

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 017 793**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2020 PCT/EP2020/054516**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2020 WO20169751**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2020 E 20704923 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025 EP 3928098**

54 Título: **Método in vitro para predecir el riesgo de mortalidad en pacientes que padecen choque cardíogeno**

30 Prioridad:

**20.02.2019 EP 19382126**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.05.2025**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT GERMANS TRIAS I PUJOL (50.00%)  
Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles, s/n  
08916 Barcelona, ES;  
FUNDACIÓ CENTRE DE REGULACIÓ GENÒMICA (30.00%) y  
UNIVERSITAT POMPEU FABRA (20.00%)**

72 Inventor/es:

**SABIDÓ AGUADE, EDUARD;  
BORRÀS RAMÍREZ, EVA;  
RUEDA SOBELLA, FERRAN;  
BAYÉS GENIS, ANTONIO;  
IBORRA EGEA, ORIOL y  
GARCÍA GARCÍA, COSME**

74 Agente/Representante:

**MARTÍNEZ, Miguel Ángel**

Observaciones:

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

ES 3 017 793 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

Método *in vitro* para predecir el riesgo de mortalidad en pacientes que padecen choque cardiogénico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo médico. Particularmente, se refiere a un método *in vitro* para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen choque, que comprende determinar en una muestra biológica obtenida del paciente el nivel de concentración de proteínas específicas.

10

**Estado de la técnica**

A pesar de la generalización de la revascularización temprana y los cuidados intensivos modernos, el tratamiento del choque, particularmente el choque cardiogénico (CC), sigue siendo un desafío, con tasas de mortalidad de ~40 %. La estratificación temprana y precisa del riesgo es crucial para la identificación rápida de los pacientes más enfermos que pueden beneficiarse de terapias avanzadas. Si bien los factores predisponentes clínicos de acontecimientos adversos son bien conocidos desde hace décadas, su derivación a partir de ensayos clínicos previos a la ICP (intervención coronaria percutánea) y la falta de validación externa impidieron su uso rutinario e impulsaron el desarrollo de clasificadores de riesgo más contemporáneos. Recientemente se han notificado dos puntuaciones. La puntuación de riesgo CardShock se desarrolló a partir de un gran registro europeo multicéntrico prospectivo de pacientes con CC no seleccionados con un amplio espectro de etiologías, dos tercios con infarto de miocardio con elevación del segmento ST (IMCEST). La puntuación de riesgo IABP-SHOCK II se desarrolló a partir de los participantes del ensayo IABP-SHOCK II y es altamente específica para el CC relacionado con IMCEST tratado mediante ICP. Estas dos puntuaciones están validadas externamente e incluyen variables clínicas y bioquímicas clásicas para la estratificación del riesgo a corto plazo.

Notablemente, los parámetros de laboratorio incluidos en estas puntuaciones de riesgo son pruebas bioquímicas básicas (glucosa y lactato) que se han usado rutinariamente en la clínica durante varias décadas, pero también incluyen algunos parámetros de perspicacia clínica. Estudios más recientes han explorado biomarcadores predictivos cardíacos y extracardíacos en CC. Sin embargo, la mayoría de estos estudios son pequeños o no están validados por cohortes externas o no evaluaron el valor predictivo incremental de tales biomarcadores combinados con la práctica clínica actual. Particularmente, los nuevos biomarcadores renales, incluyendo la cistatina C, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos plasmáticos y la molécula de lesión renal 1, no han tenido mejores resultados que la creatinina convencional. Con respecto a los datos proteómicos en otros contextos de patología cardiovascular, recientemente se notificó un enfoque proteómico en el contexto de arteriopatía coronaria estable, en el que se notificó una puntuación de riesgo de 9 proteínas con una estadística C de 0,74.

Tolppanen H. *et al.*, Adrenomedullin: a marker of impaired hemodynamics, organ dysfunction, and poor prognosis in cardiogenic shock, *Ann. Intensive Care*, 2017; 7(1):6 divulgan que la adrenomedulina es un marcador de hemodinámica alterada, disfunción orgánica, y mal pronóstico en choque cardiogénico.

Por tanto, hasta bien entrado el siglo XXI, el choque en general, y el CC en particular, siguen estando asociados con una mortalidad inaceptablemente alta y una morbilidad y una utilización de recursos sustanciales. A pesar del uso generalizado de la reperfusión coronaria temprana, el CC se produce con una prevalencia de aproximadamente el 5 % en IMCEST y es la principal causa de muerte hospitalaria.

Por tanto, aunque, tal como se citó anteriormente, se dispone de algunas puntuaciones de riesgo contemporáneas, incluyendo las puntuaciones de riesgo CardShock e IABP-SHOCK II, son necesarias estrategias de estratificación del riesgo más precisas con el fin de predecir eficientemente el riesgo de mortalidad en pacientes con choque cardiogénico.

Por otro lado, evidencias acumuladas indican que el CC no sólo es un problema de insuficiencia de bombeo sino más bien un estado inflamatorio sistémico dentro del contexto de insuficiencia multiorgánica. Por tanto, la proteómica detallada puede permitir el descubrimiento imparcial de nuevos biomarcadores proteicos que pueden usarse para adquirir conocimiento fisiopatológico, mejorar la precisión de la estratificación del riesgo, e identificar dianas terapéuticas.

La presente invención se centra realmente en resolver el problema citado anteriormente y se basa en una puntuación basada en proteínas para predecir el riesgo de mortalidad a corto plazo entre pacientes con CC. Por tanto, esta estratificación precisa de pacientes que padecen CC, según su riesgo de mortalidad a corto plazo, puede usarse eficazmente para prever o anticipar el tratamiento principalmente en aquellos casos con un alto riesgo de mortalidad, aumentando la probabilidad de éxito del tratamiento y, en consecuencia, la esperanza de vida del paciente que padece choque cardiogénico.

65 **Descripción de la invención**

**Breve descripción de la invención**

En la presente divulgación, se realizó un análisis proteómico cuantitativo en dos cohortes de CC independientes para el descubrimiento y la validación de biomarcadores de CC. Además, se realizó una cohorte para el descubrimiento y la validación de biomarcadores de choque séptico (CS).

Inicialmente se identificaron veintiséis proteínas enumeradas en la tabla 1 como biomarcadores para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CC.

Entre dichas veintiséis proteínas, las cuatro proteínas descritas a continuación se identificaron como candidatas preferidas tanto en CC como en CS, cuyos niveles medidos mejoraron sustancialmente la predicción del riesgo de mortalidad más allá de las puntuaciones de riesgo clínico contemporáneas establecidas:

- L-FABP. Referencia de UniProt P07148.
- B2MG. Referencia de UniProt P61769.
- ALDOB. Referencia de UniProt P05062.
- IC1. Referencia de UniProt P05155.

Por tanto, basándose en los resultados, se desarrolló un clasificador basado en proteínas, que también se sometió a prueba mediante espectrometría de masas y ELISA. Este clasificador discrimina con precisión pacientes con choque según su riesgo de mortalidad a corto plazo.

Particularmente, los inventores han desarrollado un método *in vitro* para discriminar aquellos pacientes que padecen choque cardiogénico, o que han padecido choque cardiogénico, con bajo riesgo de mortalidad de aquellos pacientes que padecen choque cardiogénico, o que han padecido choque cardiogénico, con alto riesgo de mortalidad.

Específicamente, se ha desarrollado una puntuación basada en proteínas circulantes para predecir el riesgo de mortalidad a corto plazo entre pacientes con CC o CS. En una realización particularmente preferida, el método se centra en CC y comprende medir, en combinación, el nivel de concentración de cuatro proteínas específicas (modelo CS4P), concretamente: L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1. El área bajo la curva (AUC) para este modelo CS4P es de 0,83 (véase la figura 8). El AUC para CardShock (que es una puntuación de riesgo convencional) es de 0,78. La combinación de ambos modelos (CS4P + CardShock) da lugar a un AUC mejorada de 0,84 (véase la figura 6).

Por otro lado, es importante observar que el modelo basado en la combinación de las veintiséis proteínas enumeradas en la tabla 1 da lugar a un AUC mejorada en CC de 0,921 (véase la figura 10) cuando este modelo no se combina con CardShock. Además, se obtuvo un AUC mejorada de 0,970 cuando las veintiséis proteínas enumeradas en la tabla 1 también se combinaron con CardShock (véase la figura 9).

Además, dichas veintiséis proteínas, y más particularmente, dichas cuatro proteínas L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1, se han analizado individualmente en la presente divulgación (véanse las figuras 5, 6, 7 y 8). Los niveles de L-FABP, B2MG y ALDOB son mayores en pacientes con CC no supervivientes con respecto a los supervivientes. A la inversa, el nivel de IC1 es menor en pacientes con CC no supervivientes con respecto a los supervivientes (véase la figura 4).

Las proteínas se midieron preferiblemente en el plazo de 24 horas del ingreso de pacientes. Por otro lado, el método se refiere particularmente a determinar el riesgo de mortalidad "a corto plazo" entre pacientes con CC. Según la presente invención, "a corto plazo" significa 90 días. Por tanto, en una realización preferida, el método de la invención es realmente evaluar el riesgo de mortalidad entre pacientes con choque cardiogénico en el plazo de un periodo de 90 días.

Por otro lado, el método de la invención puede considerarse como una técnica no invasiva o mínimamente invasiva porque se realiza preferiblemente en muestras de suero o plasma obtenidas de los pacientes.

Si bien, en una realización particularmente preferida, el método de la invención se basa en determinar el nivel de concentración de las cuatro proteínas B2MG, L-FABP, ALDOB e IC1 en combinación, es importante considerar que la presente invención también puede realizarse determinando el nivel de concentración de un número reducido de dichas cuatro proteínas. Dicho de otro modo, la presente invención puede implementarse usando una, dos, tres o cuatro de las proteínas: B2MG, L-FABP, ALDOB e IC1, en donde se determina el nivel de al menos B2MG.

B2MG se cita en el presente documento como una proteína individual para implementar la invención porque, tal como puede observarse en la tabla 2, ofrece los mejores resultados individuales en CC cuando se determina mediante ELISA (método más fácilmente adecuado para el uso clínico rutinario) sin la necesidad de combinarse con CardShock. La presente divulgación ofrece respaldo científico (véanse las figuras 5, 6, 7 y 8), para el uso de

cualquiera de las 26 proteínas enumeradas en la tabla 1, preferiblemente cualquiera de las siguientes proteínas B2MG, L-FABP, ALDOB o IC1 como biomarcadores individuales, o cualquier combinación de las mismas, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen choque, preferiblemente CC o CS. En consecuencia, la presente divulgación también se refiere al uso de cualquiera de las 26 proteínas enumeradas anteriormente, o cualquier combinación de las mismas, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen choque, preferiblemente CC o CS. Dicha combinación de proteínas comprende al menos 2, al menos 3 o al menos 4 de las proteínas: B2MG, L-FABP, ALDOB o IC1. Por tanto, B2MG o, alternativamente, cualquiera de las 26 proteínas enumeradas anteriormente, preferiblemente cualquiera de las siguientes proteínas: L-FABP, ALDOB o IC1, o cualquier combinación de las mismas, se identifican en la presente divulgación como biomarcadores adecuados para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen choque, preferiblemente CC o CS. En consecuencia, la presente divulgación proporciona evidencias para el uso de cualquiera de las proteínas citadas anteriormente, o cualquier combinación de las mismas, como biomarcadores que muestran una alta sensibilidad y susceptibilidad, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen choque, preferiblemente CC o CS.

Por tanto, la primera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen choque cardíaco, que comprende determinar en una muestra biológica obtenida del paciente el nivel de concentración de al menos B2MG, preferiblemente en combinación con al menos L-FABP, o al menos ALDOB, o al menos IC1, en el que un nivel aumentado de al menos la proteína B2MG, o de al menos L-FABP, o de al menos ALDOB, o un nivel reducido de al menos IC1, con respecto al nivel de concentración de dichas proteínas determinado en pacientes supervivientes que padecen choque cardíaco, es una indicación de riesgo de mortalidad.

En una realización preferida, el método de la invención comprende determinar el nivel de concentración de las proteínas B2MG, L-FABP, ALDOB e IC1, en el que un nivel aumentado de las proteínas B2MG, L-FABP y ALDOB, y un nivel disminuido de la proteína IC1, con respecto al nivel de concentración determinado en pacientes supervivientes que padecen choque cardíaco, es una indicación de riesgo de mortalidad. En una realización preferida, el método de la invención comprende además realizar CardShock. CardShock incluye las siguientes variables: edad > 75 años, confusión en el momento de la presentación, infarto de miocardio o injerto de derivación de la arteria coronaria (IDAC) previo, etiología de síndrome coronario agudo (SCA), fracción de expulsión del ventrículo izquierdo < 40 %, lactatemia, y eGFR<sub>CKD-EPI</sub>. En una realización preferida, el método de la invención se realiza en el plazo de 24 horas del ingreso de pacientes. En una realización preferida, el riesgo de mortalidad se evalúa en el plazo de un periodo de 90 días. En una realización preferida, la muestra biológica es suero o plasma. En una realización preferida, el riesgo de mortalidad se predice en la presente invención en pacientes con CC. Las figuras 11 a 13 proporcionan curvas ROC que muestran el AUC para las proteínas individuales L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1, y combinaciones de las mismas, para predecir el riesgo de mortalidad en pacientes con CS.

