos elementos de ensayo independientes entre sí, es decir, uno para el PIGF y otro para el sFlt-1. Los elementos de ensayo pueden ser parte componente de un kit. En otra forma de realización se emplea el elemento de ensayo para el procedimiento conforme a la invención.

35 Dado que una concentración determinada mediante métodos inmunoquímicos depende del procedimiento de ensayo usado y en especial de las normas y anticuerpos usados, es posible diferenciar entre sí los valores de concentración de una sustancia determinados mediante dos ensayos de una sustancia en una misma muestra. Por ello, si se aplica un ensayo para la cuantificación del PIGF o sFlt-1, que se diferencie de los aplicados en los ejemplos, se recomienda convertir matemáticamente los valores de concentración determinados en base a un factor de conversión, o determinar con ayuda de un colectivo de referencia adecuado (véase por ejemplo más adelante "A. PACIENTES Y MÉTODOS, 1. Pacientes") los valores de referencia como tales y seguidamente emplear estos valores conforme a la invención. También es posible una equiparación o compensación de las normas entre los ensayos.

45 Otro objeto de la invención es una muestra de referencia, cuya concentración de PIGF- y/o de sFlt-1 se halla en el correspondiente intervalo de corte (en especial como se indica más adelante) del procedimiento conforme a la invención. Una muestra de referencia preferida muestra una concentración de PIGF de $> 15,6$ ng/l, con preferencia, $> 17,7$ ng/l, con preferencia especial, $> 23,3$ ng/l, y/o una concentración de sFlt-1 de $< 56,5$ ng/l, con preferencia, $< 37,4$ ng/l. También se prefiere una muestra de referencia con una concentración de PIGF en el intervalo de 15,6-23,3 ng/l, con preferencia especial, en el intervalo de 10-50 ng/l, con preferencia muy especial, en el intervalo de 5-100 ng/l y más preferentemente aún, en el intervalo de 1-500 ng/l. También se prefiere una muestra de referencia con una concentración de sFlt-1 en el intervalo de 37,4-56,5 ng/l, con preferencia especial, en el intervalo de 25-100 ng/l, con preferencia muy especial, en el intervalo de 10-250 ng/l y más preferentemente aún en el intervalo de 5-500 ng/l. Otra muestra de referencia preferida muestra una concentración de PIGF que se halla en el intervalo de valor de corte para el PIGF, determinado experimentalmente o indicado por el fabricante, con un 25%, con preferencia especial, $\pm 50\%$ y con preferencia muy especial, 100%. Otra muestra de referencia preferida presenta una concentración del sFlt-1, que se halla en el intervalo de valor de corte para el sFlt-1, determinado experimentalmente o indicado por el fabricante, en un $\pm 25\%$, con preferencia especial, en un $\pm 50\%$ y con preferencia muy especial, en un $\pm 100\%$. La muestra de referencia también puede contener agentes para la estabilización del PIGF y/o de sFlt-1, preferentemente inhibidores de proteasas. En una forma de realización de la invención se usa esta muestra de referencia conforme a la invención

50 en un procedimiento para el diagnóstico, estratificación del riesgo y/o supervisión de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para estimar la probabilidad, de desarrollar una enfermedad de este tipo.

55 En una forma de realización, el kit conforme a la invención abarca al menos un agente para la cuantificación de PIGF y al menos un agente para la cuantificación de sFlt-1 en una muestra que hay que analizar, opcionalmente compuesta por unidades de embalaje separadas, presentando el kit además al menos una muestra de referencia conforme a la invención. La muestra de referencia puede contener: (i) PIGF, (ii) sFlt-1 o (iii) PIGF y sFlt-1. El kit también puede contener el medio de información arriba descrito. Un kit puede también abarcar uno o más elementos de ensayo.

65

Un kit de diagnóstico puede contener otros componentes y/o materiales auxiliares. Por ejemplo, el kit puede contener otras explicaciones para interpretar los resultados del ensayo así como eventualmente propuestas terapéuticas. El kit también puede contener uno o más elementos de ensayo o consistir en varios elementos de ensayo.

5 Descripción precisa de la invención

La presente invención se ha de explicar a continuación con mayor detalle por medio de ejemplos haciendo referencia a las figuras anexas, sin que la invención se vea limitada por ellos. En las figuras:

10 Figura 1: muestra la relación entre las concentraciones en plasma de sFlt-1 y PIGF.

Figura 2: muestra concentraciones de sFlt-1 respecto del estado inicial de PIGF, así como concentraciones de PIGF respecto de la concentración inicial de sFlt-1.

15 Figura 3: muestra índices de episodios determinados según Kaplan-Meier, donde la incidencia acumulativa de muerte, infarto de miocardio no mortal, ataque apopléjico y resucitación se refiere a la concentración inicial de PIGF en plasma (n = 230). Los pacientes se dividieron en grupos según las concentraciones medias de PIGF en PIGF (17,7 ng/l).

20 Figura 4: muestra índices de episodios determinados según Kaplan-Meier, en donde la incidencia acumulativa de muerte, infarto de miocardio no mortal, ataque apopléjico y resucitación se refiere a la concentración inicial de sFlt-1 en plasma (n = 230). Los pacientes se dividieron en grupos según la concentración media de sFlt-1 (56,5 ng/l).

25 Figura 5: muestra la importancia de pronóstico de PIGF para la incidencia de muerte, infarto de miocardio no mortal, ataque apopléjico y resucitación respecto de las concentraciones de sFlt-1. Los pacientes se dividieron en terciles según las concentraciones de PIGF (<15,6; 15,6-23,3; >23,3 ng/l) o bien las concentraciones de sFlt-1 (<37,4; 37,4-91,4; >91,4 ng/l) (n = 230).

