



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 370 671**

② Número de solicitud: 201030759

⑤ Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C12N 9/76 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **20.05.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.12.2011

⑦ Solicitante/s: **Fundación Hospital Nacional de Paraplégicos para la Investigación y la Integración (FUHNPAIIN)**
Finca La Peraleda, s/n
45071 Toledo, ES

⑦ Inventor/es: **Martín-Rojas, Tatiana;**
Gil-Dones, Félix;
Moral Dardé, Verónica;
Rodríguez Padial, Luis;
Cuesta Marina, Fernando de la;
Álvarez-Llamas, Gloria;
Vivanco Martínez, Fernando y
González Barderas, María Eugenia

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

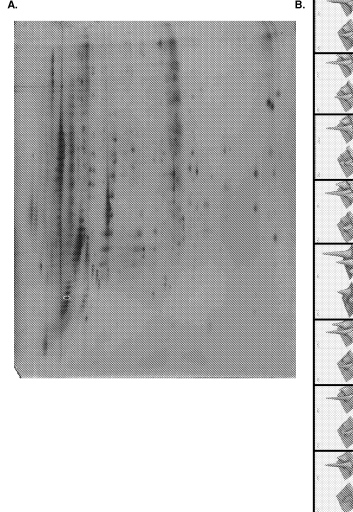
⑤ Título: **Método de pronóstico y diagnóstico de la estenosis aórtica que comprende la α -1-antiquimiotripsina como marcador.**

⑤ Resumen:

Método de pronóstico y diagnóstico de la estenosis aórtica que comprende la α -1-antiquimiotripsina como marcador.

La presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para la determinación del riesgo de sufrir estenosis aórtica (EA), la presencia de EA y/o el pronóstico del desarrollo de una EA, mediante la detección y/o cuantificación de la proteína α -1-antiquimiotripsina. Así mismo, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico y pronóstico de la EA.

FIG. 1



DESCRIPCIÓN

Método de pronóstico y diagnóstico de la estenosis aórtica que comprende la α -1-antiquimiotripsina como marcador.

La presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para la determinación del riesgo de sufrir estenosis aórtica (EA), la presencia de EA y/o el pronóstico del desarrollo de una EA, mediante la detección y/o cuantificación de la proteína α -1-antiquimiotripsina. Así mismo, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico y pronóstico de la EA.

Estado de la técnica anterior

La EA es una enfermedad de elevada prevalencia en los países desarrollados y es la responsable del mayor número de reemplazos valvulares aórticos (Passik *et al.* Mayo Clin. Proc. 1987; 62: 119-23). Solamente en Estados Unidos se realizan más de 70.000 reemplazos valvulares aórticos anualmente. El 2-3% de los adultos mayores de 65 años padecen EA calcificada, y alrededor del 25% de estas personas padece esclerosis aórtica (engrosamiento de la válvula aórtica sin obstrucción del flujo de salida del ventrículo izquierdo) (Otto y O'Brien. Heart 2001; 85: 601-602). Por tanto, se espera un gran aumento de la EA, debido al progresivo envejecimiento de la población que conllevan las mejoras en sanidad.

Durante años, la EA degenerativa ha sido considerada consecuencia inevitable del envejecimiento y se pensaba en ella como un proceso pasivo secundario al depósito de calcio en la válvula aórtica. En la actualidad, aunque no se conoce con certeza su etiología, diversos autores han señalado que comparte los mismos factores de riesgo que la aterosclerosis, ya que la EA es más frecuente en pacientes con hipercolesterolemia, hipertensión arterial, tabaquismo y diabetes (Nalini *et al.* Circulation 2003; 107:2181-84).

Además, recientemente se han encontrado similitudes histológicas entre la válvula aórtica estenótica y la placa de ateroma, lo que ha llevado a la hipótesis de que la EA degenerativa es un proceso inflamatorio similar al aterosclerótico. En diferentes trabajos, se ha demostrado que la válvula aórtica desarrolla aterosclerosis con posterior depósito de calcio y expresión de marcadores específicos de matriz ósea, como la osteopontina (Stewart *et al.* J Am Coll Cardiol. 1997; 29: 630-4, Emile *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997; 17: 547-52, Kevin *et al.* Circulation. 1995; 92: 2163-68, Srivatsa *et al.* J Clin Invest. 1997; 99: 996-1009, Feldman *et al.* Cathet Cardiovasc Diagn. 1993; 29: 1-7, Fernández-González *et al.* Tex Heart Inst J. 1997; 24: 232). De igual forma se ha documentado que la disfunción endotelial, con acumulación de lípidos y proteínas (apolipoproteína (apo) B, apo(a) y apoE) (O'Brien *et al.* 1996; 16: 523-32, Mohler *et al.* Circulation. 2001; 103: 1522-8) juega un papel importante en el inicio de la EA, así como el estrés oxidativo con modificación de las enzimas del óxido nítrico juega también un papel relevante (Arumugam *et al.* J Cardiovasc Surg. 1995; 10: 610-1, Rajamannan *et al.* J Am Coll Cardiol. 2003; 41: 842). Sin embargo, algunos datos sugieren que su mecanismo patogénico no es igual que el de la aterosclerosis; así, en adultos con EA severa solamente el 50% presenta enfermedad arterial coronaria significativa. A su vez, la mayoría de los pacientes con enfermedad arterial coronaria no presentan EA (Otto y O'Brien. Heart 2001; 85: 601-602). Además, algunos estudios dirigidos a evaluar el efecto de las estatinas en la EA degenerativa han descrito disminución de la enfermedad coronaria sin cambio en la progresión de la EA degenerativa (Rossebo *et al.* N Engl J Med. 2008. 25; 359: 1343-56, Cowell *et al.* N Engl J Med. 2005. 9; 352: 2389-97, Chan *et al.* Circulation 2010; 121: 306-14).

Es importante destacar que, aunque se han hecho avances en el conocimiento de los mecanismos involucrados en este proceso, no se está utilizado en la actualidad ningún marcador en el diagnóstico/pronóstico de la EA.

La α -1-antiquimiotripsina es una alfa globulina glicoproteína miembro de la familia de las serpinas. La α -1-antiquimiotripsina inhibe algunas proteasas como la catepsina y es protectora del daño producido por enzimas proteolíticas. En los últimos años se ha evidenciado la participación de ésta proteína en la enfermedad de Alzheimer y su deficiencia, con enfermedad hepática.

La identificación temprana de pacientes con riesgo de desarrollar una estenosis valvular aórtica es de gran importancia ya que disminuiría la mortalidad y morbilidad asociada a esta enfermedad. La existencia en los servicios hospitalarios de test específicos para el estudio de riesgo de padecer EA, podría ser de gran ayuda para la prevención y posible profilaxis de dicha enfermedad.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para la determinación de la estenosis aórtica (EA) o del riesgo de padecer EA o de la evolución de una EA de forma rápida, sencilla y eficaz. Así mismo, la presente invención se refiere al uso de un kit para determinar el riesgo de padecer EA o para determinar la presencia de una EA o para predecir la progresión de una EA, en una muestra biológica aislada.

La presente invención proporciona, por tanto, una respuesta a la necesidad de disponer de biomarcadores que permitan el diagnóstico y el pronóstico de la EA.

ES 2 370 671 A1

La presente invención soluciona el problema técnico de encontrar un buen biomarcador para la EA, a ser posible que pueda ser monitorizado en plasma o suero sanguíneo, es decir, que no implique una obtención de la muestra biológica más invasiva.

5 En la presente invención, cabe destacar un efecto sorprendente: la α -1-antiquimotripsina presenta niveles elevados en el tejido de válvula aórtica estenótica, en su secretoma así como en el plasma sanguíneo de enfermos con EA, en relación con los niveles de los individuos control.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles (en adelante método de la invención) para la determinación de la EA o del riesgo de padecer EA o de la evolución de una EA que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un sujeto, y
- 15 b) detectar y/o cuantificar el producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen α -1-antiquimotripsina que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 50% de identidad con SEQ ID NO: 1, o un fragmento de dicho producto de expresión, en la muestra obtenida en el paso (a).

El término “estenosis aórtica (EA)” tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la estenosis de la válvula aórtica, que es una valvulopatía (cardiopatía valvular) caracterizada por el estrechamiento anormal del orificio de la válvula aórtica del corazón. Esta reducción del orificio valvular puede ser congénita o adquirida.

La expresión “determinación de la EA”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, pero no se limita, a la constatación de la presencia de la EA en un sujeto.

La expresión “riesgo de padecer EA”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, pero no se limita, a la predisposición de un sujeto de sufrir o desarrollar una EA. Por tanto, el método se refiere a la obtención de datos útiles para determinar si un sujeto está desarrollando o puede desarrollar una EA.

El término “evolución de la EA”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, pero no se limita, a la progresión de la EA o a la probabilidad de presentar insuficiencia cardíaca o de muerte por insuficiencia cardíaca, así como a la predicción de la respuesta a un determinado tratamiento de la EA.

El término “% de identidad” tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al % de identidad entre dos secuencias de aminoácidos. El % de identidad es el resultado de contar el número de posiciones a lo largo del alineamiento de dos secuencias donde todos los aminoácidos en la misma posición son idénticos.

El producto de expresión o el fragmento del mismo, detectado y/o cuantificado en el paso (b) puede codificar para una secuencia aminoacídica al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% idéntica a SEQ ID NO: 1.

El término “producto de expresión”, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia al producto resultante de la transcripción (ARN) o de la traducción (proteína) de un gen o de una secuencia nucleotídica de ADN, o a cualquier forma resultante del procesamiento del producto resultante de la transcripción o de la expresión de un gen o de una secuencia nucleotídica de ADN.