La segunda realización de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de al menos B2MG, preferiblemente en combinación con al menos L-FABP, o al menos ALDOB, o al menos IC1, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CC. En una realización preferida, dicho uso comprende determinar el nivel de concentración de B2MG, L-FABP, ALDOB e IC1. En una realización preferida, dicho uso comprende además realizar CardShock. CardShock incluye las siguientes variables: edad > 75 años, confusión en el momento de la presentación, infarto de miocardio o injerto de derivación de la arteria coronaria (IDAC) previo, etiología de síndrome coronario agudo (SCA), fracción de expulsión del ventrículo izquierdo < 40 %, lactatemia, y eGFR<sub>CKD-EPI</sub>.

Cuando el método comprende medir el nivel de concentración de combinaciones de biomarcadores, se obtiene un valor de puntuación para la firma y se compara este valor de puntuación con un valor umbral que define la norma de diagnóstico. Si se identifica una variación del valor de puntuación con respecto al umbral, entonces la muestra correspondiente se clasifica como muestra positiva, que es una indicación de un riesgo de mortalidad aumentado del paciente que padece CC. El valor umbral se ha definido con el fin de optimizar los valores de sensibilidad y especificidad. En consecuencia, el método comprende: a) medir el nivel de concentración de cualquiera de las combinaciones de biomarcadores citadas anteriormente, en una muestra biológica obtenida del sujeto, b) procesar los valores de concentración con el fin de obtener una puntuación de riesgo, y c) en el que si se identifica una desviación o variación del valor de puntuación de riesgo obtenido para cualquiera de las combinaciones de biomarcadores citadas anteriormente, en comparación con un valor de referencia, esto es una indicación de un riesgo de mortalidad aumentado del paciente que padece CC.

En el presente documento se divulga además un método para tratar a pacientes que padecen choque cardíaco, o pacientes que han padecido choque cardíaco, que comprende tratar a dichos pacientes con un tratamiento adecuado después de determinar, por medio del método descrito anteriormente, su riesgo de mortalidad. Por tanto, esta estratificación precisa de pacientes que padecen CC según su riesgo de mortalidad a corto plazo puede usarse eficazmente para prever o anticipar el tratamiento principalmente en aquellos casos con un alto riesgo de mortalidad, aumentando la probabilidad de éxito del tratamiento y, en consecuencia, la esperanza de vida del paciente que padece choque cardíaco.

En una realización preferida, los métodos de la invención se realizan mediante ELISA o espectrometría de masas.

En una realización preferida, la medición de las proteínas se realiza en sus precursores (si los hay), o en secciones de la región media.

La tercera realización de la presente invención se refiere a un kit adaptado para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen choque cardiogénico, que comprende: a) herramientas o medios para obtener una muestra de suero o plasma del paciente, y b) herramientas o medios para medir el nivel de concentración de al menos B2MG y al menos una de L-FABP y/o ALDOB y/o IC1. En una realización preferida, el kit comprende: a) herramientas o medios para obtener una muestra de suero o plasma del paciente, y b) herramientas o medios para medir el nivel de concentración de B2MG y L-FABP y ALDOB e IC1.

Por otro lado, existen estrategias de tratamiento establecidas cuando un paciente está padeciendo CC. La revascularización temprana (principalmente a través de intervención coronaria percutánea (ICP)) es la estrategia de tratamiento actual más importante en CC después de infarto de miocardio, con una reducción significativa de la mortalidad después de 6 meses, 1 año, y 6 años. En la práctica clínica, la revascularización debe limitarse a la lesión responsable, con una posible revascularización gradual de otras lesiones en un punto de tiempo posterior. La revascularización por injerto de derivación de la arteria coronaria (IDAC) emergente también puede tener un papel; sin embargo, hay pocas evidencias para aconsejar la revascularización quirúrgica frente a la revascularización por ICP. A este respecto, la terapia antiplaquetaria y antitrombótica (incluyendo, pero sin limitarse a, inhibidores de glicoproteínas IIb/IIIa y cangrelor) es una de las características clave para el éxito de la ICP. No existen ensayos específicos en CC para antiplaquetas o anticoagulación. La reabsorción entérica se ve alterada en CC y, a menudo, se coadministran opioides con un impacto adicional sobre la biodisponibilidad entérica.

En la unidad de cuidados intensivos, el tratamiento de CC implica estabilización hemodinámica inicial mediante expansión volumétrica, vasopresores, y cardiotónicos más terapia adicional para la prevención o el tratamiento de síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO). Los cardiotónicos y los vasopresores se administran en aproximadamente el 90 % de los pacientes en CC. En el caso de un ritmo cardiaco anómalo, pueden administrarse cardioversión sincronizada inmediata o agentes antiarrítmicos, por ejemplo, adenosina. Los cardiotónicos (tales como dobutamina o milrinona) positivos, que potencian la capacidad de bombeo del corazón, se usan para mejorar la contractilidad y corregir la baja tensión arterial. El CC también puede tratarse con dobutamina intravenosa simultáneamente con norepinefrina, que actúa sobre los receptores  $\beta_1$  del corazón conduciendo a una contractilidad y una frecuencia cardiaca aumentadas. Otros cardiotónicos tales como levosimendán o inhibidores de fosfodiesterasa son de interés basándose en su mejora de contractilidad miocárdica y potencial para la vasodilatación sin aumentar la demanda de oxígeno. Sin embargo, las evidencias actuales para los inodilatadores en CC son muy limitadas. Por si esto no fuera suficiente, es necesaria la aplicación de asistencia circulatoria mecánica. El globo de contrapulsación aórtica reduce la carga para el corazón y mejora la perfusión de las arterias coronarias. Los dispositivos de asistencia ventricular (DAV) aumentan la función de bombeo del corazón. Los nuevos desarrollos en DAV incluyen dispositivos de asistencia del ventrículo derecho tales como Impella RP (Abiomed, Danvers, MA, EE. UU.) y TandemHeart RA-PA (LivaNova, Londres, R. U.) con suministro de sangre desde la vena cava inferior o aurícula derecha hasta la arteria pulmonar. Los DAV del ventrículo izquierdo más nuevos incluyen HeartMate PHP (Abbott, Lake Bluff, IL, EE. UU.) desplegado a lo largo de la válvula aórtica y que suministra sangre desde el ventrículo izquierdo hacia la aorta de manera similar a la familia Impella. Otro dispositivo en investigación es el dispositivo pulsátil paracorpóreo iVAC 2L (PulseCath BV, Arnhem, Países Bajos). Desarrollos recientes con sistemas miniaturizados e inserción de cánulas percutáneas han conducido a una adopción más amplia por parte de cardiólogos intervencionistas para el tratamiento de CC usando sistemas de soporte vital extracorpóreo (SVEC), que se han propuesto recientemente para ayudar a los pacientes con CC. Las características integrales de SVEC son una bomba de sangre, un intercambiador de calor, y un oxigenador. Como reflexión general sobre la asistencia circulatoria mecánica, IABP-SHOCK II ha demostrado que un gran porcentaje de supervivientes de CC pueden sobrevivir sin ningún dispositivo. La inserción de un dispositivo en estos pacientes no tendrá ningún impacto sobre la supervivencia o incluso puede conducir a algunas complicaciones por el propio dispositivo, posiblemente dando como resultado la muerte. Entre el 40-50 % de no supervivientes, también puede haber situaciones intrascendentes donde incluso el mejor dispositivo disponible no podrá cambiar el desenlace clínico. Esta situación intrascendente puede producirse en el intervalo del 25-35 % para pacientes con CC grave o aquellos con lesión cerebral anóxica o con septicemia grave concomitante. En éstos, la asistencia circulatoria mecánica puede usarse como una estrategia puente a la decisión y discusión con los pacientes para una decisión centrada en el paciente, pero requiere una medición pronóstica para validar tales decisiones, algo de lo que carece actualmente el campo. Finalmente, como último recurso, si la persona está lo suficientemente estable y por lo demás reúne los requisitos, puede recomendarse un trasplante de corazón o, si no es idónea para un trasplante de corazón, puede colocarse un corazón artificial. Una de las estrategias de tratamiento preferidas son los dispositivos de asistencia ventricular. En este sentido, los biomarcadores descritos en la presente invención, B2MG, L-FABP, ALDOB y/o IC1, pueden usarse para diseñar pruebas o kits diagnósticos acompañantes para determinar la aplicabilidad de los tratamientos mencionados anteriormente a una persona específica que padece CC, por ejemplo, dispositivos de asistencia ventricular. En consecuencia, estas pruebas o estos kits diagnósticos acompañantes pueden ayudar a los médicos a la hora de seleccionar o excluir grupos de pacientes para un tratamiento específico, por ejemplo, con dispositivos de asistencia ventricular, y para determinar pacientes que responden y pacientes que no responden a la terapia. Por tanto, midiendo el nivel de concentración de al menos B2MG, preferiblemente en combinación con L-FABP, ALDOB y/o IC1, los médicos pueden predecir si un paciente específico responderá a un tratamiento, por ejemplo, con

dispositivo de asistencia ventricular. Por otro lado, los médicos pueden monitorizar y seguir la respuesta de un paciente específico al tratamiento, por ejemplo, con dispositivos de asistencia ventricular, midiendo el nivel de concentración de B2MG, preferiblemente en combinación con L-FABP, ALDOB y/o IC1.

5 Con el propósito de la presente invención, se definen los siguientes términos:

10 • La expresión “nivel de concentración determinado en pacientes supervivientes de control que padecen choque cardiogénico” se refiere a un “valor de referencia” del nivel de concentración de las proteínas. Si los niveles de concentración de L-FABP, B2MG y/o ALDOB son mayores, y/o el nivel de concentración de IC1 es menor, en comparación con dicho “nivel de concentración determinado en pacientes supervivientes de control que padecen choque cardiogénico” que se usa como “valor de referencia”, esto es una indicación de riesgo de mortalidad.

15 • Un “valor de referencia” puede ser un valor umbral o un valor de corte. Normalmente, un “valor umbral” o “valor de corte” puede determinarse de manera experimental, empírica o teórica. Un valor umbral también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, tal como reconocería un experto habitual en la técnica. El valor umbral debe determinarse con el fin de obtener la sensibilidad y la especificidad óptimas según la función de la prueba y la relación beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falsos positivos y falsos negativos). Preferiblemente, el experto en la técnica puede compararse los niveles (o puntuaciones) de biomarcadores obtenidos según el método de la invención con un valor umbral definido.

20 Normalmente, la sensibilidad y la especificidad óptimas (y, por tanto, el valor umbral) pueden determinarse usando una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) basándose en los datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar los niveles de los biomarcadores en un grupo de referencia, puede usarse análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de las concentraciones medidas de los biomarcadores en muestras biológicas que van a someterse a prueba y, por tanto, obtener un patrón de clasificación que tiene significación para la clasificación de muestras. El nombre completo de la curva ROC es curva de rendimiento diagnóstico, que también se conoce como curva de eficacia diagnóstica. Se usa principalmente para pruebas diagnósticas bioquímicas clínicas. La curva ROC es un indicador integral que refleja las variables continuas de tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y tasa de falsos positivos (1-especificidad). Revela la relación entre la sensibilidad y la especificidad con el método de composición de imágenes. Se establecen una serie de valores de corte diferentes (umbrales o valores críticos, valores límite entre resultados normales y anómalos de la prueba diagnóstica) como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. Luego se usa la sensibilidad como coordenada vertical y se usa la especificidad como coordenada horizontal para trazar una curva. Cuanto mayor es el área bajo la curva (AUC), mayor es la precisión de diagnóstico. En la curva ROC, el punto más próximo al extremo superior izquierdo del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene altos valores tanto de sensibilidad como de especificidad.

35 El valor de AUC de la curva ROC está entre 1,0 y 0,5. Cuando  $AUC > 0,5$ , el resultado de diagnóstico mejora cada vez más a medida que el AUC se aproxima a 1. Cuando el AUC está entre 0,5 y 0,7, la precisión es baja. Cuando el AUC está entre 0,7 y 0,9, la precisión es buena. Cuando el AUC es mayor de 0,9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. Pueden usarse software o sistemas existentes en la técnica para el trazado de la curva ROC, tales como: software estadístico médico MedCalc 9.2.0.1, SPCS 9.0.

40 • El término “riesgo de mortalidad” se refiere a la estimación de la probabilidad de muerte hospitalaria de un paciente. Según la presente invención, existe riesgo de mortalidad cuando los niveles de concentración de L-FABP, B2MG y/o ALDOB son mayores, y/o el nivel de concentración de IC1 es menor, en comparación con dicho “nivel de concentración determinado en pacientes supervivientes de control que padecen choque cardiogénico” que se usa como “valor de referencia”.