30 Figura 6: muestra índices de episodios determinados según Kaplan-Meier, donde la incidencia acumulativa de muerte, infarto de miocardio no mortal, ataque apopléjico y resucitación se refiere a la concentración inicial de Flt-1 o bien PIGF (n = 230). Los pacientes se dividieron en grupos según las concentraciones medias de sFlt-1 y PIGF.

35 Figura 7: muestra modificaciones de las concentraciones en PIGF o bien sFlt-1 respecto de un tratamiento aleatorizado durante la posterior observación. Las muestras se obtuvieron al comienzo (valor de base), después de 30 días y 12 meses (n ≥ 80).

A. Pacientes y métodos

40 1. Pacientes

Los pacientes investigados en este estudio eran aquellos que ya habían participado en el estudio OPTIMAAL (Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan) y habían padecido de un infarto de miocardio. El diseño y los principales resultados del estudio OPTIMAAL ya se describieron con anterioridad (11). El presente estudio comprende un grupo de 230 pacientes con infarto de miocardio comprobado y una disfunción del ventrículo izquierdo y/o una insuficiencia cardíaca durante la fase aguda del infarto de miocardio. Los pacientes se dividieron en grupos aleatoriamente y se los ajustó a una dosis de losartano (1 x 50 mg/día) o captoprilo (3 x 50 mg/día), según la tolerancia. Entre los dos grupos tratados, no había diferencias esenciales respecto de las características iniciales.

50

2. Análisis bioquímicos

A los pacientes se les extrajo sangre por la mañana en ayunas, con lo cual se obtuvieron muestras de sangre en tubitos al vacío libres de pirógenos con EDTA. Los tubitos se sumergieron de inmediato en agua helada, se centrifugaron en un lapso de 15 minutos (1.000 g, 4°C, 15 minutos), y el plasma se almacenó en forma de un sinnúmero de alícuotas a -80°C hasta el análisis. La determinación de los marcadores era ciega, es decir, sin conocimiento de las historias de los pacientes y su correspondiente tratamiento, se llevó a cabo en el laboratorio central de la Universidad de Frankfurt. Se midieron PIGF, VEGF, sFlt-1 y ligando sCD40 (sCD40L) usando la técnica ELISA (todos los reactivos eran de R&D Systems, Wiesbaden) (7, 12, 13). Se midió proteína reactiva C altamente sensible (hsCRP) usando el nefelómetro Behring BN II (Dade-Behring, Deerfield, Illinois) (14).

60

3. Puntos finales del estudio

En relación con el presente estudio, se estableció un punto final que se componía de varios parámetros. Estaban incluidos la mortalidad total, independiente de la causa de muerte, una resucitación después de paro cardíaco, un infarto de miocardio repetido no mortal, así como un ataque apopléjico. Una descripción más precisa del diseño y la organización del estudio OPTIMAAL ya se ha publicado con anterioridad (11, 15).

65

4. Procedimientos estadísticos

Se terminó un modelo de regresión logística para determinar el riesgo relativo de episodios vasculares (16). La división de los grupos se realizó según la concentración media de cada biomarcador. Se terminó un modelo de regresión logístico para determinar el riesgo relativo de muerte, infarto de miocardio no mortal, ataque apopléjico y la necesidad de una resucitación (16). La repercusión de las características iniciales y los marcadores bioquímicos en cada una de las relaciones ensayadas entre concentraciones de PIGF o bien concentraciones de sFlt-1 y episodios vasculares se analizó por medio de modelos de regresión logísticos con función gradual. Todos los resultados que se obtuvieron para variables continuas, se indican como valor medio \pm discrepancia estándar. Se analizaron comparaciones entre los grupos por medio de la prueba t (bilateral). Se realizó una comparación de las variables categóricas por medio de la prueba de Pearson χ^2 . Los valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron usando el Software SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

Los parámetros estadísticos son: $n = 230$, faltante 10; mediana_(PIGF) = 17,7250, mediana_(sFlt-1) = 56,5000; percentiles = 33,33333333, 15,5700, 37,4300, 66, 66666667, 23,2700, 91,4100.

En la evaluación según Kaplan-Meier, se trata de un procedimiento estándar estadístico para el cálculo de diferencias en la tasa de mortalidad o la tasa de una supervivencia libre de episodios.

20

B. Resultados

Las concentraciones iniciales de sFlt-1 en plasma mostraron un valor medio de $183,2 \pm 465,6$ ng/l (intervalo 5,0 a 2503,4), y las concentraciones iniciales de PIGF en plasma eran de $24,0 \pm 20,0$ ng/l (intervalo 5,0 a 144,9). Cuando se unieron las concentraciones en plasma de sFlt-1 con biomarcadores tradicionales, no se dio una correlación con concentraciones de hsCRP (coeficiente de correlación de rangos según Spearman $r = -0,12$; $p = 0,08$), por el contrario, el análisis de correlación bivariable mostró una correlación inversa significativa entre sFlt-1 y 5CD40L, a pesar de que los coeficientes de correlación con $r = 0,17$ ($p = 0,018$) eran bajos. Más allá de ello, no resultó ninguna correlación significativa entre VEGF ($r = -0,03$; $p = 0,66$) o bien PIGF ($r = 0,05$; $p = 0,44$) y concentraciones en plasma de sFlt-1 (Fig. 1), a pesar de que las concentraciones de sFlt-1 en pacientes con mayores concentraciones de PIGF eran significativamente mayores (Fig. 2).

Ejemplo 1

35

Relación entre episodios vasculares y las concentraciones en plasma de PIGF y sFlt-1

Los pacientes se dividieron según sus concentraciones medias de biomarcadores. Las características iniciales se diferenciaban en pacientes con altas concentraciones de PIGF y en pacientes con bajas concentraciones de PIGF respecto de las concentraciones de sFlt-1 (Tabla 1). En pacientes con mayores concentraciones de PIGF, los índices de episodios para los puntos finales combinados mortalidad, infarto de miocardio no mortal, ataque apopléjico y resucitación en comparación con aquellos con bajas concentraciones de PIGF eran significativamente mayores (38,8% vs. 18,3%; $p = 0,001$) (Fig. 3). Respecto de los episodios vasculares más importantes (muerte e infarto de miocardio no mortal), las diferencias permanecieron con un índice de episodios del 30,4% en pacientes con mayores concentraciones de PIGF en comparación con el 15,7% en pacientes con bajas concentraciones de PIGF (Odds Ratio 2,36 [95% de CI 1,24-4,48]; $p = 0,012$).