El término “gen α -1-antiquimotripsina” se refiere a la secuencia de ADN que codifica para la proteína α -1-antiquimotripsina, una variante de la proteína α -1-antiquimotripsina o un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente.

La secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la proteína α -1-antiquimotripsina de *Homo sapiens* (humanos) con número de acceso NP_001076.2 de la base de datos NCBI.

En una realización preferida, el producto de expresión o el fragmento del mismo, detectado y/o cuantificado en el paso (b) codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida, dicho producto de expresión codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 o para un fragmento de la misma.

En una realización preferida, el método de la invención además comprende comparar los datos obtenidos en el paso (b) con unos valores estándar para encontrar una desviación significativa.

En una realización más preferida, el método de la invención además comprende atribuir la desviación significativa a la presencia de EA o al riesgo de padecer EA en el sujeto de (a).

Preferiblemente, la muestra biológica del paso (a) es un fluido biológico. Más preferiblemente, el fluido biológico es sangre o suero o plasma sanguíneo.

Preferiblemente, la muestra biológica del paso (a) comprende células. Preferiblemente, comprende un tejido.

ES 2 370 671 A1

La muestra biológica del paso (a) es una muestra aislada de un organismo como el cuerpo humano o animal y puede provenir de un fluido fisiológico y/o cualquier célula o tejido de un organismo.

5 Preferiblemente, la muestra biológica aislada en el paso (a) del método de la invención comprende células. Más preferiblemente, estas células son de válvula aórtica. La muestra biológica puede ser un tejido, por ejemplo, pero sin limitarse, una biopsia o un aspirado por aguja fina. Aún más preferiblemente, la muestra biológica aislada en el paso (a) puede ser un tejido de válvula aórtica.

10 En una realización preferida, la muestra biológica aislada en el paso (a) del método de la invención es un fluido biológico. El fluido biológico puede incluir fluidos excretados o secretados del cuerpo, así como fluidos que normalmente no lo son. El fluido biológico puede incluir, aunque sin limitarse, líquido amniótico que rodea el feto, humor acuoso, fluido intersticial, linfa, leche materna, moco (incluyendo el drenaje nasal y la flema), saliva, sebo (grasa de la piel), suero, sudor, lágrimas, orina, líquido pericárdico, sangre y plasma sanguíneo. En una realización más preferida, el fluido biológico es sangre, plasma sanguíneo o suero sanguíneo.

15 La muestra biológica aislada en el paso (a) del método de la invención puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, fresca, congelada, fijada o embebida en parafina.

20 El término “sujeto”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos.

25 La expresión “detectar y/o cuantificar el producto de expresión” en la muestra obtenida, tal y como se emplea en la descripción del método de la invención, hace referencia a la detección de la presencia y/o a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión del gen α -1-antiquimotripsina basada en una señal que se obtiene directamente de dicho producto de expresión y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de producto de expresión del gen, presentes en la muestra. Dicha señal puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física del producto de expresión del gen α -1-antiquimotripsina. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto de los productos de expresión) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

35 El término “comparar”, tal y como se emplea en la descripción del método primero de la invención, se refiere, pero no se limita, a la comparación de la cantidad de producto de expresión del gen α -1-antiquimotripsina de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de producto de expresión del gen α -1-antiquimotripsina de una muestra de referencia deseable, descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente junto con la muestra biológica problema. La comparación del paso (c) del método de la invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

45 El término “valores estándar”, tal y como se emplea en la descripción del método de la invención, se refiere a la cantidad absoluta o relativa de producto de expresión del gen α -1-antiquimotripsina que permite discriminar la presencia de la EA. Los valores estándar adecuados pueden ser determinados por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Más preferiblemente, los valores estándar pueden derivarse de los límites de distribución normal de una cantidad fisiológica encontrada en una población de sujetos control. Dicha cantidad fisiológica puede ser determinada por varias técnicas bien conocidas, como por ejemplo, el cálculo de la media de la cantidad de producto de expresión del gen α -1-antiquimotripsina en una población de sujetos control determinado mediante el método de la presente invención.

55 La desviación significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

60 De acuerdo con la presente invención, la detección de la cantidad de producto de expresión del gen α -1-antiquimotripsina puede ser llevada a cabo por cualquier método conocido en el estado de la técnica.

65 En una realización preferida del método primero de la invención, la detección del producto de la expresión del gen se realiza analizando el nivel de ARN mensajero (ARNm) derivado de su transcripción, donde el análisis del nivel de ARNm se puede realizar, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; *microarrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier

mecanismo; *microarrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

En una realización preferida, el producto de expresión de la secuencia nucleotídica del gen α -1-antiquimotripsina o el fragmento de dicho producto de expresión, que se detecta y/o cuantifica en el paso (b) del método de la invención, es una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 50% de identidad con SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma. Más preferiblemente, es una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma. Aún más preferiblemente, es SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma.

Preferiblemente, la detección y/o cuantificación del paso (b) del método de la invención se realiza mediante electroforesis, inmunoensayo, cromatografía, tecnología de *microarrays* y/o espectrometría de masas.

La detección y/o cuantificación del paso (b) del método de la invención puede llevarse a cabo mediante cualquier combinación de cualquiera de las técnicas mencionadas. La detección puede realizarse evaluando la presencia o la ausencia del producto de expresión o del fragmento del mismo.

La electroforesis es una técnica analítica de separación basada en el movimiento o la migración de macromoléculas disueltas en un medio (el tampón de electroforesis), a través de una matriz o un soporte sólido, como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula depende de su movilidad electroforética, que a su vez depende de la carga, el tamaño y la forma de la molécula. Existen numerosas variantes de esta técnica según el equipo que se utilice para llevar a cabo la separación. La electroforesis puede ser elegida de la lista que comprende: electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, enfocado isoeléctrico o electroenfoque o electroforesis bidimensional.

Un inmunoensayo es un ensayo bioquímico que mide la concentración de una sustancia en una muestra biológica usando una reacción de un anticuerpo o anticuerpos contra su antígeno. El ensayo se basa en la unión específica de un anticuerpo con su antígeno. La detección y/o cuantificación del anticuerpo y/o del antígeno puede realizarse con diversos métodos. Uno de los más comunes es el marcaje del antígeno o el anticuerpo. Este marcaje puede consistir, aunque sin limitarse, en una enzima, un radioisótopo (radioinmunoensayo), un marcador magnético (inmunoensayo magnético) o un fluoróforo. Además hay otras técnicas como la aglutinación, la nefelometría, la turbidimetría o el *immunoblot*. Los inmunoensayos heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos. En un inmunoensayo competitivo la respuesta es inversamente proporcional a la concentración de antígeno de la muestra. En un ensayo no competitivo, también llamado ensayo en sándwich, los resultados son directamente proporcionales a la concentración de antígeno. Una técnica de inmuno ensayo que puede usarse en la presente invención es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (del inglés “*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*”).

En una realización preferida, el inmunoensayo es un *immunoblot*. Para llevar a cabo la técnica del *immunoblot*, también llamada *Western blot* o inmunodetección en membrana, se obtiene un extracto de proteínas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto y se separan las proteínas mediante electroforesis en un medio de soporte capaz de retenerlas. Una vez separadas las proteínas se transfieren a un soporte diferente o membrana donde pueden ser detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen la proteína α -1-antiquimotripsina, sus variantes o los fragmentos de las mismas. Esta membrana se hibrida con un primer anticuerpo específico (o anticuerpo primario) que reconoce la proteína α -1-antiquimotripsina, su variante o un fragmento de las mismas. A continuación, la membrana se hibrida con un segundo anticuerpo (o anticuerpo secundario) capaz de reconocer de manera específica al anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo primario que reconoce la proteína α -1-antiquimotripsina, su variante o un fragmento de las mismas, el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario. Son conocidos en el estado de la técnica diferentes formatos, soportes y técnicas que pueden ser empleados para la realización de este aspecto preferido del método de la invención.

En otra realización preferida, el inmunoensayo es una inmunohistoquímica (IHQ). Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas de determinantes antigénicos característicos. El análisis mediante inmunohistoquímica se realiza sobre cortes de tejido, ya sea congelado o incluido en parafina, procedente de una muestra biológica aislada de un sujeto. Estos cortes se hibridan con un anticuerpo específico o anticuerpo primario que reconoce a la proteína α -1-antiquimotripsina, sus variantes o fragmentos de las mismas. A continuación, los cortes se hibridan con un anticuerpo secundario capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo primario que reconoce la proteína α -1-antiquimotripsina, su variante o un fragmento de las mismas, el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario.

ES 2 370 671 A1

Por medio de técnicas cromatográficas se puede separar las moléculas según su carga, su tamaño o su peso molecular, por su polaridad o por su potencial redox, entre otros. La técnica cromatográfica puede ser, aunque sin limitarse, cromatografía líquida (de partición, de absorción, de exclusión, de intercambio iónico), cromatografía gaseosa o cromatografía de fluidos supercríticos.

La tecnología de *microarrays* de la presente invención se basa, por ejemplo, pero sin limitarse, en la fijación en un soporte sólido de una molécula que reconoce el producto de expresión de la presente invención. El *microarray* de anticuerpos es uno de los más comunes *microarrays* de proteínas. En este caso los anticuerpos se colocan en pequeños puntos, se fijan en el soporte sólido (llamado chip de proteínas) y se usan para capturar moléculas y así detectar las proteínas en una muestra biológica, como pueden ser un lisado celular, un medio condicionado, suero u orina.