45 • El término “choque” se refiere a una afección potencialmente mortal que se produce cuando el cuerpo no recibe suficiente flujo de sangre. La falta de flujo de sangre significa que las células y los órganos no reciben oxígeno y nutrientes suficientes para funcionar correctamente. Como resultado, pueden dañarse muchos órganos. El choque requiere un tratamiento inmediato y puede empeorar muy rápidamente. Los principales tipos de choque incluyen: choque cardiogénico (debido a problemas cardíacos), choque hipovolémico (provocado por un volumen sanguíneo demasiado escaso), choque anafiláctico (provocado por una reacción alérgica), choque séptico (debido a infecciones) y choque neurógeno (provocado por daño al sistema nervioso).

50 • Por “que comprende” se entiende “que incluye, pero sin limitarse a” lo que sigue a la expresión “que comprende”. Por tanto, el uso del término “que comprende” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no.

55 • Por “que consiste en” se entiende “que incluye, y se limita a” lo que sigue a la expresión “que consiste en”. Por tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.

### Descripción de las figuras

65 Figura 1. Flujo de trabajo general de este estudio en pacientes con CC.

Figura 2. Resultados de proteómica dirigida en pacientes con CC. A) Perfiles cromatográficos de espectrometría de masas dirigida (MRP) correspondientes a los péptidos endógenos y sus patrones internos marcados isotópicamente (o espectros de EM2 de referencia) de las proteínas L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1. B) Deriva del tiempo de retención de los péptidos endógenos mostrados en el panel A para todos los pacientes analizados. L-FABP, proteína de unión a ácidos grasos de tipo hepático; ALDOB, fructosa-bisfosfato aldolasa B; B2MG, beta-2-microglobulina; IC1, serpina G1.

Figura 3. Mejora en la discriminación para la predicción de riesgo de mortalidad a los 90 días con cada modelo en pacientes con CC. CardShock incluye edad > 75 años, confusión en el momento de la presentación, IM o IDAC previo, etiología de SCA, FEVI < 40 %, lactatemia, y eGFR<sub>CKD-EPI</sub>. La puntuación de CS4P incluye la abundancia de proteínas circulantes medida mediante monitorización de reacciones paralelas de proteína de unión a ácidos grasos de tipo hepático (L-FABP), fructosa-bisfosfato aldolasa B (ALDOB), beta-2-microglobulina (B2MG) y serpina G1 (IC1). CardShock+CS4P incluye la puntuación de riesgo de CardShock más la puntuación de CS4P.

Figura 4. Diagramas de cajas relativos a supervivientes frente a no supervivientes a los 90 días de las 4 proteínas de CS4P medidas mediante ELISA en pacientes con CC. L-FABP, proteína de unión a ácidos grasos de tipo hepático; ALDOB, fructosa-bisfosfato aldolasa B; B2MG, beta-2-microglobulina; IC1, serpina G1.

Figura 5. Curvas ROC que muestran el AUC para las proteínas individuales L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1, y combinaciones de las mismas, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CC, cuando dichas proteínas se combinan con CardShock y se miden mediante ELISA.

Figura 6. Curvas ROC que muestran el AUC para las proteínas individuales L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1, y combinaciones de las mismas, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CC, cuando dichas proteínas se combinan con CardShock y se miden mediante espectrometría de masas.

Figura 7. Curvas ROC que muestran el AUC para las proteínas individuales L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1, y combinaciones de las mismas, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CC, cuando dichas proteínas no se combinan con CardShock y se miden mediante ELISA.

Figura 8. Curvas ROC que muestran el AUC para las proteínas individuales L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1, y combinaciones de las mismas, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CC, cuando dichas proteínas no se combinan con CardShock y se miden mediante espectrometría de masas.

Figura 9. Curvas ROC que muestran el AUC para un modelo basado en la combinación de las veintiséis proteínas enumeradas en la tabla 1, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CC, cuando dichas proteínas se combinan con CardShock.

Figura 10. Curvas ROC que muestran el AUC para un modelo basado en la combinación de las veintiséis proteínas enumeradas en la tabla 1, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CC, cuando dichas proteínas no se combinan con CardShock.

Figura 11. Curvas ROC que muestran el AUC para las proteínas individuales L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1 y combinaciones de las mismas, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CS, en el plazo de un periodo de 30 días. Experimentos realizados mediante ELISA.

Figura 12. Curvas ROC que muestran el AUC para las proteínas individuales L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1 y combinaciones de las mismas, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CS, en el plazo de un periodo de 90 días. Experimentos realizados mediante ELISA.

Figura 13. Curvas ROC que muestran el AUC para las proteínas individuales L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1 y combinaciones de las mismas, para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CS, en el plazo de un periodo de 365 días. Experimentos realizados mediante ELISA.

## Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1. Materiales y métodos.

Ejemplo 1.1. Cohortes de pacientes.

La cohorte de descubrimiento de Barcelona es un estudio prospectivo de un solo centro con inclusión de todos los pacientes con CC derivado de IMCEST entre marzo de 2011 y marzo de 2015. El IMCEST se definió según la tercera definición universal de infarto de miocardio. Los médicos determinaron el tratamiento de los pacientes, siguiendo las recomendaciones de las directrices [Steg PG, James SK, Atar D, *et al.* ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2012; 33(20):2569-619] y [O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, *et al.* 2013 ACCF/AHA guideline for the management of

ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013;61(4): e78-140].

Se obtuvieron dos muestras (ingreso y 24 horas) de cada paciente (n=48) mediante venopunción y se almacenaron a -80 °C. El criterio de valoración clínico fue la mortalidad a los 90 días. La cohorte de validación de CardShock es un estudio de CC europeo prospectivo, multicéntrico y multinacional de origen isquémico o no isquémico entre octubre de 2010 y diciembre de 2012. Las características clínicas y los criterios de inclusión y exclusión de las cohortes se notifican en otras partes [Harjola VP, Lassus J, Sionis A, *et al.* CardShock Study Investigators; GREAT network. Clinical picture and risk prediction of short-term mortality in cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail* 2015;17(5):501-9].

Para el presente estudio, se usó únicamente una muestra extraída en el plazo de 24 horas del ingreso, inmediatamente congelada y almacenada a -80 °C (n=97). Durante el seguimiento, se determinó el estado vital mediante contacto directo con los pacientes o sus familiares más cercanos, o a partir de los registros poblacional y hospitalario. El criterio de valoración clínico fue la mortalidad a los 90 días.

Ambas cohortes fueron aprobadas por los comités éticos locales en los centros participantes, y los estudios se llevaron a cabo según la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes o sus familiares más cercanos.

La cohorte de choque séptico analizada estaba compuesta por 200 pacientes, proporcionados por el Departamento de Anestesiología y la Unidad de Quemados y Cuidados Críticos, GH St-Louis-Lariboisière, París, Francia.

Se recogieron muestras de suero para cada paciente diagnosticado con choque séptico, tal como se define por la Sociedad de Medicina de Cuidados Críticos (SCCM) y la Sociedad Europea de Medicina de Cuidados Intensivos (ESICM), que inauguraron las Directrices de la Campaña de Sobrevivir a la Septicemia: el choque séptico se define como un subconjunto de septicemia con disfunción circulatoria y celular/metabólica asociada con un mayor riesgo de mortalidad [Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8):801-810. doi: 10.1001/jama.2016.0287]. Las muestras se almacenaron a -80 °C y se enviaron a Barcelona para su análisis adicional. Durante el seguimiento, se determinó el estado vital mediante contacto directo con los pacientes o sus familiares más cercanos, o a partir de los registros poblacional y hospitalario. De los 200 pacientes, supervivieron 104 (52 %) y fallecieron 96 (48 %) durante el seguimiento. El criterio de valoración clínico fue la mortalidad a los 90 días. Esta cohorte fue aprobada por los comités éticos locales en los centros participantes, y los estudios se llevaron a cabo según la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes o sus familiares más cercanos.

Ejemplo 1.2. Descubrimiento de biomarcadores mediante cribado proteómico.

Se realizó análisis proteómico cuantitativo usando espectrometría de masas (nCL-EM/EM) para identificar posibles candidatos a biomarcador proteico entre aquellas proteínas que difieren en cuanto a abundancia entre supervivientes y no supervivientes a los 90 días. Las muestras de suero (ingreso y 24 horas) de los 48 pacientes de la cohorte de Barcelona (21 no supervivientes y 27 supervivientes a los 90 días) se digirieron con tripsina para dar péptidos y se analizaron usando cribado proteómico libre de marcadores (nCL-EM/EM).

Ejemplo 1.3. Validación de biomarcadores mediante proteómica dirigida.

Se evaluaron las proteínas biomarcadoras candidatas identificadas en la fase de descubrimiento en cuanto a potencia de clasificación en la cohorte de validación de CardShock mediante cuantificación por proteómica dirigida usando monitorización de reacciones paralelas (MRP). Las muestras de plasma correspondientes a los 97 pacientes de la cohorte de CardShock (36 no supervivientes y 61 supervivientes a los 90 días) se digirieron con tripsina y se analizaron usando nCL-MRP dirigida y péptidos patrón marcados isotópicamente como referencias internas. Se evaluaron los rastros cromatográficos iónicos de los fragmentos para todos los péptidos precursores seleccionados como diana, se transformaron logarítmicamente y se normalizaron usando los péptidos de referencia interna. Se estimaron las abundancias de proteínas, y se evaluó la cuantificación relativa de proteínas entre supervivientes y no supervivientes.

Ejemplo 1.4. Ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas de las proteínas validadas.

Se usaron cuatro kits de ELISA disponibles comercialmente, siguiendo las instrucciones del fabricante, para cada proteína validada.

L-FABP se determinó cuantitativamente mediante el kit de ELISA de L-FABP humana. La concentración mínima que pudo medirse fue de 102 pg/ml y el intervalo de concentración medible fue de 102-25.000 pg/ml. Las muestras debían diluirse al menos 20x antes de su uso y se diluyeron 1/100 en tampón de dilución 1x antes de la medición. El método de análisis fue según el manual del proveedor. No hay reactividad cruzada con H-FABP humana ni I-FABP humana.

5 ALDOB se midió mediante un kit de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas. El intervalo de curva patrón usado fue de 2,5-160 ng/ml y la concentración detectable mínima fue de 0,9 ng/ml. La precisión intraensayo e interensayo fue <10 % y <12 %, respectivamente. Las muestras se diluyeron 1/8 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1x antes de la medición. No se observó reactividad cruzada o interferencia significativa entre ALDOB y sus análogos.

10 B2MG se determinó mediante un inmunoensayo enzimático. El intervalo de cálculo de esta ELISA fue de 0-12 µg/ml, donde la sensibilidad funcional se determinó en 0,1 µg/ml. La precisión intraensayo e interensayo fue <3,5 % y <4,5 %, respectivamente. Las muestras se diluyeron 1/100 en tampón de muestra PU 1x antes de la medición. No se ha observado interferencia con suero hemolítico (hasta 1000 mg/dl) o lipémico (hasta 3 g/dl). El análisis se realizó según el manual.

15 La serpina G1 se midió mediante el ELISA de serpina G1 humana. La sensibilidad o la dosis detectable mínima fue de 10 pg/ml y el intervalo de detección fue de 156-10.000 pg/ml. La precisión intraensayo e interensayo fue <5,6 % y <5,9 %, respectivamente. Las muestras se diluyeron 1/50.000 en diluyente de muestra antes de la medición. Este ensayo tiene alta especificidad para la serpina G1 humana natural y recombinante y no hay reactividad cruzada detectable con otras proteínas relevantes.

20 Ejemplo 1.5. Análisis estadísticos.

25 Las variables clínicas se presentan como número (n) y porcentaje (%) para variables categóricas, media y desviación estándar (DE) para variables distribuidas normalmente, o mediana y rango intercuartil (RIC) para variables asimétricas. Las comparaciones entre grupos se realizaron usando la prueba de chi-cuadrado, la prueba de la t de Student o la prueba de la U de Mann-Whitney, según correspondiera.

30 Las estimaciones de abundancia de proteínas y la cuantificación relativa de proteínas entre grupos (supervivientes frente a no supervivientes) a partir de datos proteómicos se realizaron con los paquetes de software Skyline 3.7 y MSstats 3.8.2. Las mejores combinaciones de proteínas para clasificar el riesgo de mortalidad a los 90 días en pacientes con CC se probaron dentro de la cohorte de CardShock, que se dividió en un conjunto de entrenamiento (2/3) y un conjunto de validación (1/3). Dentro del conjunto de entrenamiento, la abundancia de cada proteína se ajustó en un modelo de regresión logística entre supervivientes y no supervivientes, y la capacidad de clasificación de cada proteína y combinaciones de proteínas se evaluó mediante el área bajo la curva (AUC) de una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) tal como se describió previamente. Las cuatro proteínas identificadas se sometieron a prueba como variables continuas.