Las características iniciales se distinguen en pacientes con altas concentraciones de sFlt-1 y pacientes con bajas concentraciones de sFlt-1 en cuanto a las concentraciones de BNP, sCD40L y PIGF, así como la incidencia de nuevos picos Q en el ECG y la duración de una permanencia estacionaria (Tabla 1). En pacientes con mayores concentraciones de sFlt-1, los índices de episodios para los puntos finales combinados de mortalidad, infarto de miocardio no mortal, ataque apopléjico y resucitación eran según tendencia menores que en pacientes con menores concentraciones de sFlt-1 (22,6% vs. 33,9%; $p = 0,08$) (Fig. 4). Se observó una diferencia no significativa para los episodios vasculares más importantes (muerte e infarto de miocardio no mortal) en el 19,1% de los pacientes con mayores concentraciones de sFlt-1 en comparación con el 27,0% en pacientes con menores concentraciones de sFlt-1 (Odds Ratio 0,64 [95% de CI 0,34-1,19]; $p = 0,21$).

60

65

ES 2 331 142 T3

TABLA 1

Características de base respecto de las concentraciones en plasma de PIGF y sFlt-1

	PIGF bajo	PIGF alto	sFlt-1 bajo	sFlt-1 alto
N	115	115	115	115
Varón	65,2 %	75,7 %	66,1 %	74,8%
Edad (años)	66,6 ±10,3	69,0 ±10,4	68,7 ±10,1	66,9 ±10,6
Nuevos picos Q presentes	73,6 %	76,6 %	67,3 %	83,2 %
Infarto de la pared anterior	60,0 %	61,7 %	58,3 %	63,5 %
Clasificación según Killip	I: 20,0%; II 65,2 %; III 13,9%; IV 0,9%	I: 19,1%; II 65,2 %; III 11,3%; IV 4,3%	I: 15,7%; II 73,0 %; III 9,6%; IV 1,7%	I: 23,5%; II 57,4 %; III 15,7%; IV 3,5%
Estadía estacionaria (días)	12,1 ± 20,1	14,2 ± 26,4	17,2 ± 28,0	9,1 ± 17,0*
Historia del paciente				
Angina	19,1 %	25,2%	27,0%	17,4%
Infarto de miocardio	13,9%	9,6%	13,0%	10,4%
PTCA	3,5%	0%	1,7%	1,7%
CABG	1,7%	0,9%	1,7%	0,9%
Factores de riesgo				
Diabetes	11,3%	11,3%	11,3%	11,3%
Hipertensión arterial	32,2 %	31,3 %	29,6 %	33,9 %
Fumador activo	35,7 %	43,5 %	39,1 %	40,0 %
Medicación				
Aspirina	94,8 %	97,4 %	95,7 %	96,5 %
Estatinas	61,7%	64,3%	65,2%	60,9%
Diuréticos del asa	74,8%	72,2%	80,9%	66,1%
Betabloqueantes	76,5 %	74,8 %	77,4 %	73,9 %
BNP (pg/ml)	125,2 ± 93,6	152,3 ±126,4	115,5 ± 79,8	162,0 ± 132,9*
CRP (µg/ml)	66,7 ± 66,5	74,0 ± 64,1	75,2 ± 69,7	65,5 ± 60,5

sCD40L (pg/ml)	4228 ± 3943	3915 ± 4376	4906 ± 4340	3237 ± 3809*
sFlt-1 (pg/ml)	108,8 ± 268	257,7 ± 593,5*	n. a.	n. a.
PIGF (pg/ml)	n. a.	n. a.	18,5 ± 15,1	29,5 ± 22,7*

Ejemplo 2

Interacción entre PIGF y sFlt-1

Los pacientes con mayores concentraciones de PIGF presentaban también mayores concentraciones de sFlt-1 (Fig. 2). En un intervalo considerable se superpusieron las concentraciones de sFlt-1 de los dos grupos, lo cual indicaba que sorprendentemente el aumento compensatorio de las concentraciones de sFlt-1 en pacientes con mayores concentraciones de PIGF no era unitario y no se podía observar en todos los pacientes. Los pacientes con concentraciones de PIGF en los dos tercios superiores, pero que no presentaban un aumento de las concentraciones de sFlt-1 (tercilo inferior), mostraron en comparación con pacientes que presentaban concentraciones de sFlt-1 en el tercilo superior, pero mayores concentraciones de PIGF similares, secuelas desventajosas (Fig. 5). Si las concentraciones de PIGF sólo eran ligeramente elevadas (segundo tercilo), parecía que incluso un aumento moderado de las concentraciones de sFlt-1 protegía a los pacientes de secuelas desventajosas. Por el contrario, en pacientes con concentraciones muy elevadas de PIGF (tercer tercilo) sólo aquellos pacientes con concentraciones de sFlt-1 en el tercilo superior mostraron un índice de episodios significativamente menor. Cuando los pacientes según sus concentraciones de PIGF o de sFlt-1 se clasificaron en dos grupos, el pronóstico de los pacientes con altas concentraciones de sFlt-1 no se distinguió de modo significativo de los pacientes con altas o bajas concentraciones de PIGF (Fig. 6). Conforme a ello, la relación de PIGF y sFlt-1 es un parámetro independiente apropiado para el pronóstico de episodios vasculares (Odds Ratio 4,00 [95% de CI 2,14-7,23]; $p < 0,001$), que es superior a la determinación individual de uno de los parámetros de modo significativo. Los índices de episodios en pacientes con bajas concentraciones de PIGF eran del 14,0% y eran independientes de las concentraciones de sFlt-1 ($p = 0,95$). Por el contrario, los índices de episodios en pacientes con altas concentraciones de PIGF eran del 55,8%, cuando las concentraciones de sFlt-1 eran bajas, pero del 24,3% cuando se elevaron las concentraciones de sFlt-1 ($p = 0,002$).