El término “soporte sólido” tal y como se emplea en la presente descripción se refiere a una gran variedad de materiales, por ejemplo, pero sin limitarse, resina de intercambio iónico o adsorción, vidrio, plástico, látex, nylon, gel, ésteres o celulosa, esferas paramagnéticas o una combinación de algunos de ellos.

Más preferiblemente, la detección y/o cuantificación del paso (b) del método de la invención se realiza mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del producto de expresión del gen de la α -1-antiquimotripsina o de un fragmento del mismo, como marcador:

- a) para la determinación del riesgo de padecer EA,
- b) para determinar la presencia de una EA, o
- c) para predecir la progresión de una EA.

El producto de expresión puede codificar para una secuencia aminoacídica al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% idéntica a SEQ ID NO: 1 o a un fragmento de la misma.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 50% de identidad con SEQ ID NO: 1, o de un fragmento de la misma, como marcador:

- a) para la determinación del riesgo de padecer EA,
- b) para determinar la presencia de una EA, o
- c) para predecir la progresión de una EA.

La secuencia aminoacídica es al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% idéntica a SEQ ID NO: 1 o a un fragmento de la misma.

En una realización preferida, la secuencia aminoacídica tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma. En una realización más preferida, la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1 o de un fragmento de SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende cebadores y/o sondas que hibridan con la secuencia de un gen α -1-antiquimotripsina que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 50% o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, o que codifica para SEQ ID NO: 1, para determinar el riesgo de padecer EA o para determinar la presencia de una EA o para predecir la progresión de una EA, en una muestra biológica aislada.

El término “cebadores” se refiere a los oligonucleótidos con secuencias nucleotídicas idénticas o complementarias reversas que permitan la amplificación de algún fragmento del gen α -1-antiquimotripsina mediante, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El término “cebador” se refiere a secuencias de entre 15-30 nucleótidos que hibridan con una de las cadenas del ácido nucleico molde y permiten la amplificación de una secuencia de ADN mediante una reacción de PCR. El término “sonda” se refiere a una secuencia de ARN o ADN idéntica o complementaria reversa a la secuencia del gen α -1-antiquimotripsina, capaz de hibridar con dicha secuencia y que puede estar marcada o no con cualquier compuesto marcador conocido en el estado de la técnica.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende anticuerpos capaces de unirse a una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 50% o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO:1, o que codifica para SEQ ID NO: 1, o a un fragmento de la misma, para determinar el riesgo de padecer EA o para determinar la presencia de una EA o para predecir la progresión de una EA, en una muestra biológica aislada.

El término “anticuerpo”, tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio

de unión y fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con una proteína. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE).

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

Descripción de las figuras

15 Figura 1. A) Muestra una imagen representativa de un gel bidimensional de tejido de válvulas aórtica realizado mediante 2D-DIGE y posteriormente teñido con plata. Rodeado por un círculo se muestra la mancha proteica cuya expresión varía al comparar pacientes con EA con individuos sanos. B) Muestra un esquema en 3 dimensiones de la variación de la expresión de la proteína resaltada en (A) entre individuos con EA e individuos controles.

20 Figura 2. A) Muestra una inmunohistoquímica de válvulas aórticas sanas y estenóticas contra α -1-antiquimotripsina. Se utilizaron criosecciones de $6 \mu\text{m}$ de tejido de válvulas con EA y de tejido de válvulas sanas. Los resultados muestran una mayor expresión de α -1-antiquimotripsina en los cortes de válvulas con EA al ser comparados con válvulas sanas. Como control negativo se realizó una inmunohistoquímica sin incubación con el anticuerpo contra la α -1-antiquimotripsina. B) Muestra el número de células positivas para α -1-antiquimotripsina por μm^2 en tejido de válvula aórtica control frente a tejido de válvula aórtica estenótica: el número de células que expresan α -1-antiquimotripsina es significativamente superior en el tejido de válvula aórtica estenótica.

25 Figura 3. Muestra unos *immunoblots* donde se confirma una mayor expresión de α -1-antiquimotripsina en muestras procedentes de pacientes con EA en comparación con pacientes control. A) Electroforesis bidimensional de muestras de tejido de válvula aórtica de pacientes con EA y de individuos control. En el mareaje contra la α -1-antiquimotripsina se detectó una mancha proteica de 70 kDa sobre-expresada en pacientes con EA frente a individuos sanos. Representación gráfica de la cantidad de proteína en la muestra control (C) y en la muestra de pacientes con EA (EA) en unidades arbitrarias. B) *Immunoblot* contra la α -1-antiquimotripsina en 4 muestras de secretomas control (C1-C4) y 4 de secretomas de pacientes con EA (P1-P4). Representación gráfica de la cantidad de proteína en las muestras control (C) y en las de pacientes con EA (EA) en unidades arbitrarias y “valor p” de la prueba estadística t de Student. C) *Immunoblot* contra la α -1-antiquimotripsina en 4 muestras de plasma control (C1-C4) y 4 de plasma de pacientes con EA (P1-P4). Representación gráfica de la cantidad de proteína en las muestras control (C) y en las de pacientes con EA (EA) en unidades arbitrarias y “valor p” de la prueba estadística t de Student.

30 Figura 4. A) Muestra los cromatogramas de MRM donde se observan las transiciones más características para cada uno de los dos péptidos proteotípicos seleccionados de la α -1-antiquimotripsina. B) Muestra la representación gráfica de los valores de media y desviación estándar para cada transición correspondiente a tres inyecciones independientes de cada muestra en el espectrómetro de masas 4000-Qtrap (Applied Biosystems). C). Muestra la representación gráfica de los resultados de la cuantificación mediante MRM para cada una de las transiciones monitorizadas. “P” son pacientes y “C” controles.

Ejemplos

35 Los siguientes ejemplos, que ilustran pero no limitan la presente invención, describen unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad de la α -1-antiquimotripsina como biomarcador de la EA.

55 Ejemplo 1

Detección y cuantificación de α -1-antiquimotripsina en muestras de pacientes con EA y de individuos control

Selección de sujetos para el estudio

60 Las válvulas aórticas estenóticas (n=20) fueron obtenidas de pacientes de ambos sexos (55% hombres, 45% mujeres) con una edad media $74 \pm 3,9$ años que fueron sometidos a reemplazo valvular por estenosis aórtica (EA) degenerativa. Todos los pacientes (100%) presentaban hipertensión, el 50% tenían hiperlipemia y un 60%, diabetes. La cirugía fue realizada según las guías de práctica clínica habituales. La enfermedad arterial coronaria estaba presente en el 60% de los sujetos incluidos en el estudio. Aquellos pacientes con insuficiencia aórtica, enfermedad de la válvula mitral o cualquier sospecha de enfermedad reumática no fueron incluidos en el estudio (Tabla 1).

TABLA 1

Características clínicas de los individuos del grupo control

Paciente	Edad	Sexo	Causa muerte	Estado válvulas
1	64	H	bronconeumonía aguda bilateral	normal
2	51	M	shock séptico	normal
3	47	H	sepsis	normal
4	47	M	neumonía bacteriana	normal
5	47	M	carcinomatosis	normal
6	34	H	pancreatitis aguda	normal
7	64	M	sepsis bacteriana	normal
8	78	M	bronconeumonía aspirativa	normal
9	76	H	sepsis y bronconeumonía	normal
10	66	H	bronconeumonía bilateral	normal

Las válvulas aórticas de sujetos controles fueron obtenidas en las autopsias de individuos fallecidos por enfermedades no cardiovasculares, sin enfermedad coronaria o diabetes *mellitus* y cuyas válvulas aórticas presentaban un aspecto macroscópicamente normal (n = 20). (Tabla 2).

TABLA 2

Características clínicas de los individuos con estenosis aórtica

Característica	% Pacientes
Edad	75 ± 3,93
Sexo (H/M)	55/45
HTA	76,16
Diabetes	33,00
Dislipemia	52,51

El estudio fue realizado de acuerdo a las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Virgen de la Salud (Toledo, España). El consentimiento informado fue obtenido de todos los sujetos incluidos en el estudio.

Preparación de las muestras de tejido para análisis proteómico

Las válvulas con EA fueron procesadas en un plazo máximo de 2 horas desde que se realizó la cirugía, manteniéndose el tejido a 4°C en medio RPMI. Se lavaron 3 veces con tampón fosfato para reducir los contaminantes de sangre. Las válvulas controles fueron procesadas en un tiempo máximo de 8 horas desde el fallecimiento del individuo. Para realizar la extracción proteica, un fragmento de válvula fue congelado en nitrógeno líquido y homogeneizado con mortero. Entre 0,1-0,3 g del polvo obtenido fue resuspendido en 400 µl de tampón de extracción de proteína (10 mM

ES 2 370 671 A1

Tris pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1% Tritón X-100, el 1% β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF). El homogeneizado fue centrifugado a 21.000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante (E1), con la mayor parte de las proteínas solubles, fue recogido y almacenado a -20°C. El *pellet* fue solubilizado en tampón de lisis (7 M Urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS) y centrifugado de nuevo a 21.000 g. Este segundo sobrenadante (E2) estaba enriquecido en proteínas hidrofóbicas, principalmente proteínas de membrana. Los restos celulares y los lípidos fueron eliminados. Ambos extractos proteicos E1 y E2 fueron analizados conjuntamente para el análisis de electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE). La concentración de proteínas fue determinada mediante el método Bradford-Lowry.