40 La puntuación de riesgo de CardShock, usada como modelo de referencia, incluye edad > 75 años, confusión en el momento de la presentación, infarto de miocardio o injerto de derivación de la arteria coronaria (IDAC) previo, etiología de síndrome coronario agudo (SCA), fracción de expulsión del ventrículo izquierdo < 40 %, lactatemia, y eGFR<sub>CKD-EPI</sub>. Las calibraciones del modelo se calcularon utilizando la prueba de Hosmer-Lemeshow (HL), y la discriminación y reclasificación de pacientes se evaluaron utilizando la estadística C de Harrell (AUC) y la mejora de reclasificación neta continua (cNRI). Los intervalos de confianza para la estadística C y la NRI se obtuvieron mediante un remuestreo con reposición de 1000 veces.

45 Los análisis se realizaron usando STATA V.13.0 (StataCorp, College Station, TX), paquete PredictABEL R v1.2, y SPSS V.20.0 (IBM Corp, Armonk, NY).

Ejemplo 2. Resultados.

50 Ejemplo 2.1. Descubrimiento imparcial de candidatos a biomarcador proteico (cohorte de Barcelona).

55 La tabla 3 muestra los datos clínicos, bioquímicos y de seguimiento de la cohorte de descubrimiento de Barcelona. La edad media fue de 69 ± 13 años, el 35 % eran mujeres, y el 94 % se trataron con intervención coronaria percutánea primaria. La mortalidad a los 90 días fue del 45,8 %.

60 Se identificaron un total de 2662 proteínas en el conjunto de datos, de las cuales 488 estaban presentes en más del 30 % de los pacientes. Después de la cuantificación relativa de proteínas entre las diferentes variables: desenlace del paciente (supervivientes, non-supervivientes) y tiempo de muestreo (ingreso, 24 horas), se seleccionaron un total de 51 proteínas para la fase de validación en la cohorte de CardShock independiente. En resumen, se consideraron 32 proteínas que cambiaban en cuanto a abundancia o bien entre pacientes supervivientes y no supervivientes o bien en el plazo de las primeras 24 horas después del ingreso (ingreso, 24 h) para su validación adicional. Además, se incluyeron 19 proteínas en el estudio basándose en el conocimiento previo y la relevancia clínica.

65 Ejemplo 2.2. Validación mediante proteómica dirigida de candidatos a biomarcador circulante (cohorte de CardShock).

Se validó adicionalmente la potencia de clasificación de 26 de las 51 proteínas seleccionadas en la cohorte de CardShock usando cuantificación por proteómica dirigida mediante monitorización de reacciones paralelas. La tabla 3 muestra las características de la cohorte de validación de CardShock. La edad media fue de  $66 \pm 14$  años, el 25 % eran mujeres, y la mortalidad a los 90 días fue del 37,1 %. La causa más común de CC fue SCA (71 %), principalmente impulsado por IMCEST (52 %). En comparación con la cohorte de Barcelona, los pacientes de CardShock mostraron mayores niveles de hemoglobina y menores niveles de creatinina, lactato y glucosa.

Se obtuvieron perfiles cromatográficos de espectrometría de masas dirigida para todas las proteínas medidas y se compararon con las referencias internas correspondientes para la cuantificación relativa de proteínas. Véase la figura 2 como un ejemplo para las señales de espectrometría de masas obtenidas para las proteínas proteína de unión a ácidos grasos de tipo hepático (L-FABP), fructosa-bisfosfato aldolasa B (ALDOB), beta-2-microglobulina (B2MG) y serpina G1 (IC1), medidas en todos los pacientes. Las mejores combinaciones de proteínas para clasificar a los supervivientes y no supervivientes a los 90 días en pacientes con CC se identificaron realizando una selección de factores predisponentes combinada con validación cruzada tal como se describió previamente [Borràs E, Cantó E, Choi M, *et al.* Protein-Based Classifier to Predict Conversion from Clinically Isolated Syndrome to Multiple Sclerosis. *Mol Cell Proteomics*. 2016; 15(1):318-28]. Según la figura 2, se usaron las siguientes secuencias para obtener el perfil cromatográfico de espectrometría de masas para cada proteína: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 para B2MG, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 para ALDOB, SEQ ID NO: 5 para FABPL y SEQ ID NO: 6 para ID1. Cabe destacar que, aunque este método se ha usado en la presente invención para la identificación de la proteína, puede usarse cualquier otra parte de la proteína, o incluso toda la proteína, para este propósito.

Esta evaluación dio como resultado la identificación de una combinación de 4 proteínas con las proteínas L-FABP, B2MG, ALDOB e IC1 como el mejor clasificador de proteínas para identificar el riesgo de mortalidad a corto plazo con un AUC de 0,83 (IC del 95 % de 0,74-0,89) (tabla 4 y figura 3).

Se construyó un modelo adicional combinando la puntuación de riesgo de CardShock con el nuevo modelo CS4P (CardShock+CS4P). CardShock+CS4P mejoró significativamente la estadística C para la predicción de mortalidad en comparación con la puntuación de riesgo de CardShock sola (AUC de 0,84 frente a AUC de 0,78;  $P=0,033$ ; tabla 4 y figura 3). Además, CardShock+CS4P mostró un beneficio considerable en la reclasificación de pacientes, con una NRI de 0,49 ( $P=0,020$ ) (tabla 4). En general, CardShock+CS4P dio como resultado una reclasificación mejorada del 32 % de pacientes en comparación con la puntuación de riesgo de CardShock.

En un análisis exploratorio, también se combinó el modelo CS4P con otra puntuación de riesgo contemporánea, IABP-SHOCK II, generando IABP-SHOCK II+CS4P. IABP-SHOCK II+CS4P también proporcionó mejores métricas de predicción en comparación con IABP-SHOCK II, con una NRI de 0,57 ( $P=0,032$ ).

Ejemplo 2.3. Aplicación de CS4P en ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA) en CC.

El modelo CS4P definido por proteómica dirigida se sometió a prueba mediante ELISA para respaldar su rápida aplicación en la práctica clínica rutinaria. La mediana (RIC) de las concentraciones circulantes de las proteínas estudiadas fue: L-FABP, 160 pg/ml (42-1720 pg/ml); B2MG, 482  $\mu$ g/ml (276-752  $\mu$ g/ml); ALDOB, 101 ng/ml (70-209 ng/ml); e IC1, 218 pg/ml (169-259 pg/ml), respectivamente. L-FABP (453 frente a 94 pg/ml,  $p=0,02$ ), B2MG (709 frente a 344  $\mu$ g/ml,  $p<0,001$ ) y ALDOB (156 frente a 84 ng/ml,  $p=0,05$ ) circulantes fueron mayores en no supervivientes con respecto a los supervivientes. En cambio, la concentración de IC1 fue significativamente menor en no supervivientes con respecto a los supervivientes (205 frente a 226 pg/ml,  $p=0,02$ ) (figura 4).

Las concentraciones de proteínas de CS4P obtenidas mediante ELISA combinadas con la puntuación de riesgo de CardShock proporcionaron un AUC de 0,82 (IC del 95 % de 0,73-0,90), no significativamente diferente del obtenido por proteómica dirigida ( $p=0,123$ ).

Ejemplo 2.4. Aplicación de CS4P en ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA) en CS.

El modelo CS4P definido por proteómica dirigida se sometió a prueba mediante ELISA para respaldar su rápida aplicación en la práctica clínica rutinaria. La mediana (RIC) de las concentraciones circulantes de las proteínas estudiadas fue: L-FABP, 34,29 pg/ml (0,6-2500 pg/ml); B2MG, 1034  $\mu$ g/ml (204-4637  $\mu$ g/ml); ALDOB, 91,43 ng/ml (38-637 ng/ml); e IC1, 217 pg/ml (19-500 pg/ml), respectivamente. L-FABP ( $p=0,002$ , OR de 1,47, IC del 95 % de 1,18-1,44), B2MG ( $p<0,001$ , OR de 1,42, IC del 95 % de 1,14-1,77) y ALDOB ( $p=0,007$ , OR de 1,34, IC del 95 % de 1,08-1,65) circulantes fueron mayores en no supervivientes con respecto a los supervivientes después de analizar la mortalidad total a los 30 días en un análisis univariante. En el análisis multivariante, L-FABP ( $p=0,004$ , HR de 1,38, IC del 95 % de 1,10-1,69) y B2MG ( $p=0,001$ , HR de 1,44, IC del 95 % de 1,16-1,80) fueron mayores en no supervivientes con respecto a los supervivientes después de analizar la mortalidad total a los 30 días.

Las concentraciones de proteínas de CS4P obtenidas mediante ELISA proporcionaron un AUC de 0,68 (IC del 95 % de 0,60-0,76).

## Tablas

Tabla 1. Los veintiséis biomarcadores proteicos usados para la clasificación de pacientes.

Nombre de proteína	Referencia de UniProt
B2MG (beta-2-microglobulina)	P61769
FABPL (proteína de unión a ácidos grasos hepáticos)	P07148
ALDOB (fructosa-bisfosfato aldolasa B)	P05062
IC1 (serpina G1)	P05155
F13A (cadena A del factor de coagulación XIII)	P00488
HPTR (proteína relacionada con haptoglobina)	P00739
PLMN (plasminógeno)	P00747
AACT (alfa-1-antiquimotripsina)	P01011
ANGT (angiotensinógeno)	P01019
FIBA (cadena alfa del fibrinógeno)	P02671
FIBB (cadena beta del fibrinógeno)	P02675
FIBG (cadena gamma del fibrinógeno)	P02679
CRP (proteína C reactiva)	P02741
RET4 (proteína 4 de unión a retinol)	P02753
S10A8 (proteína S100-A8)	P05109
HEP2 (cofactor 2 de heparina)	P05546
IBP2 (proteína 2 de unión a factor de crecimiento similar a la insulina)	P18065
MUC18 (glicoproteína de la superficie celular MUC18)	P43121
SEPP1 (selenoproteína P)	P49908
ILRL1 (receptor de interleucina 1 de tipo 1)	Q01638
FHR4 (proteína 4 relacionada con factor H del complemento)	Q92496
CELR1 (receptor 1 de tipo G de siete pasos de cadherina EGF LAG)	Q9NYQ6
MYO5A (miosina Va no convencional)	Q9Y4I1
CATA (catalasa)	P04040
ALDOA (fructosa-bisfosfato aldolasa A)	P04075
APOB (apolipoproteína B-100)	P04114

Tabla 2. Las cuatro proteínas identificadas como biomarcadores individuales fiables para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen CC (+CC: combinado con CardShock. -CC: no combinado con CardShock. E: técnica de ELISA. EM: técnica de espectrometría de masas).

Nombre de proteína	Referencia de UniProt	AUC			
		+CC E	+CC EM	-CC E	-CC EM
B2MG (beta-2-microglobulina)	P61769	0,765	0,808	<b>0,742</b>	0,716
FABPL (proteína de unión a ácidos grasos hepáticos)	P07148	0,786	0,809	<b>0,657</b>	0,743
ALDOB (fructosa-bisfosfato aldolasa B)	P05062	0,797	0,791	<b>0,637</b>	0,626
IC1 (serpina G1)	P05155	0,800	0,799	<b>0,596</b>	0,521

5  
Tabla 3. Comparación de características iniciales, presentación clínica, tratamiento, parámetros analíticos y desenlace entre las cohortes de descubrimiento y validación.

Característica	Cohorte de descubrimiento (n=48)	Cohorte de validación (n=97)	Valor de P
Edad, años	69 (13)	66 (14)	0,204
Mujeres, n (%)	17 (35)	24 (25)	0,179
Anamnesis, n (%)			
Hipertensión	30 (62,5)	57 (58,8)	0,666
Diabetes	20 (41,7)	29 (29,9)	0,159
Accidente cerebrovascular/AIT	6 (12,5)	11 (11,3)	0,838
Insuficiencia cardiaca	5 (10,4)	22 (22,7)	0,074
Arteriopatía coronaria	12 (25,0)	34 (35,1)	0,221
Infarto de miocardio previo	4 (8,3)	24 (24,7)	0,018
ICP previa	5 (10,4)	16 (16,5)	0,328
IDAC previo	1 (2,1)	6 (6,2)	0,278
Presentación clínica			
Síndrome coronario agudo, n (%)	48 (100)	69 (71,1)	<0,001
IMCEST, n (%)	48 (100)	50 (51,5)	<0,001
Reanimado de una parada cardiaca, n (%)	15 (31,3)	20 (20,6)	0,159
Tensión arterial media, mmHg	69 ± 20	57 ± 10	<0,001
Frecuencia cardiaca, lpm	85 ± 29	92 ± 28	0,167
FEV1, %	39 ± 13	34 ± 15	0,057
Tratamiento, n (%)			
Angiografía coronaria	46 (95,8)	73 (75,3)	0,002
ICP	45 (93,8)	58 (59,8)	<0,001
Flujo TIMI después de ICP			0,104
0	0 (0)	3 (5,1)	
1	0 (0)	4 (6,8)	
2	4 (10,5)	10 (16,9)	
3	34 (89,5)	42 (71,2)	
IDAC	0 (0)	5 (5,3)	0,104
IABP	27 (56,3)	45 (46,4)	0,264
Bioquímica en el momento del ingreso			
Hemoglobina, g/l	118 ± 24	128 ± 25	0,024
Creatinina, mg/dl (RIC)	1,6 (1,3-1,9)	1,2 (0,9-1,6)	<0,001
eGFR <sub>CKD-EPI</sub> , ml/min/1,73 m <sup>2</sup>	42 ± 15	63 ± 29	<0,001
Mediana (RIC) de lactatemia arterial, mmol/l	6,3 (4,6-15,0)	2,5 (1,8-5,6)	0,003
Lactato > 5 mmol/l, n (%)	5 (71,4)	26 (26,8)	0,013
Glucosa, mmol/l	16,9 ± 7,3	11,9 ± 6,0	<0,001
Glucosa > 10,6 mmol/l, n (%)	38 (84,4)	46 (48,4)	<0,001
Mediana (RIC) de hsTnT, pg/ml	2116 (869-7690)	1568 (277-3920)	0,068
Mediana (RIC) de NT-proBNP, pg/ml	1945 (558-6984)	3385 (687-9716)	0,142
Mortalidad a los 90 días, n (%)	22 (45,8)	36 (37,1)	0,313

5 AIT indica ataque isquémico transitorio, ICP intervención coronaria percutánea, IDAC injerto de derivación de la arteria coronaria, IMCEST infarto de miocardio con elevación del segmento ST, FEVI fracción de expulsión del ventrículo izquierdo, TIMI trombólisis en infarto de miocardio, IABP globo de contrapulsación aórtica, eGFR<sub>CKD-EPI</sub> velocidad de filtración glomerular estimada mediante la fórmula de Colaboración de Epidemiología de Enfermedad Renal Crónica, hsTnT troponina T de alta sensibilidad, y NT-proBNP propéptido natriurético de tipo B N-terminal.