En resumen, de la Fig. 6 se puede extraer lo siguiente:

(a) Una relación de [PIGF = alto: sFlt-1 = bajo] remite a un gran riesgo para el paciente de un episodio desventajoso para él, como muerte, infarto de miocardio no mortal y ataque apopléjico.

(b) Si el valor de PIGF es, por el contrario, bajo, se reduce claramente el riesgo para un episodio desventajoso, independientemente de que el valor de sFlt-1 sea alto o bajo.

(c) Con una relación de [PIGF = bajo : sFlt-1 = alto], el riesgo para un episodio desventajoso es particularmente bajo.

(d) Si el valor de sFlt-1 es alto, el riesgo para un episodio desventajoso se reduce claramente, independientemente de que el valor de PIGF sea alto o bajo.

Ejemplo 3

Análisis de regresión multivariable

A fin de seguir investigando la independencia de pronóstico potencial de cada uno de los biomarcadores, se llevó a cabo un análisis de regresión logística multivariable gradual que comprendía PIGF y sFlt-1, así como otros marcadores bioquímicos tales como, por ejemplo, BNP, un marcador de la activación neurohumoral, hsCRP, una proteína clásica de fase aguda y sCD40L, un marcador de la activación tromboinflamatoria. También se tuvieron en cuenta las características de base que mostraban una importancia pronóstica significativa en un modelo univariable. Para los puntos finales combinados después de un período de observación de 4 años, sólo dos factores de riesgo establecidos, a saber edad avanzada y diabetes, se mostraron como parámetros de pronóstico independientes, después de haber sido aceptados los marcadores bioquímicos en el modelo (Tabla 2). Los marcadores BNP ($p = 0,043$), sCD40L ($p = 0,007$), PIGF ($p = 0,001$) y sFlt-1 ($p = 0,006$) permanecieron siendo parámetros importantes e independientes de pronóstico para el posterior curso de la enfermedad, mientras que hsCRP perdió algo de importancia después de incorporar PIGF en el modelo ($p = 0,77$ después de la incorporación de PIGF).

ES 2 331 142 T3

TABLA 2

Modelo de regresión logística multivariable para infarto de miocardio con fin mortal y no mortal en el curso de un período de observación posterior de 4 años

Variable	Razón de productos cruzados	95% de intervalo de confianza	Valor p
Edad > 75 años	2,49	1,13 – 5,47	0,023
Diabetes mellitus	3,06	1,13 – 8,29	0,028
Hipercolesterinemia	0,77	0,29 – 2,00	0,59
BNP > 113 ng/l	2,09	1,03 – 4,25	0,04
Proteína reactiva C > 50,0 mg/l de sCD40L > 3,5 µg/l	1,11	0,55 – 2,25	0,77
PIGF > 17,7 ng/l	2,70	1,31 – 5,58	0,007
sFlt-1 > 56,5 ng/l	5,07	2,35 – 10,02	0,001
PtGF . sFlt-1	0,35	0,16 – 0,73	0,006
	3,11	2,03 – 3,88	0,001

Ejemplo 4

Modificaciones de los biomarcadores durante el período de observación

En concordancia con los resultados de los estudios derivados del grupo total de pacientes, no se dio en cuanto al curso clínico ninguna diferencia entre los dos grupos de tratamiento (captoprilo o losartano). Más allá de ello, ni en pacientes con altas concentraciones ni en pacientes con bajas concentraciones de PIGF se observó un retroceso de los episodios (PIGF bajo: 19% de índice de episodios en el grupo de captoprilo vs. 17,5% en el grupo de losartano; $p = 1,00$; PIGF alto: 41,1% vs. 35,6%; $p = 0,57$). Se obtuvieron similares resultados para las concentraciones de sFlt-1: sFlt-1 alto: 22,2% en el grupo de captoprilo vs. 23,9% en el grupo de losartano ($p = 1,00$); sFlt1 bajo: 36,7% en el grupo de captoprilo vs. 30,9% en el grupo de losartano ($p = 0,56$). Además, se mostró que en pacientes con muestras en serie disponibles (día 0, 30 días y 1 año; $n > 80$ para cada grupo y cada momento) disminuyeron continuamente tanto las concentraciones de PIGF como las de sFlt-1 durante el período de observación, con lo cual no se produjeron diferencias entre los grupos de tratamiento (Fig. 7).

Los resultados del presente estudio muestran que mayores niveles en sangre de PIGF están ligados con episodios vasculares para pacientes después de un infarto de miocardio. En concordancia con un nuevo estudio en pacientes con enfermedades cardíaca coronarias agudas (7), la importancia de pronóstico de las concentraciones de PIGF en plasma era independiente de otros biomarcadores que representan los procesos fisiopatológicos distintos. Mayores concentraciones de PIGF proporcionaron un valor de pronóstico que tenía más fuerza aseverativa que las informaciones derivadas de las concentraciones de hsCRP en plasma. Por medio de análisis de regresión multivariante se identificaron otros marcadores bioquímicos diferentes, incluyendo péptido natriurético de tipo B, un marcador de una activación neurohumoral, sCD40L, un marcador de una activación tromboinflamatoria, y PIGF, un marcador de una inflamación vascular, como parámetros de pronóstico para el posterior curso de la enfermedad durante los siguientes 4 años. Sin embargo, el nuevo e importante hallazgo del presente estudio consiste en que se modula la importancia de pronóstico de PIGF por sFlt1. Estos hallazgos documentan que el equilibrio entre PIGF y su receptor soluble sFlt1 como único regulador endógeno conocido es un determinante esencial en cuanto al ulterior curso de la enfermedad en pacientes con infarto de miocardio agudo.