Electroforesis bidimensional (2-DE)

Los extractos de proteínas fueron resuspendidos en tampón de rehidratación (7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 1% TBP, 2% anfolitos) y aplicados a tiras IPG de pH 4-7. El isoelectroenfoque (IEF) fue desarrollado horizontalmente y a una temperatura constante de 20°C. Una vez finalizado el IEF, las tiras fueron equilibradas para facilitar el paso de las proteínas a la segunda dimensión. La separación proteica fue realizada atendiendo al peso molecular en geles SDS-PAGE al 12%, utilizando sistema Protean II (Bio-Rad) a 25 mA/gel a 4°C. A continuación, los geles fueron teñidos con plata. Este protocolo es compatible con la espectrometría de masas. Por último, los geles fueron escaneados con el Densitómetro Calibrado GS-800 (Bio-Rad).

Electroforesis bidimensional diferencial (DIGE)

Mareaje de las muestras

Las muestras fueron marcadas según las instrucciones de la casa comercial (GE Healthcare, Piscataway, NJ), 50 μ g de extracto proteico de válvulas aórticas estenóticas y 50 μ g de extracto proteico de válvulas aórticas control fueron marcados con 400 pmol (1 μ l) del fluorocromo correspondiente, Cy3 ó Cy5, según el diseño experimental. Además, un control interno con todas las muestras del experimento fue preparado poniendo en un único tubo 50 μ g de cada una de las muestras y marcando la mezcla con Cy2. Las muestras fueron incubadas en hielo durante 30 minutos en la oscuridad para permitir la reacción de mareaje. Dicha reacción fue detenida añadiendo 1 μ l de lisina 10 mM por cada 50 μ g de muestra e incubando de nuevo en hielo durante 10 minutos y en la oscuridad.

Electroforesis bidimensional

Una vez las muestras fueron marcadas, la muestra de válvula estenótica, la muestra de válvula control y el mancomunado de todas las muestras objeto del experimento fueron mezcladas (150 μ g de proteína total), según diseño experimental, diluidas en tampón de rehidratación (30 mM TRIS, 7 mM urea, 2M tiourea, CHAPS 4%) y aplicadas a las tiras IPG de 24 cm pH 4-7. La primera dimensión fue realizada en el sistema IPGphor III System (GE Healthcare) siguiendo el siguiente programa de IEF: 500 V durante 30 minutos, 1000 V durante 1 h, 2000 V en 1 h en gradiente lineal, 5000 V en 2 h en gradiente lineal, 8000 V en 1 h en gradiente lineal, y de 8000 V hasta 88000 v/h. Después de la primera dimensión, las tiras fueron equilibradas con tampón de equilibrado (TriCl pH 8,8 1,5 M, 6M urea, 87% glicerol, 2% SDS). Posteriormente, las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE al 12% de acrilamida/bisacrilamida.

Captura y análisis de imágenes

Los geles en SDS-PAGE fueron escaneados utilizando el Typhoon 9400 (Typhoon 9400 Variable Mode Imager, GE Healthcare) aplicando las longitudes de onda de excitación y emisión específicas de cada fluorocromo, filtros y valores de sensibilidad del fotomultiplicador (PTM) para cada fluorocromo, Cy3, Cy5 y Cy2 (valores PTM; 480 V, 490 V, 500 V, respectivamente) (Figura 1A).

La cuantificación proteica relativa en las muestras de válvulas estenóticas y sanas fue realizada a través del programa DeCyder v6.5 (Figura 1B) y con el módulo estadístico multivariante EDA (del inglés, “*Extended data analysis*”) mediante el módulo DIA (del inglés, “*Differential in-gel analysis*”), que detecta y cuantifica las manchas proteicas de las tres imágenes correspondientes a cada gel. El algoritmo que emplea este módulo para la detección de las manchas se basa en la co-detección de las tres señales fluorescentes (2 muestras y 1 control interno) y permite diferenciar las verdaderas manchas proteicas de los artefactos del gel. Por otra parte, la cuantificación se basa en el cálculo de las relaciones Cy3/Cy2 y Cy5/Cy2, lo que permite tener un valor de intensidad normalizado para cada mancha.

Una vez completada esta fase, los datos generados mediante DIA fueron importados al módulo BVA (del inglés, “*Biological Variation Analysis*”), para el emparejamiento de las manchas detectadas entre las imágenes de los diferentes geles del estudio para obtener después datos estadísticos sobre los niveles de expresión de las manchas en los diferentes grupos de estudio. Se puede concluir que existe variación cuando los niveles de expresión de las proteínas están alterados más de 1,5 veces y dicha variación se considera estadísticamente significativa cuando se encuentra dentro del intervalo de confianza del 95% (valor $p < 0.05$) determinado por la prueba t-Student.

ES 2 370 671 A1

Finalmente, un análisis multivariante a través del Análisis de Componentes Principales (PCA) fue realizado utilizando el algoritmo incluido en el módulo EDA del programa DeCyder v 6.5, basado en las manchas proteicas que son emparejadas en todos los geles. El análisis jerárquico fue realizado utilizando el coeficiente de Pearson, basado en las manchas proteicas que se encontraban en el 90% de los geles del estudio. Los geles fueron teñidos con solución de plata (GE-Healthcare) después de ser escaneados.

Identificación de proteínas por MALDI TOF/TOF

Las manchas proteicas diferencialmente expresadas fueron recortadas de los geles manualmente, digeridas automáticamente usando el “*Ettan Digester*” (GE Healthcare) e identificadas. Los fragmentos del gel fueron reducidos utilizando 10 mM dithiothreitol (DTT) en bicarbonato amónico 50 mM (99% pureza) y alquilados con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Los fragmentos de gel fueron entonces lavados con bicarbonato amónico 50 mM, metanol al 50% (para HPLC) y acetonitrilo (para HPLC) tras lo cual fueron secados en “*speedvac*” (Thermo Fisher). Se añadió tripsina modificada de cerdo a una concentración final de 20 ng/ μ l en bicarbonato amónico 20 mM a los fragmentos de gel que fueron digeridos durante la noche a 37°C. Finalmente, la extracción peptídica fue realizada en acetonitrilo al 60% en agua y 0,1% de ácido fórmico (99,5% pureza).

Una vez finalizada la digestión, una alícuota de cada reacción fue mezclada con una alícuota de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 50% y 0,1% de ácido trifluoroacético. La mezcla fue depositada en capa fina en una placa del espectrómetro 384 Opti-TOF 123x81 mm MALDI (Applied Biosystems) y secada a temperatura ambiente. Los datos de MALDI-MS/MS fueron obtenidos en modo automático utilizando un espectrómetro de masas 4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems) (MALDI, del inglés “*matrix assisted laser desorption ionization*”; TOF, del inglés “*time of flight*”).

Los espectros fueron adquiridos en modo ión-positivo con un láser Nd:YAG de 355 nm de longitud de onda, a una frecuencia de 200 Hz. De 100-2000 espectros individuales fueron obtenidos. Para el análisis de fragmentos de iones en modo de tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados en la puerta de entrada de iones. Los fragmentos generados por colisión de los precursores con aire (CID, del inglés “*collision-induced dissociation*”) en la cámara de colisión fueron además acelerados a 15 kV en la fuente 2 y sus masas fueron analizadas después de pasar por el reflector de iones. El análisis automático de los datos de masas fue realizado usando el programa informático “4000 Series Explorer” versión 3.5.3 (Applied Biosystems). La calibración interna de los espectros de masas del MALDI-TOF fue realizada usando 2 iones de la autólisis de tripsina ($m/z = 842,510$ y $m/z = 2211,105$, respectivamente). Para las calibraciones del MALDI-MS/MS, fueron utilizados los espectros de iones fragmento obtenidos del “Glub-fibrinopeptide” (4800MALDI/TOF-TOF, Applied Biosystem). Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa “GPS Explorer” versión 3.6, que permite la realización de búsquedas no redundantes en la base de datos de proteínas Swissprot 56.2 usando el programa Mascot versión 2.2 (Matrix science), con una tolerancia de masas de 50 ppm y permitiendo la pérdida de un lugar de corte. Los espectros MALDI-MS/MS y las búsquedas fueron revisadas manualmente en detalle usando este programa.

Ejemplo 2

Detección y cuantificación de α -1-antiquimotripsina por inmunoblot

Anticuerpos

El anticuerpo contra α -1-antiquimotripsina con referencia ab9374 de Abcam fue utilizado para realizar la inmunohistoquímica (Fig. 2) y los *immunoblots* (Fig. 3).

Preparación de las muestras de secretoma para el estudio proteómico

Para el estudio del secretoma, una valva de las válvulas con EA y una valva de las válvulas control fueron disecadas y cultivadas por separado en medio RPMI libre de aminoácidos y suplementado con arginina y lisina marcadas, a 37°C.

Las muestras de medio de cultivo fueron recogidas a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas para encontrar el tiempo de máxima secreción proteica. Dicho tiempo resultó ser a 96 horas.

Preparación de las muestras de plasma para análisis proteómico

Aproximadamente 28 ml de sangre fueron extraídos de cada paciente o individuo control en tubos estériles con EDTA. La sangre fue centrifugada a 750 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener el plasma, que fue dividido en partes alícuotas y almacenado a - 80°C.