Tabla 4. Comparación de rendimientos del modelo para predecir la mortalidad a los 90 días en pacientes con CC.

	AUC	Valor de P	HL	Valor de P	NRI	Valor de P
CardShock	0,78 (0,69-0,87)	-	3,29	0,914	-	-
CS4P	0,83 (0,74-0,89)	0,178*	13,26	0,103	-	-
CardShock+CS4P	0,84 (0,76-0,93)	0,033*	7,250	0,509	0,49	0,020*

10 \*Valores de P frente a CardShock. AUC indica área bajo la curva, HL Hosmer-Lemeshow, y NRI mejora de reclasificación neta. CardShock incluye edad > 75 años, confusión en el momento de la presentación, IM o IDAC previo, etiología de SCA, FEVI < 40 %, lactatemia, y eGFR<sub>CKD-EPI</sub>. La puntuación de CS4P incluye proteína de unión a ácidos grasos de tipo hepático (L-FABP), fructosa-bisfosfato aldolasa B (ALDOB), beta-2-microglobulina (B2MG) y  
 15 serpina G1 (IC1). CardShock+CS4P incluye CardShock más la puntuación de CS4P.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen choque cardiogénico, que comprende determinar en una muestra biológica que se ha obtenido del paciente el nivel de concentración de al menos B2MG, en el que un nivel aumentado de al menos la proteína B2MG, con respecto al nivel de concentración determinado en pacientes supervivientes de control que padecen choque cardiogénico, es una indicación de riesgo de mortalidad.
- 10 2. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, en el que el método comprende además determinar el nivel de concentración de la proteína L-FABP, y/o ALDOB, y/o IC1, en el que un nivel aumentado de las proteínas L-FABP o ALDOB, o un nivel disminuido de la proteína IC1, con respecto al nivel de concentración determinado en pacientes supervivientes que padecen choque cardiogénico, es una indicación de riesgo de mortalidad.
- 15 3. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el método comprende determinar el nivel de concentración de las proteínas B2MG y L-FABP y ALDOB e IC1, en el que un nivel aumentado de las proteínas B2MG y L-FABP y ALDOB, y un nivel disminuido de la proteína IC1, con respecto al nivel de concentración determinado en pacientes supervivientes que padecen choque cardiogénico, es una indicación de riesgo de mortalidad.
- 20 4. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el método comprende además determinar el nivel de concentración de las proteínas: FABPL, y/o ALDOB, y/o IC1, y/o F13A, y/o HPTR, y/o PLMN, y/o AACT, y/o ANGT, y/o FIBA, y/o FIBB, y/o FIBG, y/o CRP, y/o RET4, y/o S10A8, y/o HEP2, y/o IBP2, y/o MUC18, y/o SEPP1, y/o ILRL1, y/o FHR4, y/o CELR1, y/o MYO5A, y/o CATA, y/o ALDOA, y/o APOB.
- 25 5. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la determinación de lactato y la velocidad de filtración glomerular estimada (eGFR<sub>CKD-EPI</sub>) en pacientes con más de 75 años, con confusión en el momento de la presentación, infarto de miocardio o injerto de derivación de la arteria coronaria previo, etiología de síndrome coronario agudo y fracción de expulsión del ventrículo izquierdo de menos del 40 %.
- 30 6. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método se realiza en el plazo de 24 horas del ingreso de pacientes.
- 35 7. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el riesgo de mortalidad se evalúa en el plazo de un periodo de 90 días.
- 40 8. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica es suero o plasma.
9. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la determinación del nivel de concentración de las proteínas se realiza mediante ELISA, o mediante espectrometría de masas.
- 45 10. Uso *in vitro* de B2MG para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen choque cardiogénico.
- 50 11. Uso *in vitro*, según la reivindicación 10, que comprende además determinar el nivel de concentración de al menos una de las proteínas L-FABP, ALDOB y/o IC1.
- 55 12. Uso *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, que comprende determinar el nivel de concentración de las proteínas B2MG, L-FABP, ALDOB e IC1.
- 60 13. Uso *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende además la determinación de lactato y la velocidad de filtración glomerular estimada (eGFR<sub>CKD-EPI</sub>) en pacientes con más de 75 años, con confusión en el momento de la presentación, infarto de miocardio o injerto de derivación de la arteria coronaria previo, etiología de síndrome coronario agudo y fracción de expulsión del ventrículo izquierdo de menos del 40 %.
- 65 14. Kit adaptado para predecir el riesgo de mortalidad entre pacientes que padecen choque cardiogénico, que comprende:
  - a. herramientas o medios para obtener una muestra de suero o plasma del paciente, y
  - b. herramientas o medios para medir el nivel de concentración de B2MG y al menos una de L-FABP y/o ALDOB y/o IC1.

15. Kit, según la reivindicación 14, que comprende:

- a. herramientas o medios para obtener una muestra de suero o plasma del paciente, y
- b. herramientas o medios para medir el nivel de concentración de B2MG y L-FABP y ALDOB e IC1.

5

Fig. 1

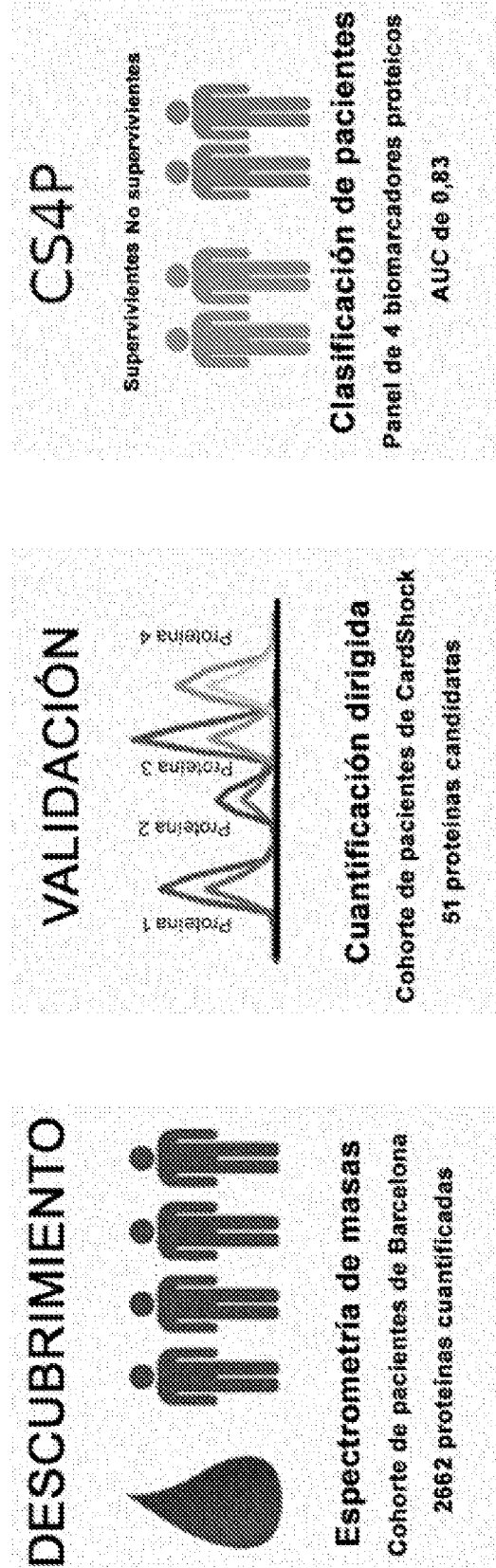


Fig. 2

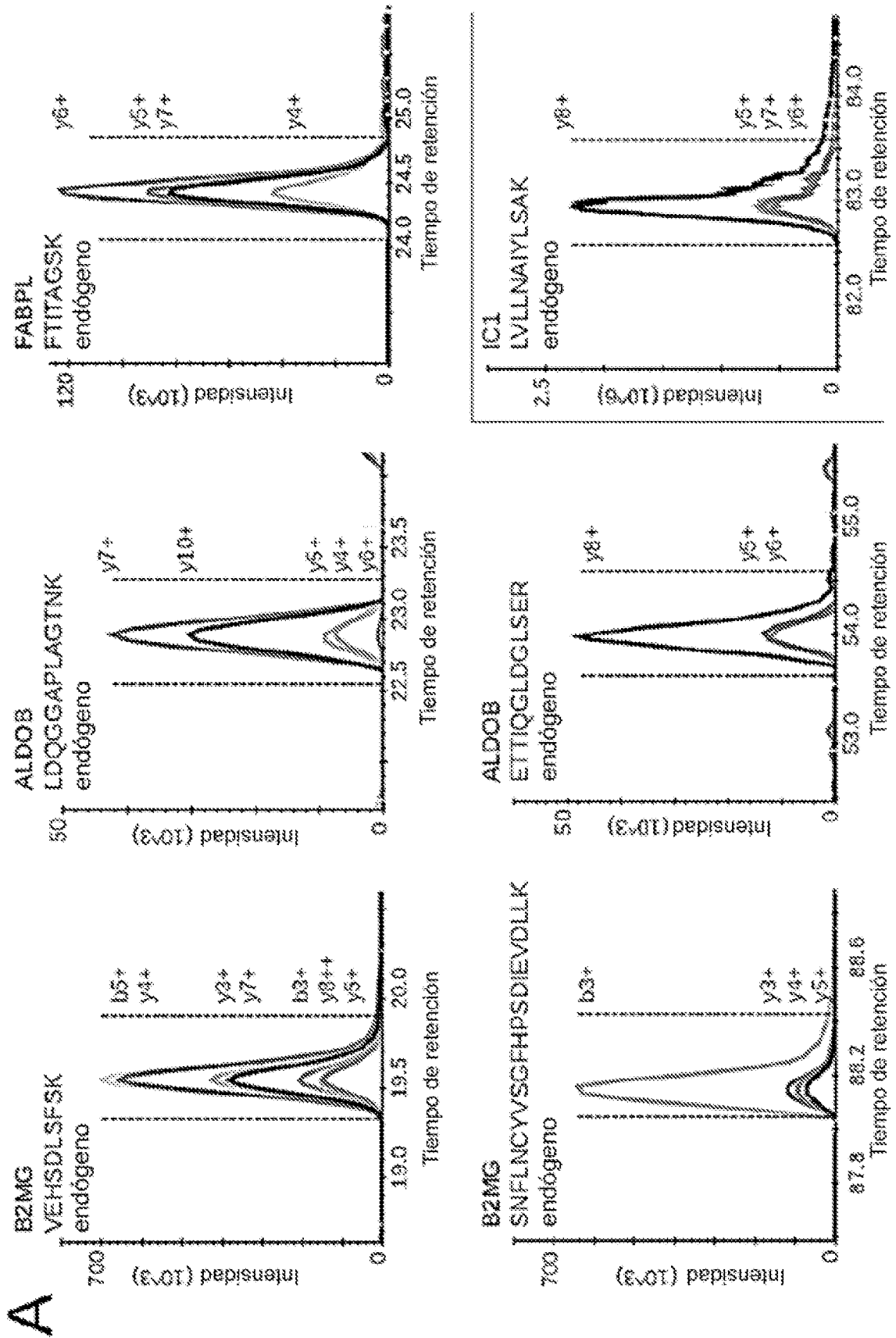


Fig. 2 (Cont.)