Tanto la causa de las mayores concentraciones de sFlt-1 como también las señales que regulan hacia arriba la expresión de Flt-1 en pacientes que padecieron de un infarto agudo de miocardio, actualmente no se conocen. La hipoxia es un estímulo potente para la regulación hacia arriba de la expresión de Flt-1 (6, 19). Es posible que una gran parte de sFlt-1 sea liberada a través del llamado “shedding” por las células inflamatorias (3, 9, 20). Independientemente de los mecanismos involucrados en el aumento de las concentraciones de sFlt-1 en plasma, los resultados del presente

estudio destacan el papel clave que se le asigna al equilibrio entre los mediadores pro- y antiinflamatorios para la estratificación del riesgo en el marco de una enfermedad cardíaca coronaria aguda (21).

Pero sobre todo estos estudios permiten esperar haber desarrollado estrategias antiinflamatorias netas para poder contrarrestar el avance de una aterosclerosis existente. La infusión de sFlt-1 con la finalidad de reducir las concentraciones de PIGF activo circulante en pacientes con enfermedad cardíaca coronaria inestable o de rápido avance podría ser particularmente efectiva en aquellos pacientes que presentan mayores concentraciones de PIGF y bajas concentraciones de su inhibidor sFlt-1.

Los resultados del presente estudio muestran que mayores concentraciones de PIGF en plasma, un marcador para una inflamación vascular, en pacientes después de infarto de miocardio están ligados con un mayor riesgo para posteriores episodios vasculares. La fuerza aseverativa de pronóstico depende, sin embargo, de la concentración de sFlt-1, lo cual soporta la hipótesis de que sFlt-1 regula la actividad de PIGF por unión e inactivación. Estos hallazgos podrían proporcionar la base para un nuevo enfoque terapéutico antiinflamatorio, en el que se usa sFlt-1 para reducir PIGF circulante en pacientes que presentan un mayor riesgo de un episodio vascular desventajoso.

Bibliografía

1. **Braunwald E.** Unstable angina: an etiologic approach to management. *Circulation.* 1998; 98:2219-22.
2. **Libby P, Ridker PM, Maseri A.** Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105:1135-43.
3. **Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compemolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P.** Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med.* 2002; 8:831-40.
4. **Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG.** Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:9267-71.
5. **Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P.** Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost.* 2003; 1:1356-70.
6. **Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P.** Placental Growth Factor (PIGF) and Its Receptor Flt-1 (VEGFR-1): Novel Therapeutic Targets for Angiogenic Disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 979:80-93.
7. **Heeschen C, Dimmeler S, Fichtlscherer S, Hamm CW, Berger J, Simoons ML, Zeiher AM.** Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain. *Jama.* 2004; 291:435-41.
8. **Khaliq A, Dunk C, Jiang J, Shams M, Li XF, Acevedo C, Weich H, Whittle M, Ahmed A.** Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. *Lab Invest.* 1999; 79:151-70.
9. **Rafii S, Avicilla S, Shmelkov S, Shido K, Tejada R, Moore MA, Heissig B, Hattori K.** Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 996:49-60.
10. **Chung NA, Makin AJ, Lip GY.** Measurement of the soluble angiopoietin receptor tie-2 in patients with coronary artery disease: development and application of an immunoassay. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33:529-35.
11. **Dickstein K, Kjekshus J.** Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan. *Lancet.* 2002; 360:752-760.
12. **Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boerstua E, Zeiher AM, Simoons ML.** Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2003; 348:1104-11.
13. **Heeschen C, Dimmeler S, Hamm OW, Boersma E, S eller AM, Simoons ML.** Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003; 107:524-530.
14. **Heeschen C, Hamm CW, Bruemmer J, Simoons ML.** Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE Investigators. Chimeric c7E3 AntiPlatelet Therapy in Unstable angina Refractory to standard treatment trial. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35:1535-42.
15. **Dickstein K, Kjekshus J.** Comparison of the effects of losartan and captopril on mortality in patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL trial design. Optimal Therapy in Myocardial Infarction with the Angiotensin II Antagonist Losartan. *Am J Cardiol.* 1999; 83:477-81.

16. Cox DR Regression models and life-tables. *JR Stat Soc [B]*. 1972; 34:187-220.

17. **Maynard SE, Jiang-Yong Min J-Y, Merchan J, Lim KH, Li J, Monday S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA.** Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 649-658.

18. **Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Lu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA.** Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004; 350:672-683.

19. **Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, Manabe I, Nagai R.** Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res.* 2004; 95:146-53.

20. **Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK.** Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood.* 2003; 102:1515-24.

21. **Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, Zeiher AM.** Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003; 107:2109-14.

22. **Ridker PM.** Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention. *Circulation* 2003; 107:363-369.

23. **Koenig W, Lowel H, Baumert J, Meisinger C.** C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: implications for future risk assessment: results from a large cohort study in southern Germany. *Circulation* 2004; 109:1349-53.

24. **Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al.** C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004; 350:1387-97.

25. **Morrow DA, Rifai N, Antman EM, et al.** C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndrome: a TIMI 11A substudy. *Thrombolysis in Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1460-5.

26. **Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L.** Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. N Engl J Med* 2000; 343:1139-47.

27. **James SK, Lindahl B, Siegbahn A, et al.** N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients with unstable coronary artery disease: a Global Utilization of Strategies To Open occluded arteries (GUSTO)-IV substudy. *Circulation* 2003; 108: 275-81.