Inmunodetección

La electroforesis unidimensional de proteínas obtenidas a partir de muestras de válvulas aórticas estenóticas y control (Figura 3A) y de muestras del secretoma de dichas válvulas (Figura 3B) y de muestras de plasma sanguíneo de los pacientes con EA y controles (Figura 3C), fue realizada en geles SDS-PAGE al 12% utilizando el sistema de electroforesis Miniprotein II de Bio-Rad, aplicando un voltaje inicial de 80 V durante 5-10 minutos, seguido de un voltaje constante de 25 mA durante 1 hora. Después del SDS-PAGE las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante transferencia semiseca durante 40 minutos a 20 V, utilizando el siguiente tampón de transferencia: Tris 25 mM, Glicina 151,8 mM y metanol al 20% (v/v). A continuación, las proteínas fueron teñidas sumergiendo las membranas de nitrocelulosa en una solución de Rojo Ponceau al 0,2% en ácido tricloroacético 30% (p/v) y ácido sulfosalicílico al 30% (p/v) durante 1 minuto, tras lo cual las membranas fueron lavadas con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Una imagen digitalizada de cada membrana fue tomada con el densitómetro calibrado GS-800. Las proteínas fueron bloqueadas utilizando un tampón fosfato con Tween20 0,1% (v/v) y con leche en polvo desnatada 7,5% (p/v) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos en un tampón fosfato con Tween20 0,1% (v/v). A continuación, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo específico contra α -1-antiquimiotripsina, diluido 1:1.000 en el tampón de lavado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada. Tras realizar otros 3 lavados de 10 minutos en el tampón de lavado, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (anticuerpo anti-conejo desarrollado en cabra y unido a la peroxidasa), diluido 1:5.000 en tampón de lavado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada. Finalmente, tras otros 3 lavados de 10 minutos, las membranas fueron reveladas utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL (GE Healthcare). Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas realizando una densitometría de cada una de ellas y restando el ruido de fondo mediante el programa Quantity One 4.6.5. Los resultados obtenidos, medidos en intensidad-mm², fueron analizados con el programa informático de análisis estadístico GraphPad Prism 4.0, mediante una prueba T no paramétrica para determinar diferencias significativas con valores $p < 0,05$.

Ejemplo 3

Inmunohistoquímica contra α -1-antiquimiotripsina en tejido de válvula aórtica sana y estenótica

Inmunohistoquímica

Se utilizaron secciones de tejido, tanto de válvulas aórticas estenóticas como de válvulas aórticas control, de 6 μ m de grosor fijadas en formalina, previamente descalcificadas en Shandon-TBD1 (Thermo Scientific), embebidas en OCT y congeladas en nitrógeno líquido. Las secciones se bloquearon en tampón fosfato con Tween 20 (0,1%) con BSA al 1% durante 1 hora. Posteriormente, las secciones de tejido fueron incubadas con el anticuerpo primario 1 hora a temperatura ambiente. Por último, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario IgG-HRP-conjugado. El revelado fue realizado añadiendo el cromógeno 3-3 diaminobenzidina. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y deshidratados en un gradiente de alcoholes (70%, 95%, alcohol absoluto). Finalmente, los cortes fueron lavados en xilol y montados con el medio de montaje DPX, para sellar las láminas de vidrio con el tejido. Como control negativo, todo el procedimiento completo de inmunohistoquímica fue realizado en ausencia del anticuerpo primario (Figura 2).

Ejemplo 4

Detección y cuantificación de α -1-antiquimiotripsina en muestras de plasma de válvulas aórticas de pacientes con EA y de individuos control

MRM (“Multiple Reaction Monitoring”)

Las proteínas de las muestras de plasma fueron reducidas y alquiladas con DTT 100 mM en bicarbonato amónico 50 mM durante 30 minutos a 37°C, seguido de iodoacetamida 550 mM en bicarbonato amónico 50 mM a temperatura ambiente y en oscuridad durante otros 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadió 60% bicarbonato amónico 50 mM y 15% acetonitrilo a las muestras y, a continuación, una solución de tripsina porcina modificada (1 μ g/ μ l) con una relación 1 μ g tripsina/50 μ g proteína fue añadida. La digestión fue incubada a 37°C durante un mínimo de 6 horas (generalmente, durante toda la noche). La reacción fue detenida añadiendo 2% ácido fórmico y las muestras fueron limpiadas utilizando micro columnas de centrífuga (spin-columns) con resina C18 (Pep-Clean, Pierce). El digerido triptico fue secado a vacío en centrífuga “speed-vac” y resuspendido en una solución 2% acetonitrilo con 2% ácido fórmico.

El sistema LC-MS/MS está formado por un sistema nano-LC TEMPO (Applied Biosystems) combinado con un *nano-autosampler*. Tres inyecciones de cada digerido (2 μ g en cada inyección) fueron realizadas usando fase móvil A (2% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico) con un flujo de 10 μ l/minuto durante 5 minutos. Los péptidos fueron cargados así en una pre-columna C18 para pre-concentrar y desalar las muestras. A continuación, los péptidos fueron separados mediante nanocromatografía de fase reversa en una columna capilar de C18, usando fase móvil A (2% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico) y fase móvil B (98% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico), con un flujo de 300 nl/minuto, aplicando el siguiente gradiente: 2-15% B en los 2 primeros minutos, incrementando a 50% B durante los 38 minutos siguientes,

ES 2 370 671 A1

50-90% B en 2 minutos, manteniendo 95% B durante 3 minutos, volviendo en 1 minuto a condiciones iniciales (2% B) y manteniéndolas durante 14 minutos más. El análisis LC-MS/MS fue realizado en un equipo híbrido de tipo triple cuadrúpolo/trampa de iones lineal AB/MDS Sciex 4000 Q TRAP con fuente NanoSprayII (Applied Biosystems). Tanto este sistema como el sistema nano-LC TEMPO se controlan mediante el software Analyst v.1.4.2. La adquisición fue realizada en modo positivo, con un voltaje de ionización de 2800 V, con un “gas cortina” de 10, un “gas nebulizador” de 20 y una “temperatura de interfaz” de 150°C. El nitrógeno fue utilizado tanto en el caso del gas de colisión como en el del “gas cortina”. Las transiciones MRM fueron optimizadas para obtener una transmisión y una sensibilidad máximas. Los parámetros fueron optimizados para cada una de las transiciones y se resumen en la Tabla 3. Un total de 3 transiciones MRM (fragmentos diagnósticos) por péptido fueron monitorizadas para cada muestra individual, y con tres réplicas por muestra (Tabla 4, Figura 4A).

TABLA 3

Péptidos proteotípicos y transiciones analizados por MRM

PROTEINA	Código de acceso	Péptido	Secuencia	Q1	Q3 (T1)	Q3 (T2)	Q3 (T3)
Alfa-1-antiquimotripsina	AACT_HUMAN	AACT_1	ITLLSALVETR	608,37	688,4	775,43	888,51
Alfa-1-antiquimotripsina	AACT_HUMAN	AACT_2	LYGSEAFATD FQDSAAAK	946,44	1053,4	1124,5	1271,5

Debido a la complejidad de la muestra y para maximizar la especificidad, se utilizó una resolución de “unidad” en el primer y tercer cuadrúpulos (Q1 y Q3). Un “tiempo de permanencia” (*dwell time*) de 50 ms fue empleado. Durante este tiempo, los cuadrúpulos monitorizan cada una de las transiciones, cíclicamente. Las abundancias fueron obtenidas en base a las áreas de los picos cromatográficos (Figura 4B), que fueron calculadas como integral bajo la curva definida por cada pico usando el algoritmo IntelliQuant, incluido en el software Analyst 1.4.2. Dichas áreas fueron importadas al programa SPSS, donde fueron realizadas las comparaciones estadísticas correspondientes (Figura 4C, Tabla 4).

TABLA 4

Resultados de la cuantificación mediante MRM y análisis estadístico de los datos obtenidos para cada una de las transiciones monitorizadas

	Controles		Pacientes		Mann-Whitney U
	Media	Desv. Estándar	Media	Desv. Estándar	Valor p
AACT_1_T1	22938,09	33345,90	418327,08	693093,38	0,064957265
AACT_1_T2	77287,36	117790,78	1395650,78	2296282,07	0,04988345
AACT_1_T3	42469,24	64666,08	792452,81	1302423,44	0,064957265
AACT_2_T1	32992,15	28726,46	77826,88	32231,67	0,01041181
AACT_2_T2	42504,96	41674,52	97227,83	40853,41	0,01041181
AACT_2_T3	31132,20	25199,84	75803,50	28997,80	0,006993007

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de datos útiles para la determinación de la estenosis aórtica (EA) o del riesgo de padecer EA o de la evolución de una EA que comprende:
- a) obtener una muestra biológica aislada de un sujeto, y
 - b) detectar y/o cuantificar el producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen α -1-antiquimotripsina que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 50% de identidad con SEQ ID NO: 1, en la muestra obtenida en el paso (a).
2. Método según la reivindicación 1, donde el producto de expresión detectado y/o cuantificado en el paso (b) es de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el producto de expresión detectado y/o cuantificado en el paso (b) es de una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que además comprende comparar los datos obtenidos en (b) con unos valores estándar para encontrar una desviación significativa.
5. Método según la reivindicación 4 que además comprende atribuir la desviación significativa a la presencia de EA o al riesgo de padecer EA en el sujeto de (a).
6. Método según las reivindicaciones 1-5, donde la muestra biológica del paso (a) es un fluido biológico.
7. Método según las reivindicaciones 1-6, donde el fluido biológico es sangre o suero o plasma sanguíneo.
8. Método según las reivindicaciones 1-6, donde la muestra biológica del paso (a) comprende células.
9. Método según las reivindicaciones 1-6, donde la muestra biológica del paso (a) comprende un tejido.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el producto de expresión, de la secuencia nucleotídica del gen α -1-antiquimotripsina es una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 50% o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 1.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el producto de expresión es detectado por PCR.
12. Método según la reivindicación 10, donde la secuencia aminoacídica es detectada por electroforesis, inmunoensayo, cromatografía, tecnología de *microarrays* y/o espectrometría de masas.
13. Método según la reivindicación 12 donde la secuencia aminoacídica es detectada por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.
14. Uso del producto de expresión del gen de la α -1-antiquimotripsina como marcador:
- a) para la determinación del riesgo de padecer EA,
 - b) para determinar la presencia de una EA, o
 - c) para predecir la progresión de una EA.
15. Uso de una secuencia aminoacídica de la proteína α -1-antiquimotripsina que tiene al menos un 50% de identidad con SEQ ID NO: 1, como marcador:
- a) para la determinación del riesgo de padecer EA,
 - b) para determinar la presencia de una EA, o
 - c) para predecir la progresión de una EA.
16. Uso según la reivindicación 15, donde la secuencia aminoacídica de la proteína α -1-antiquimotripsina tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1.
17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, donde la secuencia aminoacídica de la proteína α -1-antiquimotripsina es SEQ ID NO: 1.