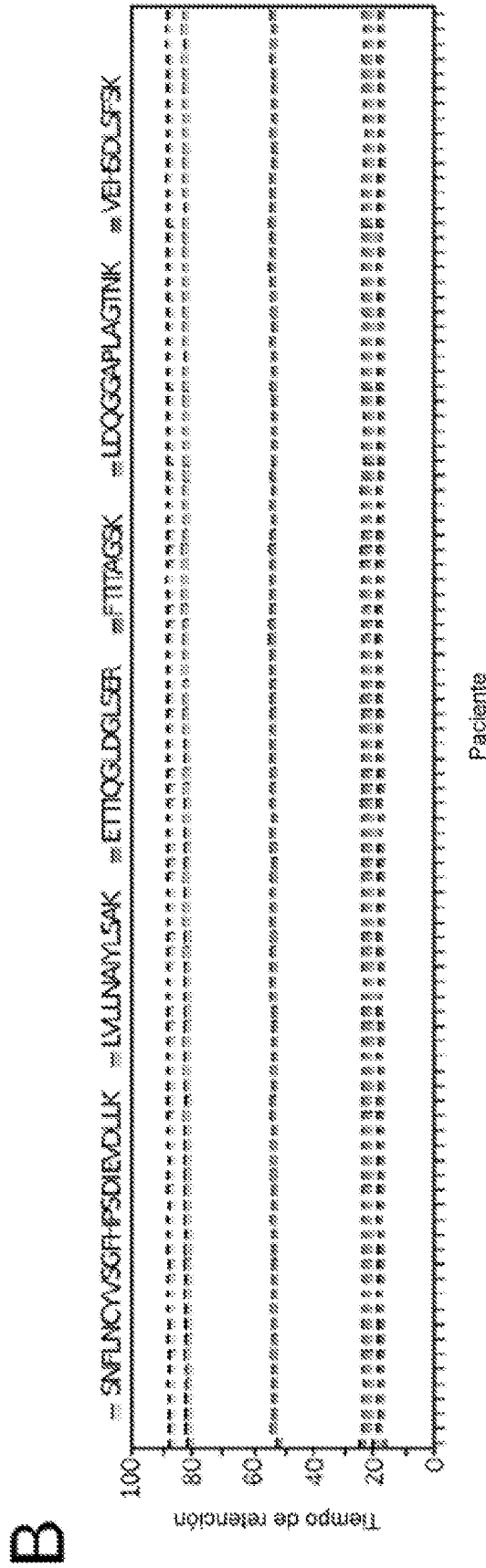


Fig. 3

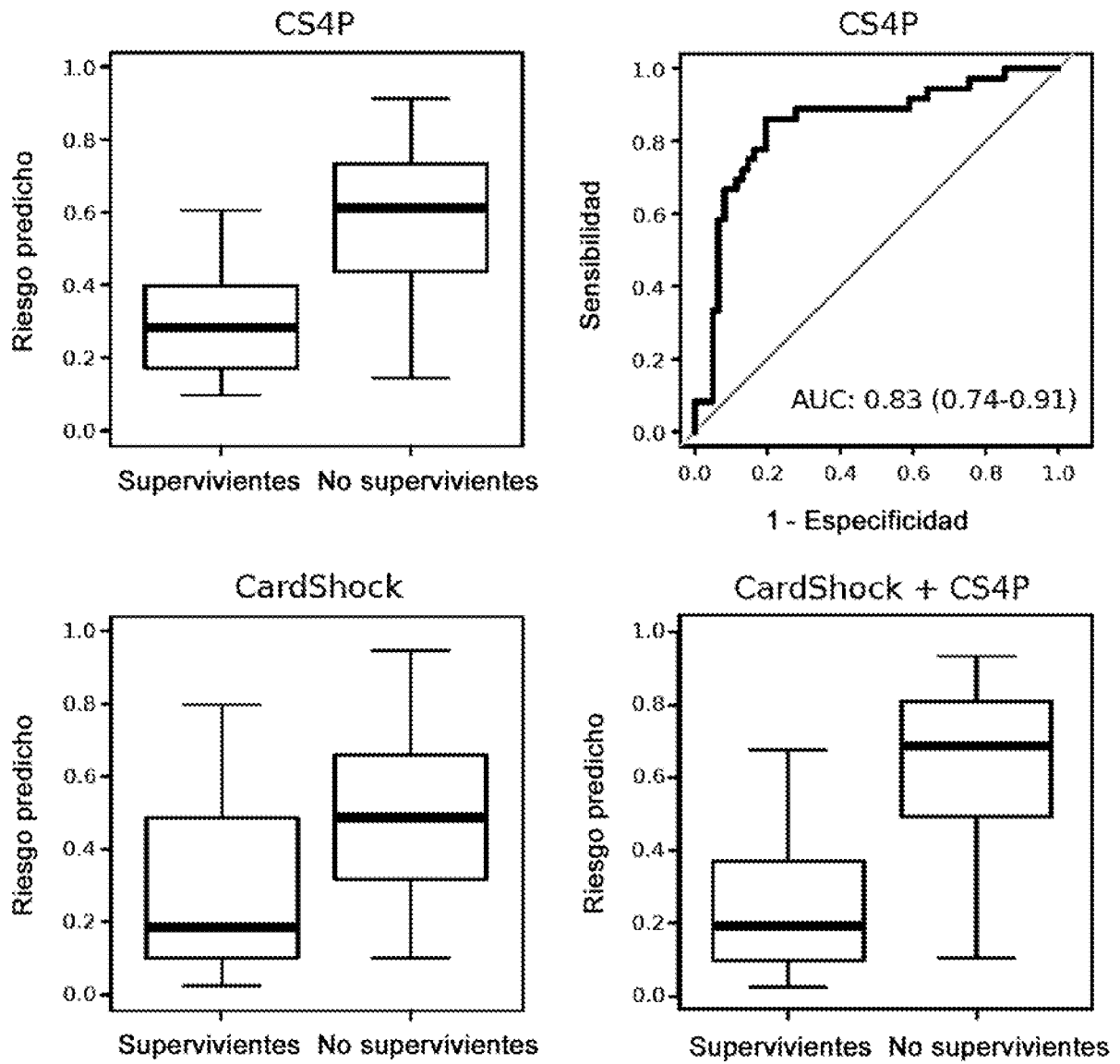


Fig. 4

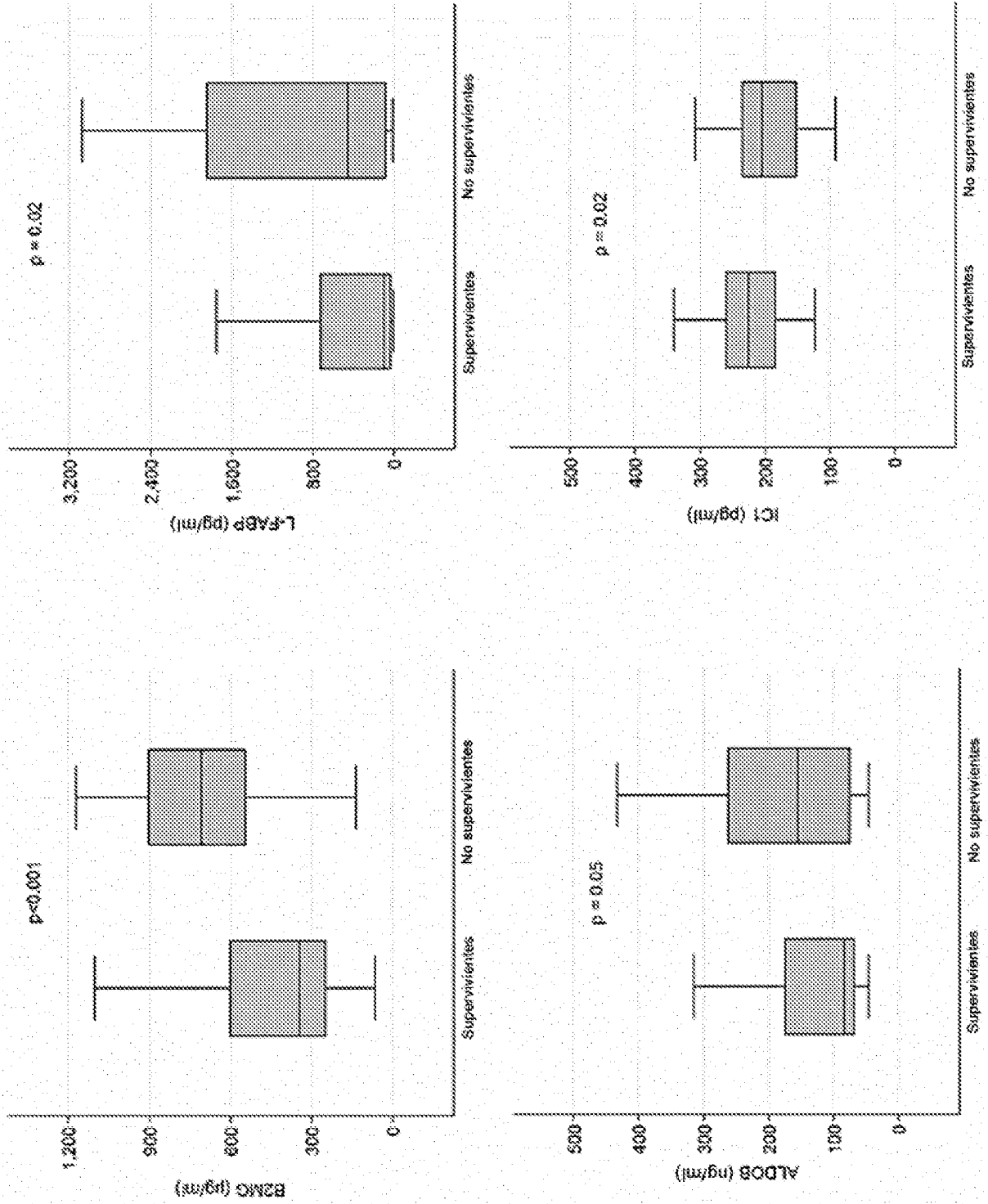


Fig. 5

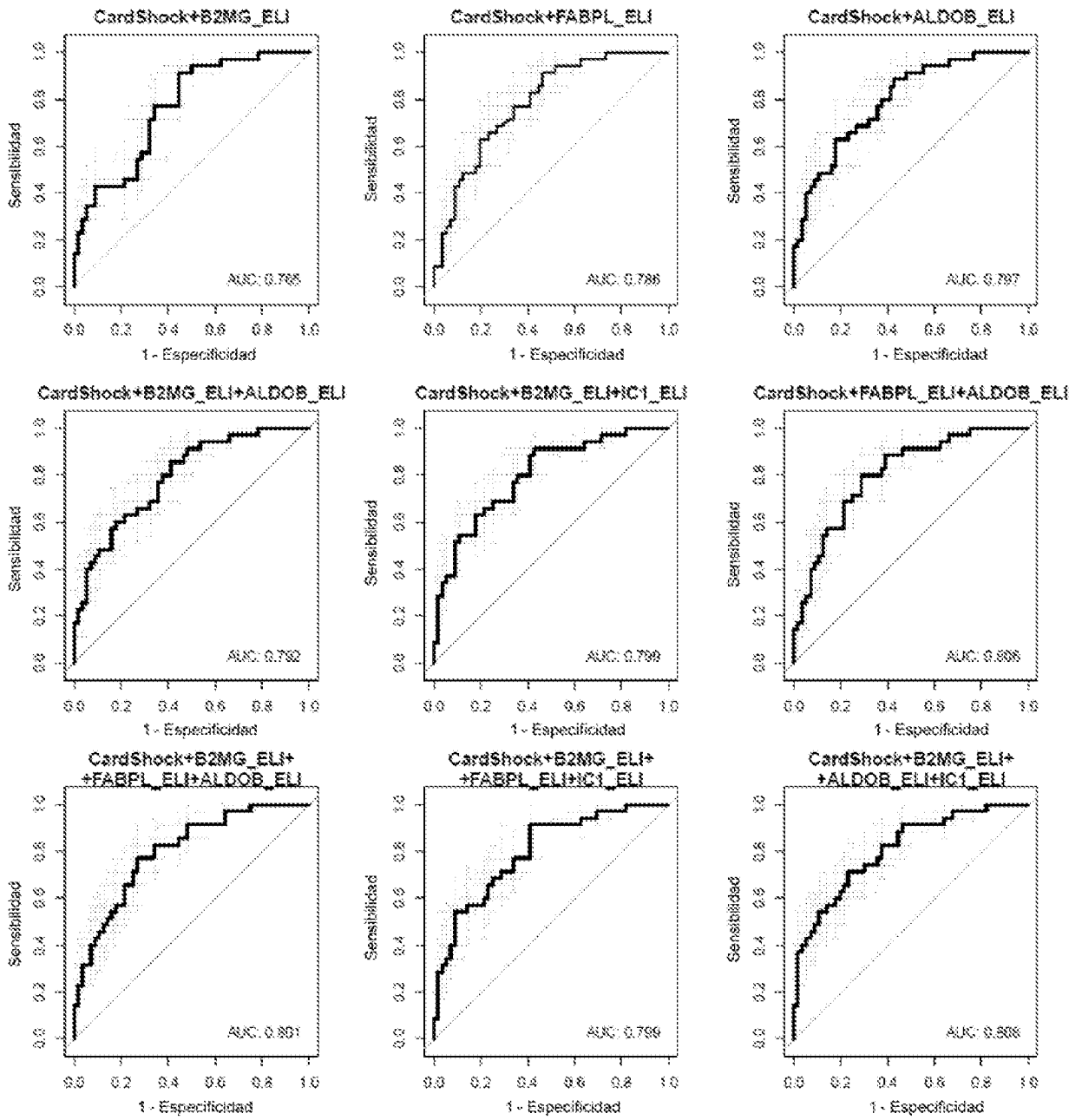


Fig. 5 (cont.)