ES 2 331 142 T3

REIVINDICACIONES

1. Uso de un procedimiento *in vitro*, que comprende las siguientes etapas:

(a) preparación de una muestra de un paciente que hay que analizar;

(b) cuantificación de PIGF en la muestra;

(c) cuantificación de sFlt-1 en la muestra;

para el diagnóstico, la estratificación del riesgo y/o el control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para estimar la probabilidad de desarrollar una enfermedad de este tipo.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el procedimiento también comprende la siguiente etapa:

(d) comparación de los valores determinados en (b) y (c) de PIGF y sFlt-1 con un valor de referencia en cada caso y/o un valor determinado en cada caso en una muestra de referencia;

y/o comprende las siguientes etapas:

(d') formación de una relación entre el valor de PIGF determinado en (b) y el valor de sFlt-1 determinado en (c);

(e') comparación del valor determinado en (d') con un valor de referencia y/o un valor determinado en una muestra de referencia.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la enfermedad vascular es una enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad cerebrovascular y/o una enfermedad oclusiva arterial periférica.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la enfermedad cardíaca coronaria es un síndrome coronario agudo, con preferencia, angina de pecho inestable o infarto de miocardio agudo.

5. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra que hay que analizar es sangre periférica o una de sus fracciones, con preferencia, plasma sanguíneo o suero sanguíneo.

6. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en donde la estratificación del riesgo comprende una determinación de una probabilidad para un episodio desventajoso, consistente en muerte, infarto de miocardio no mortal y/o ataque apopléjico.

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde un valor de PIGF por encima de un valor de referencia de PIGF de preferentemente $> 15,6$ ng/l, con preferencia especial $> 17,7$ ng/l, con preferencia muy especial $> 23,3$ ng/l, y un valor de sFlt-1 por debajo de un valor de referencia de sFlt-1 de preferentemente $< 56,5$ ng/l, con preferencia especial $< 37,4$ ng/l, indica una mayor probabilidad para un episodio desventajoso.

8. Uso de acuerdo con una reivindicación 6 ó 7, en donde una concentración de PIGF, que esté en los dos tercios superiores de un colectivo de referencia, y una concentración de sFlt-1, que esté en el tercio inferior del colectivo de referencia, indica una mayor probabilidad para un episodio desventajoso.

9. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 8, en donde una relación de [PIGF = alto : sFlt-1 = bajo] indica una mayor probabilidad para un episodio desventajoso.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde una concentración de PIGF $> 15,6$ ng/l, con preferencia $> 17,7$ ng/l, con preferencia especial $> 23,3$ ng/l, significa una alta concentración de PIGF.

11. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en donde una concentración de sFlt-1 $< 56,5$ ng/l, con preferencia $< 37,4$ ng/l, significa una baja concentración de sFlt-1.

12. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 11, en donde una relación de [PIGF : sFlt-1] $\geq 0,31$, con preferencia $\geq 0,42$, con preferencia especial $\geq 0,62$ indica una mayor probabilidad para un episodio desventajoso.

13. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en donde el procedimiento comprende una cuantificación de al menos otro biomarcador, con preferencia VEGF, sCD40L, PAPP-A, MPO, mioglobina, creatina-quinasa, en especial CK-MB, troponina, en especial troponina I, troponina T y/o sus complejos, CRP, cistatina C, péptidos natriuréticos, en especial ANB, BNP y/o NT-proBNP.

ES 2 331 142 T3

14. Procedimiento *in vitro* para el diagnóstico, la estratificación del riesgo y/o el control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para la estimación de la probabilidad de desarrollar una enfermedad de este tipo, en donde el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 5 (a) preparación de una muestra de un paciente que hay que analizar;
- (b) cuantificación de PIGF en la muestra;
- 10 (c) cuantificación de sFlt-1 en la muestra.

15 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el procedimiento comprende además la siguiente etapa:

- (d) comparación de los valores determinados en (b) y (c) de PIGF y sFlt-1 con un valor de referencia en cada caso y/o un valor determinado en cada caso en una muestra de referencia;
- y/o comprende las siguientes etapas:
- 20 (d') formación de una relación entre el valor de PIGF determinado en (b) y el valor de sFlt-1 determinado en (c);
- (e') comparación del valor determinado en (d') con un valor de referencia y/o un valor determinado en una muestra de referencia.

25 16. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 ó 15, en donde el paciente presenta una enfermedad vascular, consistente en enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad cerebrovascular y/o enfermedad oclusiva arterial periférica, o se sospecha que presenta o que desarrollará la enfermedad mencionada.

30 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la enfermedad cardíaca coronaria es un síndrome coronario agudo, con preferencia angina de pecho inestable o infarto de miocardio agudo.

35 18. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 a 17, en donde se trata al paciente con uno o varios agentes terapéuticos, compuestos por sFlt-1, agentes antiinflamatorios, agentes antitrombóticos, agentes antiplaquetarios, agentes fibrinolíticos, agentes reductores de lípidos, inhibidores directos de trombina y/o inhibidores de los receptores de la glucoproteína IIb/IIIa.

40 19. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 a 18, en donde la muestra que hay que analizar es sangre periférica o una de sus fracciones, con preferencia plasma sanguíneo o suero sanguíneo.

20. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 a 19, en donde el procedimiento comprende además una estratificación del riesgo por medio de la determinación de una probabilidad para un episodio desventajoso, consistente en muerte, infarto de miocardio no mortal y/o ataque apopléjico.

45 21. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en donde un valor de PIGF por encima de un valor de referencia de PIGF de preferentemente > 15,6 ng/l, con preferencia especial > 17,7 ng/l, con preferencia muy especial > 23,3 ng/l, y un valor de sFlt-1 por debajo de un valor de referencia de sFlt-1 de preferentemente < 56,5 ng/l, con preferencia especial < 37,4 ng/l, indica una mayor probabilidad para un episodio desventajoso.

50 22. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20 ó 21, en donde una concentración de PIGF que está en los dos tercios superiores de un colectivo de referencia y una concentración de sFlt-1 que está en el tercio inferior del colectivo de referencia, indica una mayor probabilidad para un episodio desventajoso.