ES 2 370 671 A1

18. Uso de un kit que comprende cebadores y/o sondas que hibridan con la secuencia de un gen α -1-antiquimotripsina que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 50% o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, o que codifica para SEQ ID NO: 1, para determinar el riesgo de padecer EA o para determinar la presencia de una EA o para predecir la progresión de una EA, en una muestra biológica aislada.

5

19. Uso de un kit que comprende anticuerpos capaces de unirse a una secuencia aminoacídica de la α -1-antiquimotripsina que tiene al menos un 50% o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, o que codifica para SEQ ID NO: 1, para determinar el riesgo de padecer EA o para determinar la presencia de una EA o para predecir la progresión de una EA, en una muestra biológica aislada.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

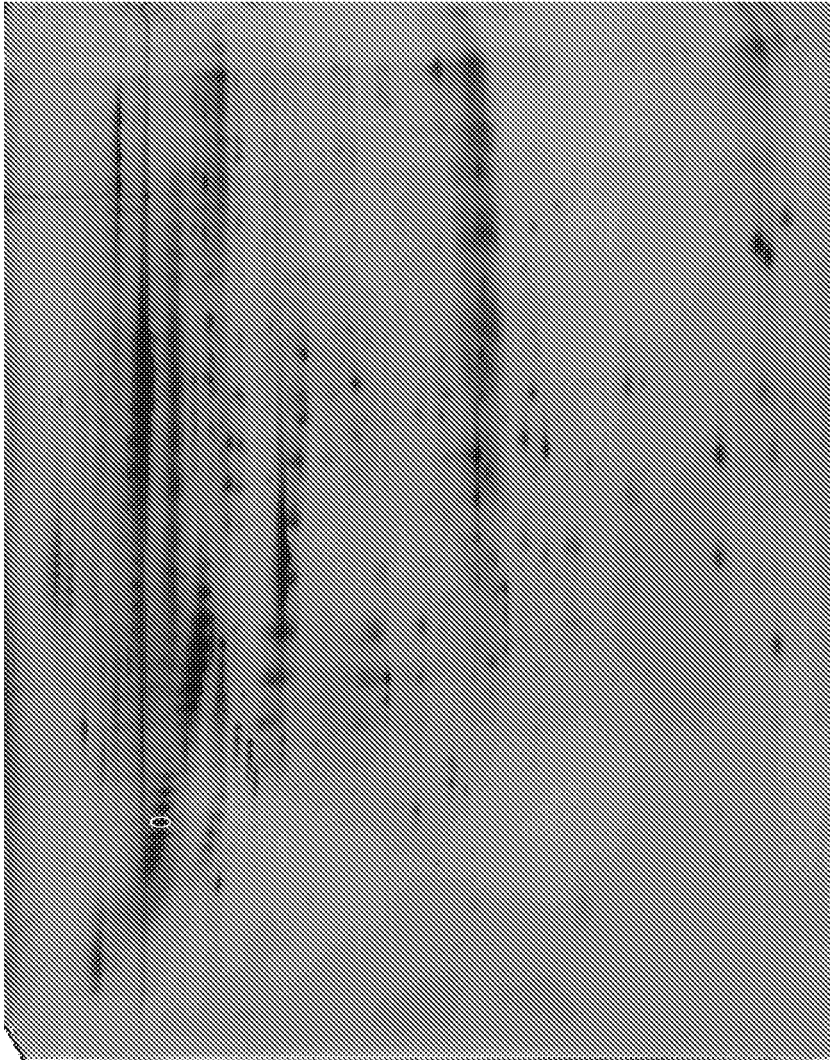
55

60

65

FIG. 1

A.



B.

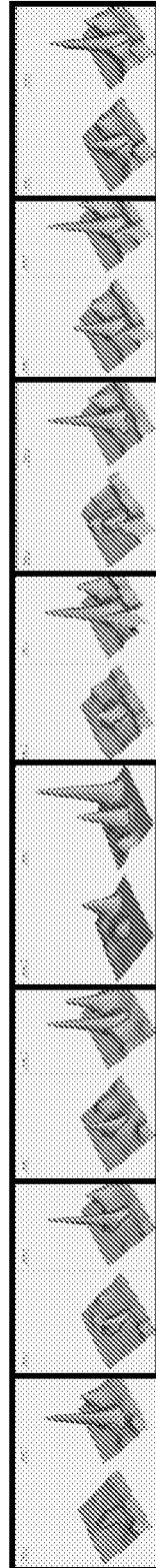
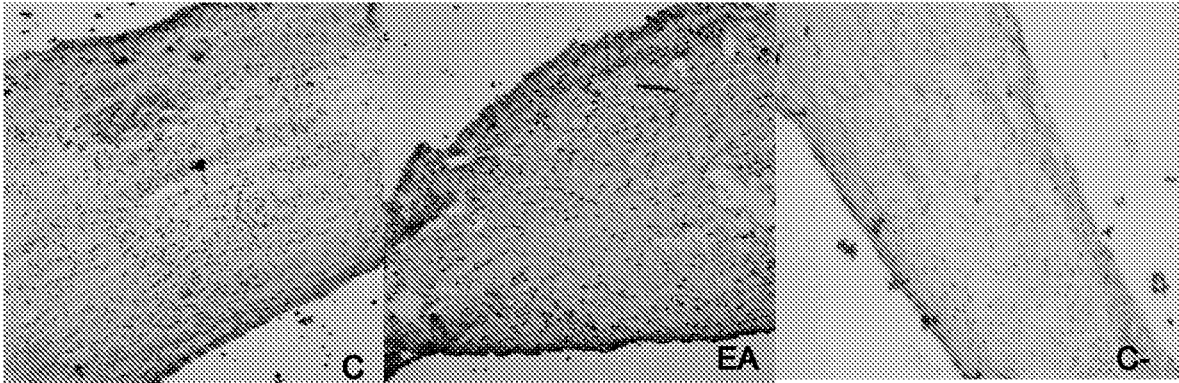


FIG. 2

A.



B.