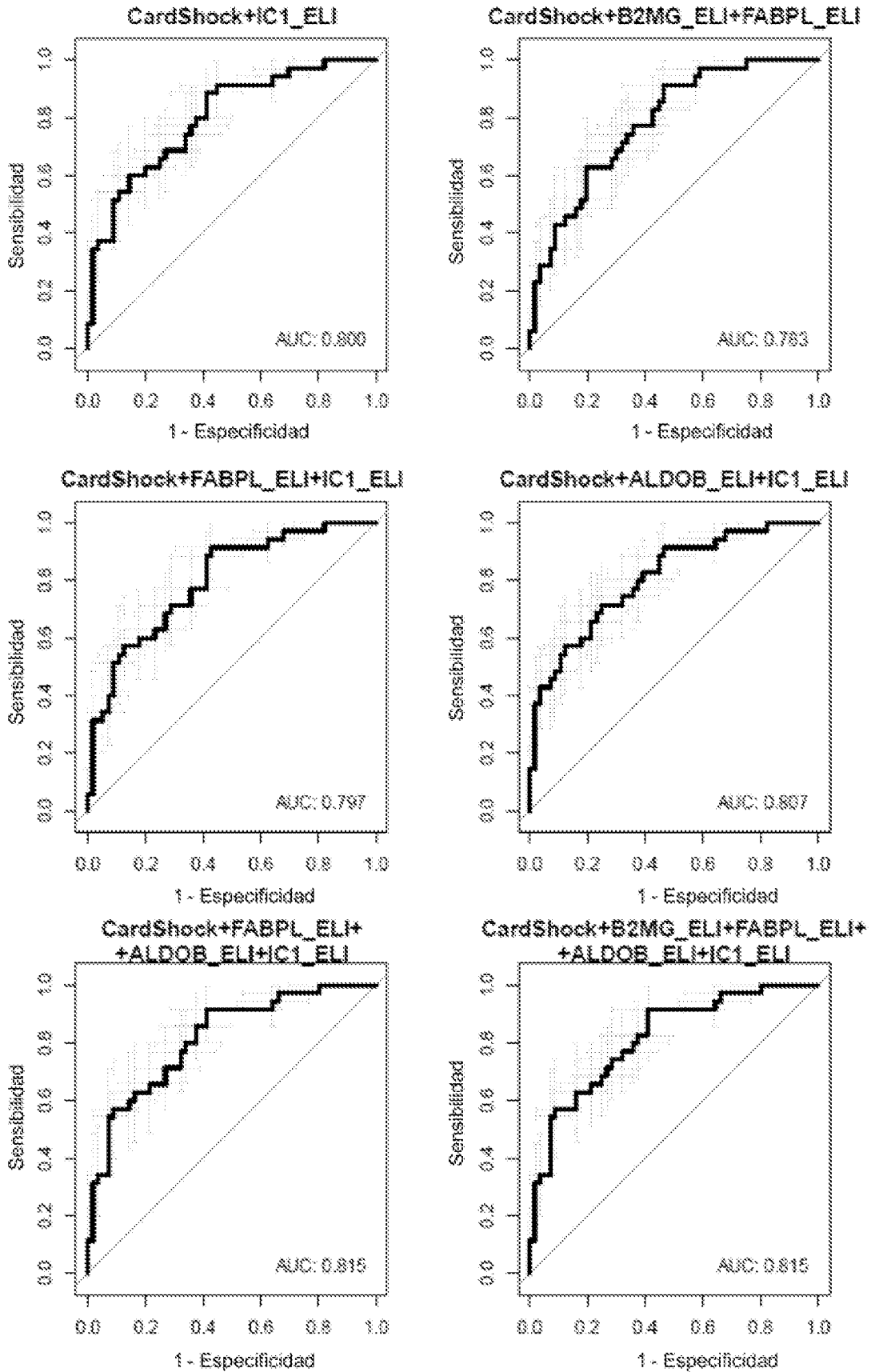


Fig. 6

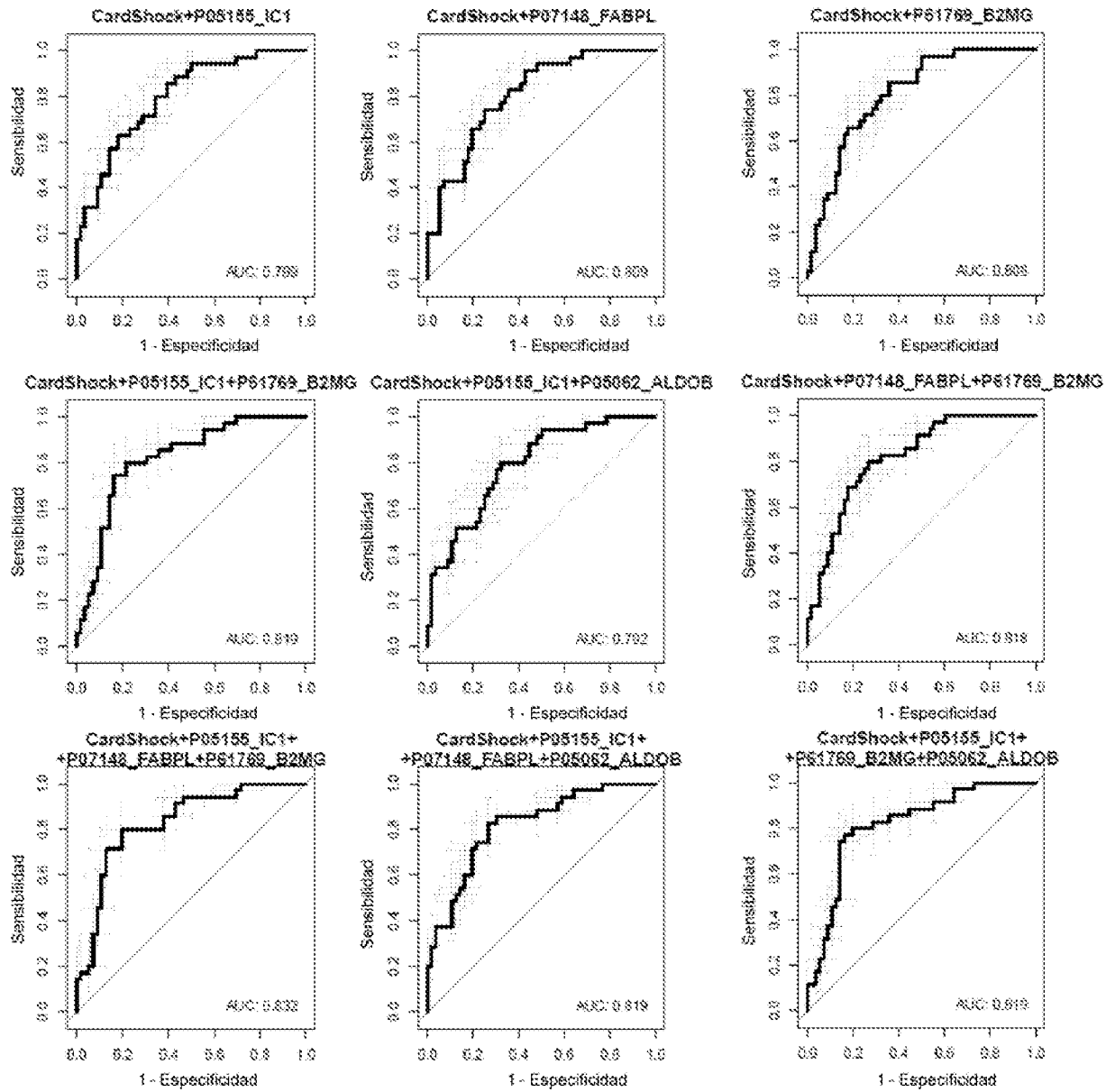


Fig. 6 (cont.)

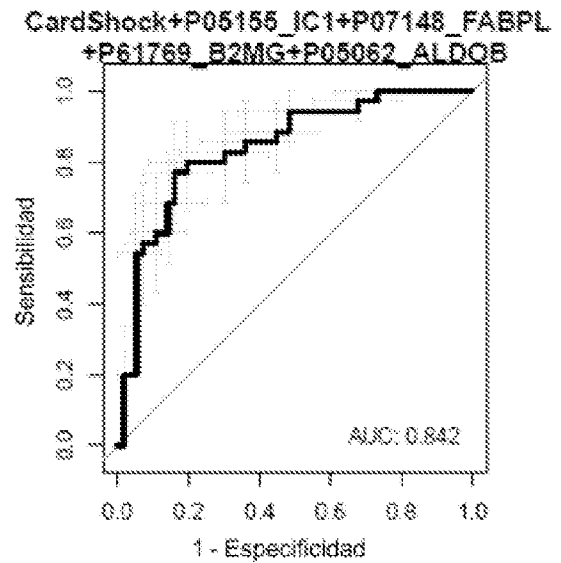
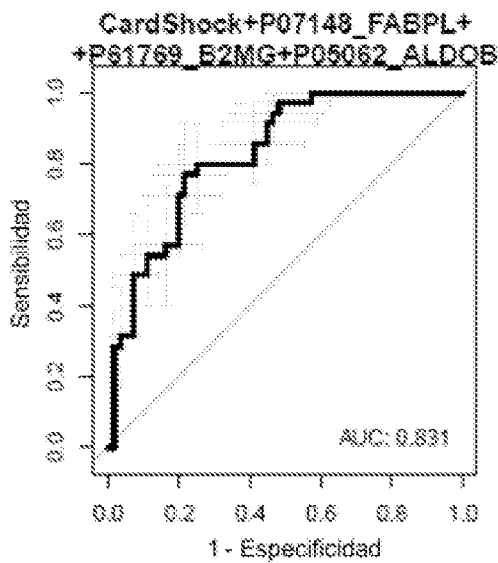
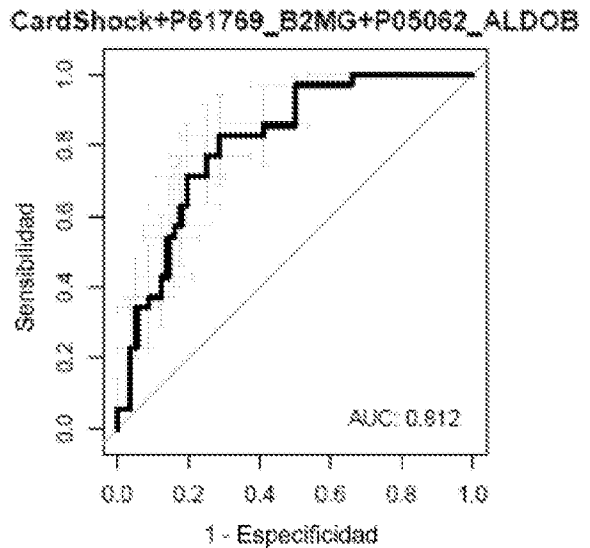
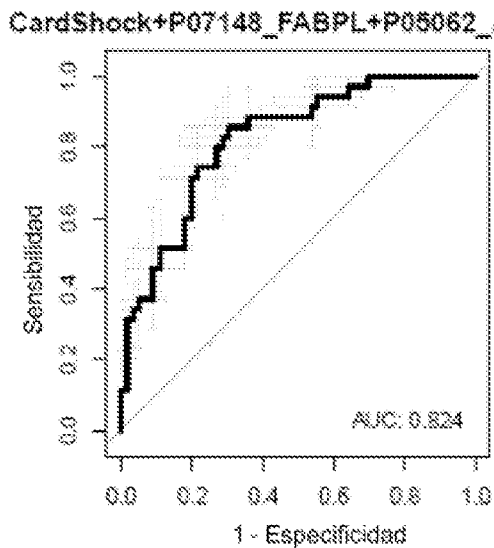
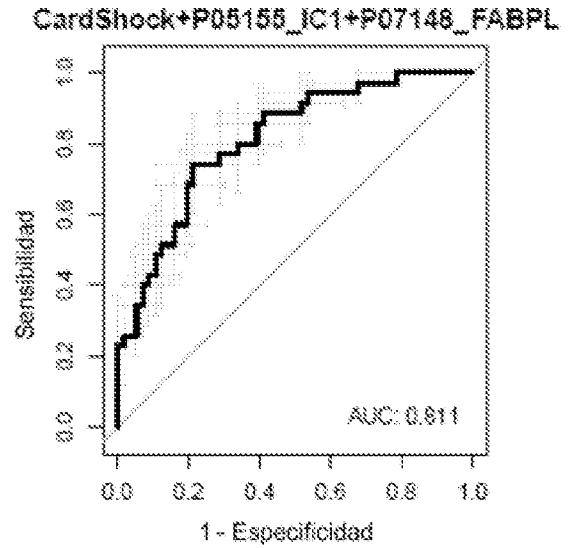
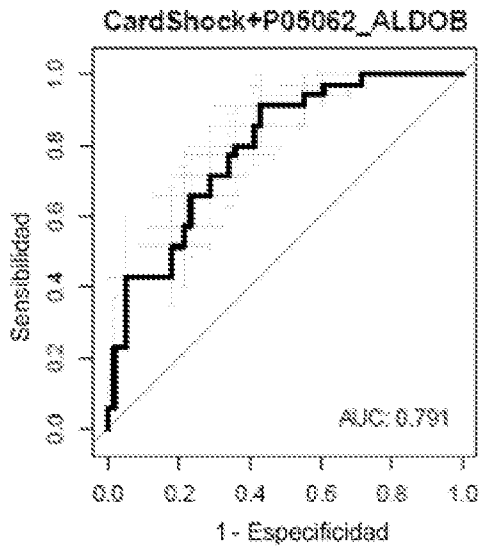