55 23. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 20 a 22, en donde una relación de [PIGF = alto : sFlt-1 = bajo] indica una mayor probabilidad para un episodio desventajoso.

24. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, en donde una concentración de PIGF > 15,6 ng/l, con preferencia > 17,7 ng/l, con preferencia especial > 23,3 ng/l, significa una alta concentración de PIGF.

60 25. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23 ó 24, en donde una concentración de sFlt-1 < 56,5 ng/l, con preferencia < 37,4 ng/l, significa una baja concentración de sFlt-1.

65 26. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 23 a 25, en donde una relación de [PIGF : sFlt-1] \geq 0,31, con preferencia \geq 0,42, con preferencia especial \geq 0,62, indica una mayor probabilidad para un episodio desventajoso.

27. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 a 26, en donde el procedimiento comprende una cuantificación de al menos otro biomarcador, con preferencia VEGF, sCD40L, PAPP-A, MPO, mioglobina, creatina-

ES 2 331 142 T3

quinasa, en especial CK-MB, troponina, en especial troponina I, troponina T y/o sus complejos, CRP, cistatina C, péptidos natriuréticos, en especial ANB, BNP y/o NT-proBNP.

28. Uso de un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 a 27 para identificar un paciente que probablemente resultará beneficiado por el tratamiento con uno o varios agentes terapéuticos, compuestos por sFlt-1, agentes antiinflamatorios, agentes antitrombóticos, agentes antiplaquetarios, agentes fibrinolíticos, agentes reductores de lípidos, inhibidores directos de trombina y/o inhibidores de los receptores de la glucoproteína IIb/IIIa.

29. Kit de diagnóstico, que comprende al menos un agente para la cuantificación de PIGF y al menos un agente para la cuantificación de sFlt-1 en una muestra que hay que analizar, opcionalmente compuesto por unidades de embalaje separadas, comprendiendo además el kit al menos una muestra de referencia con una concentración de PIGF > 15,6 ng/l, preferentemente > 17,7 ng/l, con preferencia especial > 23,3 ng/l, y una concentración de sFlt-1 < 56,5 ng/l, con preferencia < 37,4 ng/l, y opcionalmente también un agente de información, según el cual (i) una concentración de PIGF que está en los dos tercios superiores de un colectivo de referencia y una concentración de sFlt-1 que está en el tercio inferior del colectivo de referencia y/o (ii) un valor de PIGF por encima del valor de referencia de PIGF y un valor de sFlt-1 por debajo del valor de referencia de sFlt-1, indica una mayor probabilidad para un episodio desventajoso consistente en muerte, infarto de miocardio no mortal y/o ataque apopléjico.

30. Uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 29 para el diagnóstico, la estratificación del riesgo y/o el control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para la estimación de la probabilidad de desarrollar una enfermedad de este tipo, o para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 28.

31. Uso de un kit de diagnóstico, que comprende al menos un agente para la cuantificación de PIGF y al menos un agente para la cuantificación de sFlt-1 en una muestra que hay que analizar, opcionalmente compuesto por unidades de embalaje separadas, comprendiendo además el kit un agente para información, según el cual (i) una concentración de PIGF que está en los dos tercios superiores de un colectivo de referencia y una concentración de sFlt-1, que está en el tercio inferior del colectivo de referencia y/o (ii) un valor de PIGF por encima del valor de referencia de PIGF y un valor de sFlt-1 por debajo del valor de referencia de sFlt-1, indica una mayor probabilidad para un episodio desventajoso, seleccionado del grupo consistente en muerte, infarto de miocardio no mortal o ataque apopléjico, para el diagnóstico, la estratificación del riesgo y/o el control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para estimar la probabilidad de desarrollar una enfermedad de este tipo, o para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 28.

32. Uso de un elemento de ensayo que comprende una zona para aplicación de la muestra para aplicar la muestra y de parejas de unión de PIGF específicas marcadas y parejas de unión de sFlt-1, en donde las parejas de unión están presentes opcionalmente en el elemento de ensayo y en donde la zona de aplicación de la muestra está en contacto con al menos una zona de comprobación y la zona de comprobación comprende áreas separadas espacialmente para la unión específica de PIGF y sFlt-1, para el diagnóstico, la estratificación del riesgo y/o el control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para estimar la probabilidad de desarrollar una enfermedad de este tipo, y/o para identificar un paciente, que probablemente resultará beneficiado por el tratamiento con uno o varios agentes terapéuticos, compuestos por sFlt-1, agentes antiinflamatorios, agentes antitrombóticos, agentes antiplaquetarios, agentes fibrinolíticos, agentes reductores de lípidos, inhibidores directos de trombina y/o inhibidores de receptores de glucoproteína IIb/IIIa.

33. Uso de un elemento de ensayo inmunocromático que comprende al menos un agente para la cuantificación de PIGF y al menos un agente para la cuantificación de sFlt-1 en una muestra que hay que analizar, para el diagnóstico, la estratificación del riesgo y/o el control de una enfermedad vascular con etiología aterosclerótica y/o para la estimación de la probabilidad de desarrollar una enfermedad de este tipo, y/o para identificar un paciente que probablemente resultará beneficiado por el tratamiento con uno o varios agentes terapéuticos compuestos por sFlt-1, agentes antiinflamatorios, agentes antitrombóticos, agentes antiplaquetarios, agentes fibrinolíticos, agentes reductores de lípidos, inhibidores directos de trombina y/o inhibidores de receptores de glucoproteína IIb/IIIa.