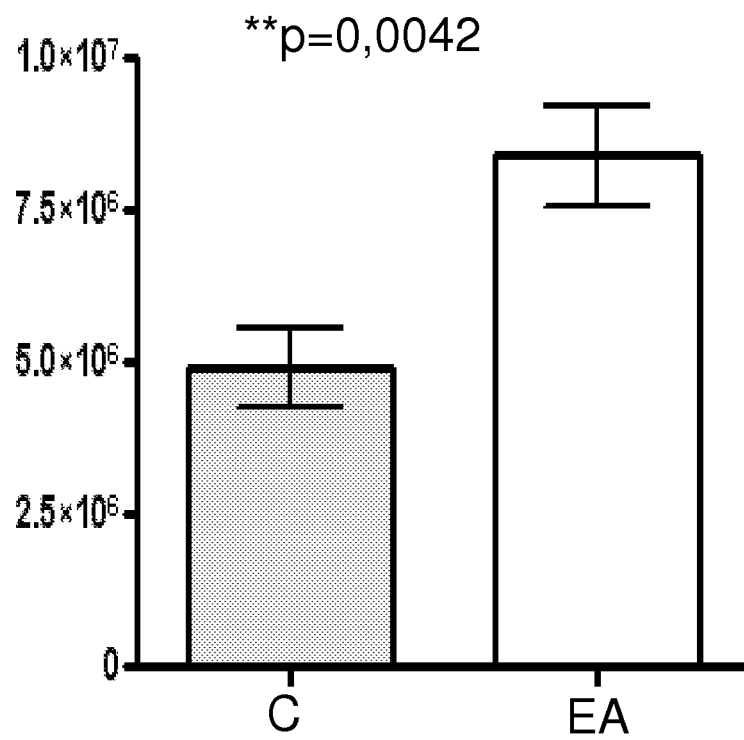
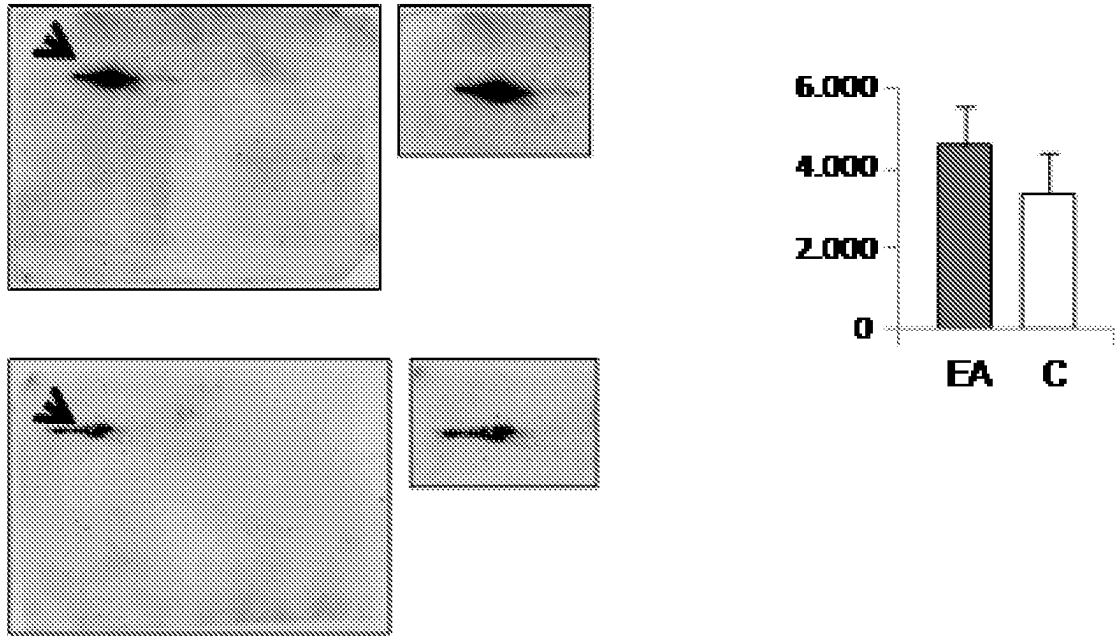
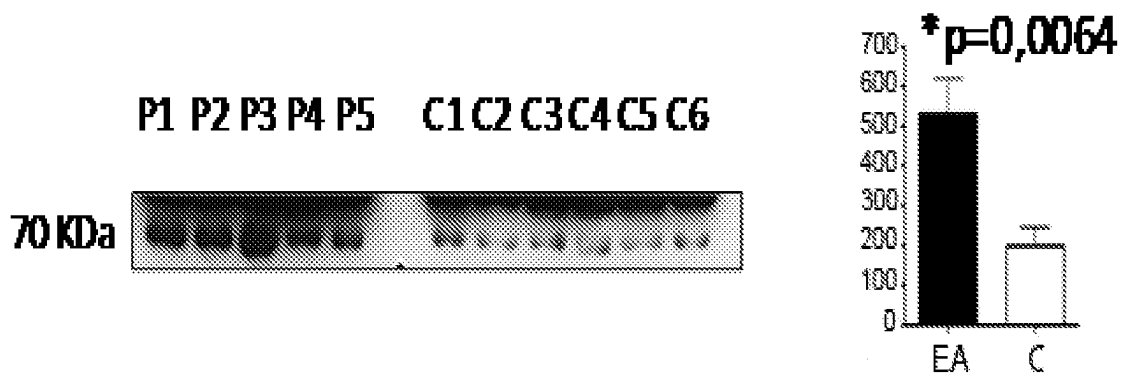


FIG. 3

A.



B.



C.

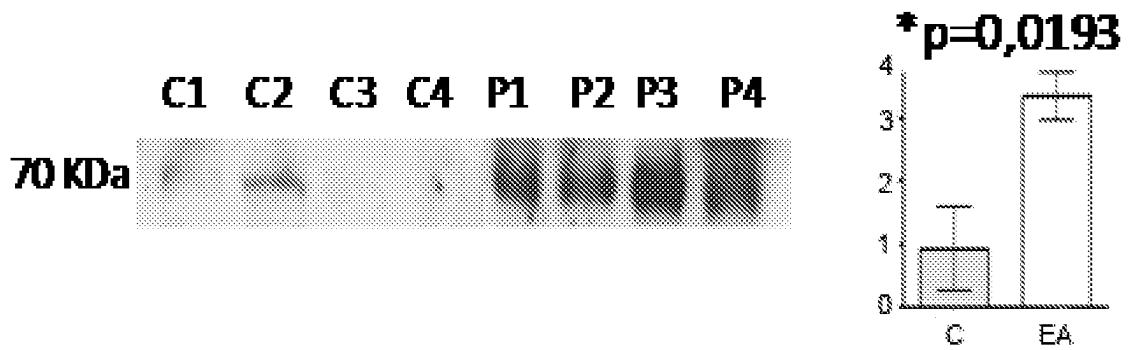
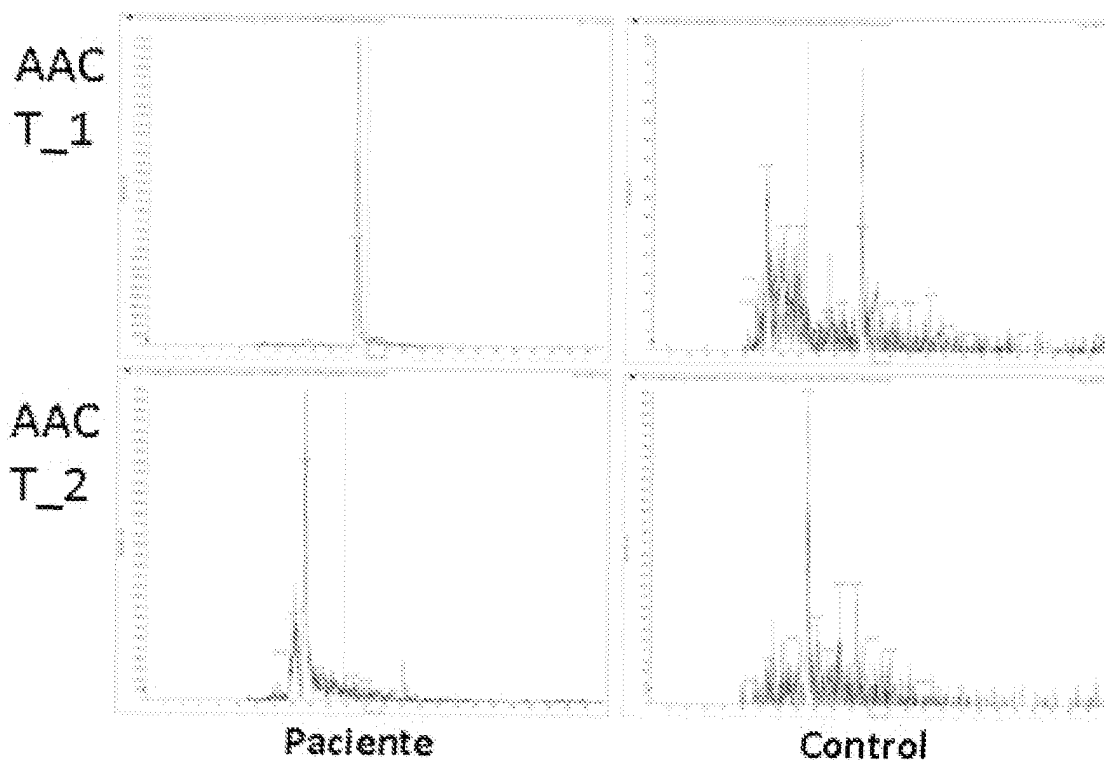
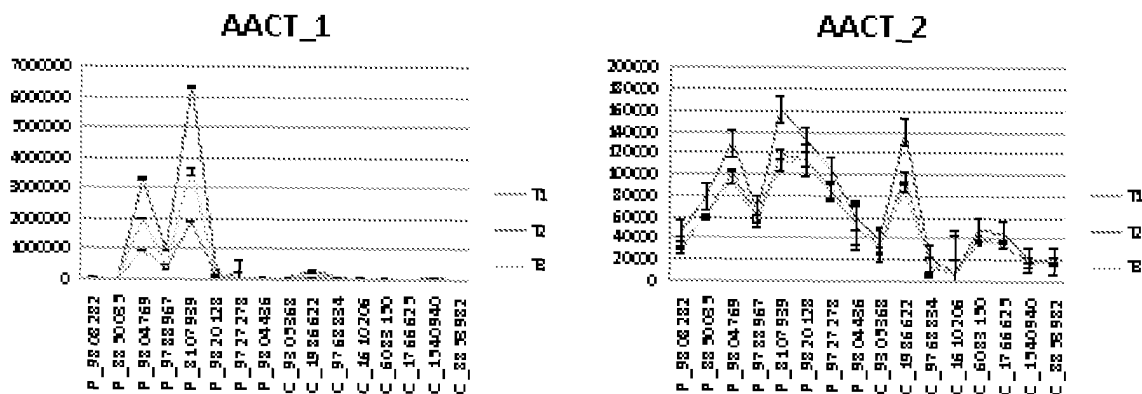


FIG. 4

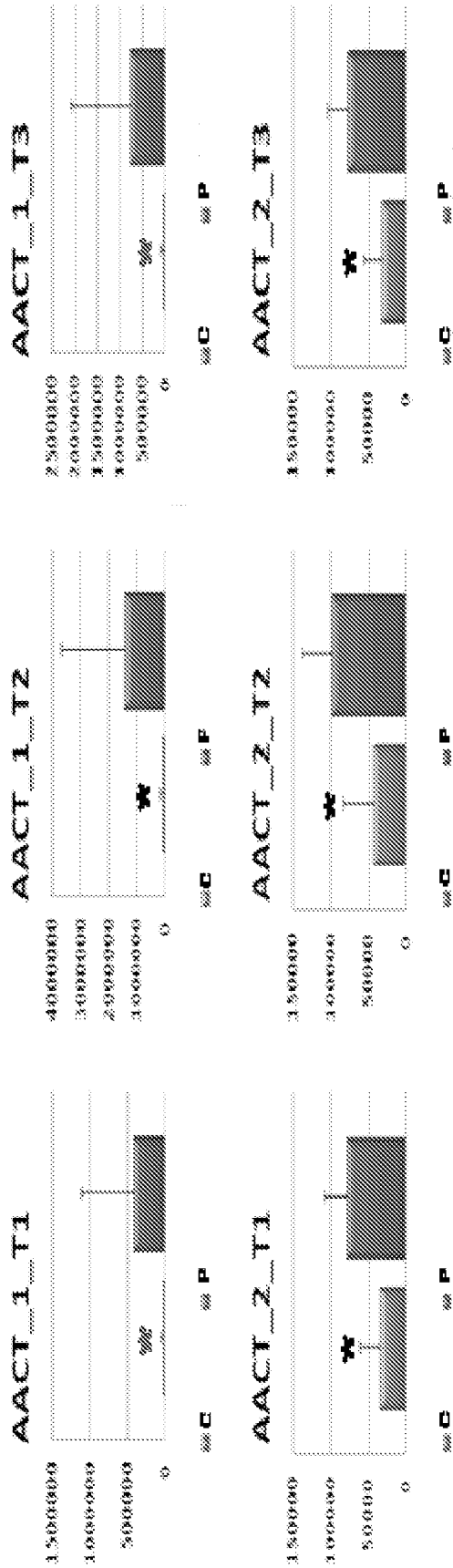
A.



B.



C.



ES 2 370 671 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> FUHNPAIIN

5 <120> Método de pronóstico y diagnóstico de la estenosis aórtica que comprende la α -1-antiquimiotripsina como marcador

<130> 2145.5

10

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 423

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

25

Met Glu Arg Met Leu Pro Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Ala Gly
1 5 10 15

30

Phe Cys Pro Ala Val Leu Cys His Pro Asn Ser Pro Leu Asp Glu Glu
20 25 30

Asn Leu Thr Gln Glu Asn Gln Asp Arg Gly Thr His Val Asp Leu Gly
35 40 45

35

Leu Ala Ser Ala Asn Val Asp Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Lys Gln Leu
50 55 60

40

Val Leu Lys Ala Pro Asp Lys Asn Val Ile Phe Ser Pro Leu Ser Ile
65 70 75 80

Ser Thr Ala Leu Ala Phe Leu Ser Leu Gly Ala His Asn Thr Thr Leu
85 90 95

45

Thr Glu Ile Leu Lys Gly Leu Lys Phe Asn Leu Thr Glu Thr Ser Glu
100 105 110

50

Ala Glu Ile His Gln Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln
115 120 125

Ser Ser Asp Glu Leu Gln Leu Ser Met Gly Asn Ala Met Phe Val Lys
130 135 140

55

Glu Gln Leu Ser Leu Leu Asp Arg Phe Thr Glu Asp Ala Lys Arg Leu
145 150 155 160

Tyr Gly Ser Glu Ala Phe Ala Thr Asp Phe Gln Asp Ser Ala Ala Ala
165 170 175

60

Lys Lys Leu Ile Asn Asp Tyr Val Lys Asn Gly Thr Arg Gly Lys Ile
180 185 190

65

Thr Asp Leu Ile Lys Asp Leu Asp Ser Gln Thr Met Met Val Leu Val

ES 2 370 671 A1

	195	200	205
5	Asn Tyr Ile Phe Phe Lys 210	Ala Lys Trp Glu Met 215	Pro Phe Asp Pro Gln 220
10	Asp Thr His Gln Ser Arg 225	Phe Tyr Leu Ser Lys 230	Lys Lys Trp Val Met 235 240
15	Val Pro Met Met Ser 245	Leu His His Leu Thr 250	Ile Pro Tyr Phe Arg Asp 255
20	Glu Glu Leu Ser Cys Thr Val Val 260	Glu Leu Lys Tyr Thr 265	Gly Asn Ala 270
25	Ser Ala Leu Phe Ile Leu Pro 275	Asp Gln Asp Lys Met 280	Glu Glu Val Glu 285
30	Ala Met Leu Leu Pro Glu Thr 290	Leu Lys Arg Trp Arg 295	Asp Ser Leu Glu 300
35	Phe Arg Glu Ile Gly Glu 305	Leu Tyr Leu Pro Lys 310	Phe Ser Ile Ser Arg 315 320
40	Asp Tyr Asn Leu Asn Asp 325	Ile Leu Leu Gln Leu 330	Gly Ile Glu Glu Ala 335
45	Phe Thr Ser Lys Ala Asp 340	Leu Ser Gly Ile Thr 345	Gly Ala Arg Asn Leu 350
50	Ala Val Ser Gln Val Val His 355	Lys Ala Val Leu Asp 360	Val Phe Glu Glu 365
55	Gly Thr Glu Ala Ser Ala 370	Ala Thr Ala Val Lys 375	Ile Thr Leu Leu Ser 380
60	Ala Leu Val Glu Thr Arg 385	Thr Ile Val Arg Phe 390	Asn Arg Pro Phe Leu 395 400
65	Met Ile Ile Val Pro Thr 405	Asp Thr Gln Asn Ile 410	Phe Phe Met Ser Lys 415
70	Val Thr Asn Pro Lys Gln 420	Ala	



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201030759

②² Fecha de presentación de la solicitud: 20.05.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **G01N33/68** (2006.01)
C12N9/76 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20070134814 A1 (E. OLAVI KAJANDER; KATJA M. AHO; NEVA CIFTCIOGLU) 14.06.2007, todo el documento.	1-19
A	GIL-DONES F. et al. "Valvular aortic stenosis: a proteomic insight" Clinical Medicine Insight: Cardiology (4 febrero 2010) vol. 4; páginas 1-7; DOI 10.4137/CMC.S3884; todo el documento.	1-19
A	IMAI K. et al "C-Reactive protein predicts severity, progression and prognosis of asymptomatic aortic valve stenosis" American Heart Journal (octubre 2008) vol. 156; Nº 4; páginas 713-718; DOI 10.1016/j.ahj.2008.04.011; todo el documento.	1-19
A	LIM P. et al "Predictors of outcome in patients with severe aortic stenosis and normal left ventricular function: role of B-type natriuretic peptide" European Heart Journal (2004) vol. 25; Nº: 22; páginas 2048-2053; DOI 10.1016/j.ehj.2004.09.033; todo el documento.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.09.2011

Examinador
M. M. García Coca

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.09.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20070134814 A1 (E. OLAVI KAJANDER; KATJA M. AHO; NEVA CIFTCIOGLU)	14.06.2007
D02	GIL-DONES F. et al "Valvular aortic stenosis: a proteomic insight" Clinical Medicine Insight: Cardiology vol. 4; páginas 1-7; DOI 10.4137/CMC.S3884	04.02.2010
D03	IMAI K. et al "C-Reactive protein predicts severity, progression and prognosis of asymptomatic aortic valve stenosis" American Heart Journal vol. 156; Nº 4; páginas 713-718; DOI 10.1016/j.ahj.2008.04.011	Octubre 2008
D04	LIM P. et al "Predictors of outcome in patients with severe aortic stenosis and normal left ventricular function: role of B-type natriuretic peptide" European Heart Journal (2004) vol. 25; Nº: 22; páginas 2048-2053; DOI 10.1016/j.ehj.2004.09.033	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-19 es un método de obtención de datos útiles para la determinación de la estenosis aórtica (EA), del riesgo de padecer EA o de la evolución de la EA, basado en la detección y/o cuantificación de la proteína α -1-antiquimotripsina (reiv. 1-13). También es objeto de la invención el uso de la proteína α -1-antiquimotripsina como marcador de la EA (reiv. 14-17) y el uso de un kit para llevar a cabo el método de la invención (reiv. 18 y 19).

Novedad y Actividad Inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga métodos y composiciones para detectar, analizar y evaluar la importancia de nanopartículas calcificadas. Los métodos divulgados se basan en la detección de proteínas presentes en dichas nanopartículas, que pueden ser usadas como indicativos no solo de la presencia de dichas nanopartículas, sino también de enfermedades asociadas a dichas proteínas. Entre las proteínas que pueden ser detectadas se encuentra la α -1-antiquimotripsina y entre las enfermedades que pueden ser detectadas se encuentra la estenosis aórtica.

El documento D02 divulga un método para el estudio de la estenosis aórtica, basado en la detección de las proteínas implicadas en dicha enfermedad. Tras dos etapas secuenciales de extracción de proteínas, dichas proteínas son detectadas mediante tecnología 2D-DIGE, obteniendo del orden de 300-400 spots, de los cuales, los autores identifican 100 spots, que corresponden a 50 proteínas conocidas, entre las que se encuentra la α -1-antiquimotripsina.

Los documentos D03 y D04 divulgan la relación de distintas proteínas con la estenosis aórtica. Mientras que el documento D03 divulga la relación entre la proteína C-reactiva y la estenosis aórtica, de forma que altos niveles de dicha proteína se asocia a una peor prognosis de la enfermedad, el documento D04 divulga la relación entre el péptido natriurético tipo-B con la estenosis aórtica severa.

Ninguno de los documentos citados (D01-D04), tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-19. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por dichas reivindicaciones. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-19 es con referencia a los documentos D01-D04 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).