55

60

65

Fig. 1

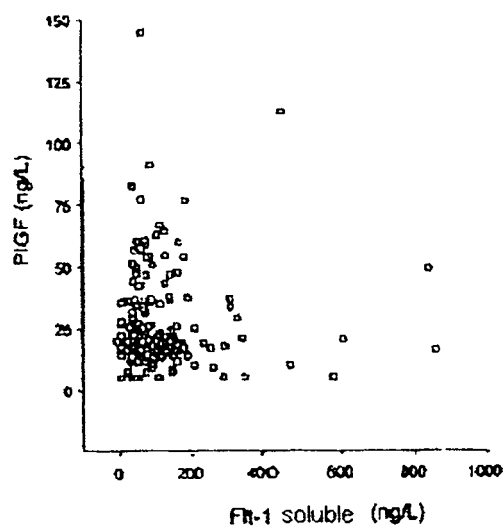


Fig. 2

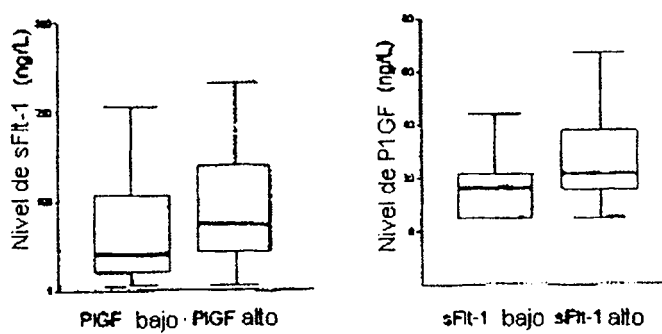


Fig. 3

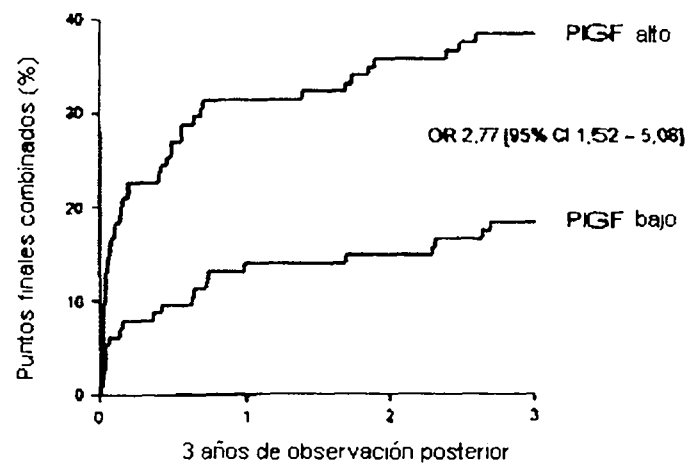


Fig. 4

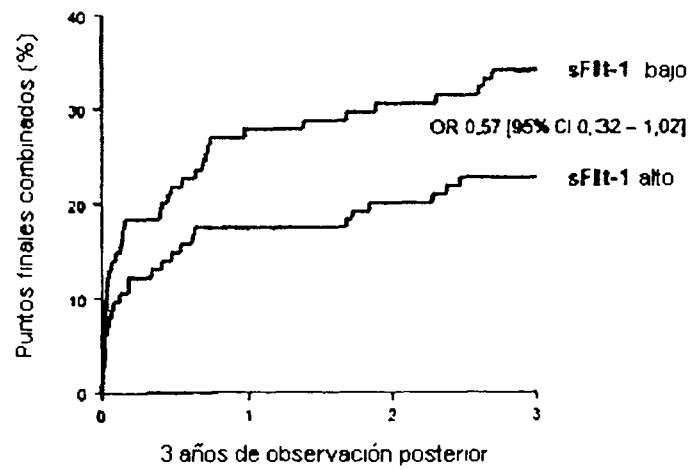


Fig. 5

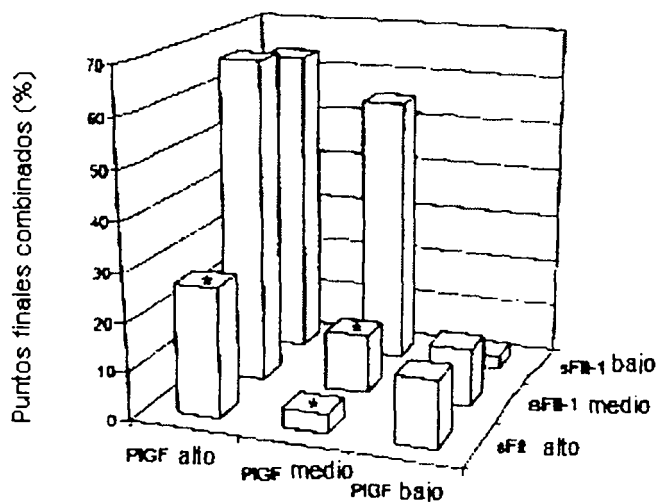


Fig. 6

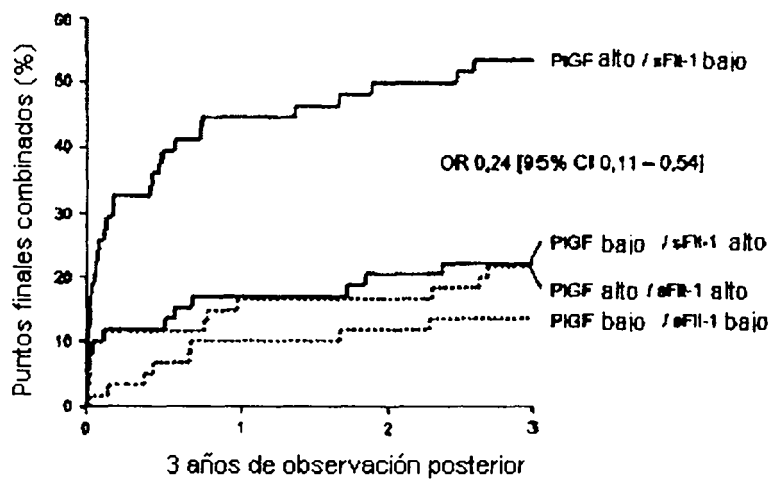


Fig. 7