Fig. 7

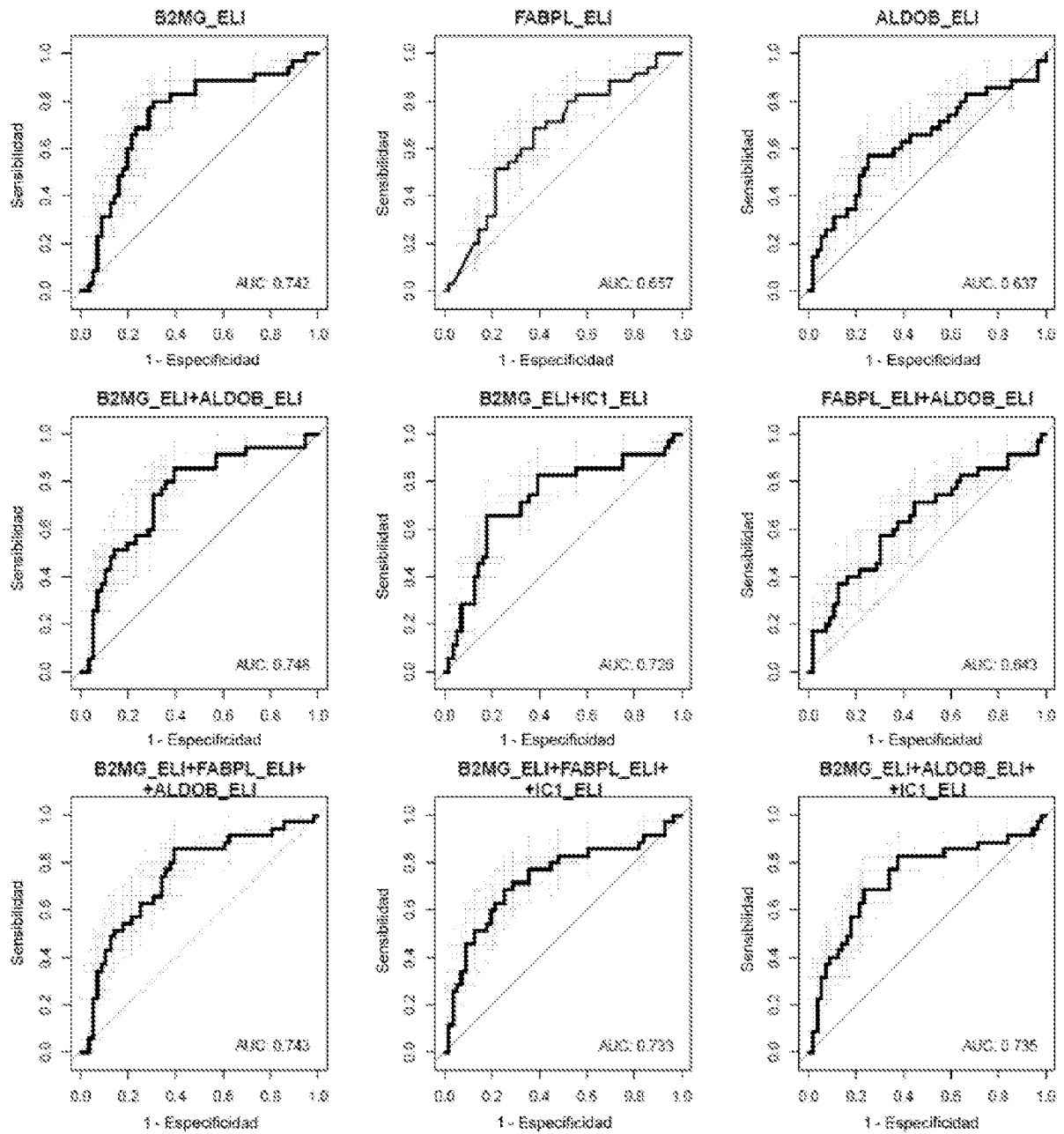


Fig. 7 (cont.)

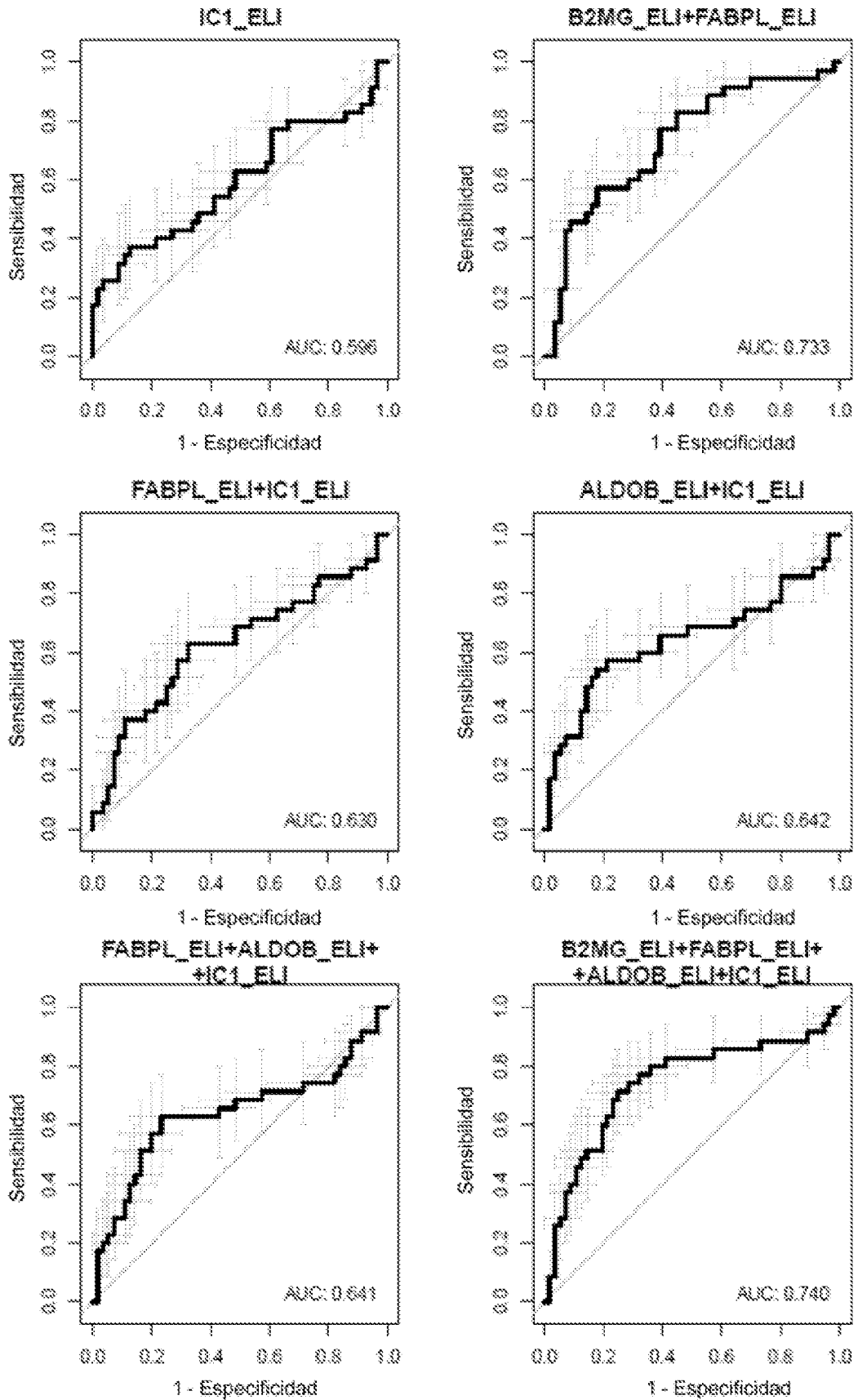


Fig. 8

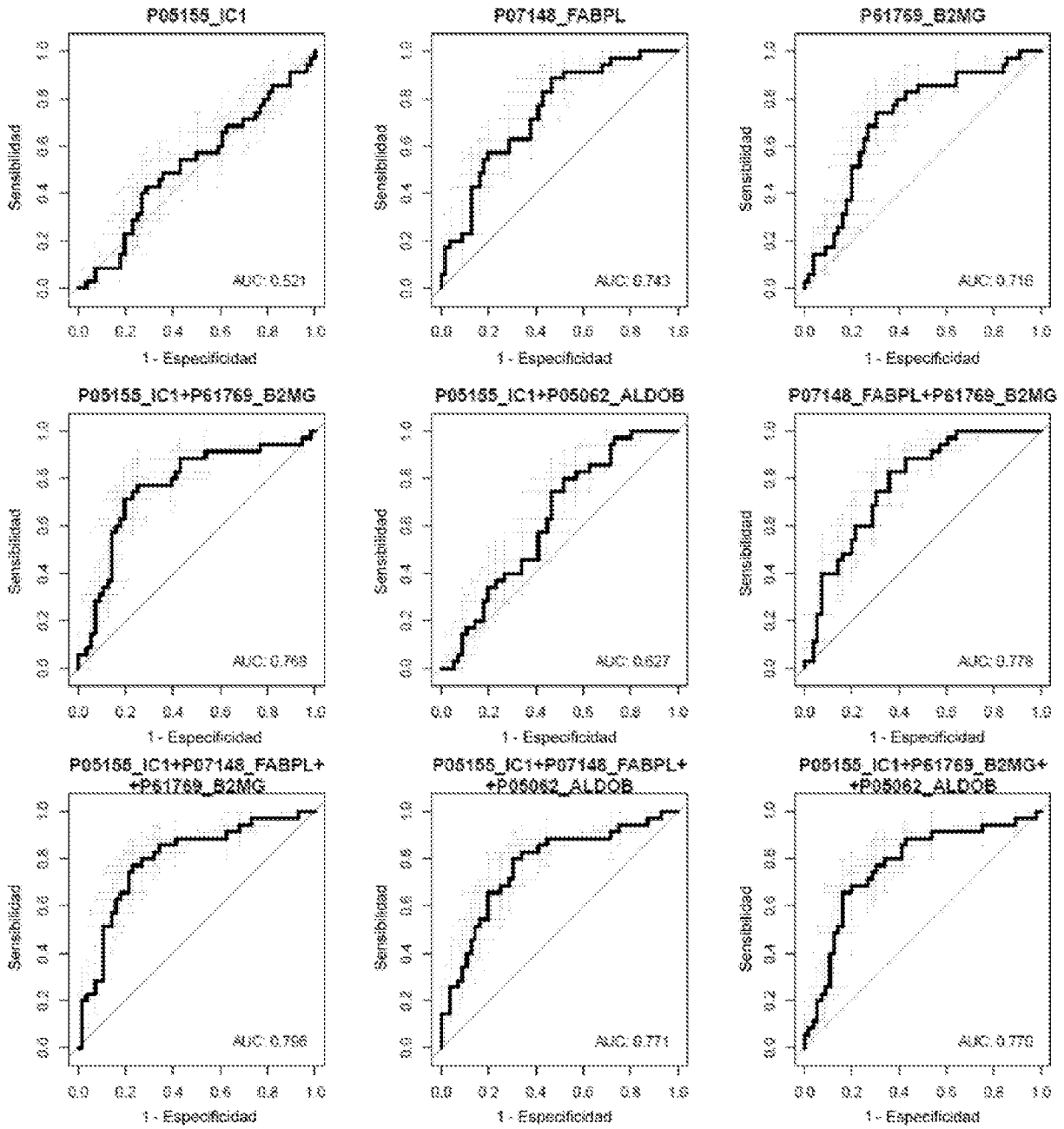


Fig. 8 (cont.)

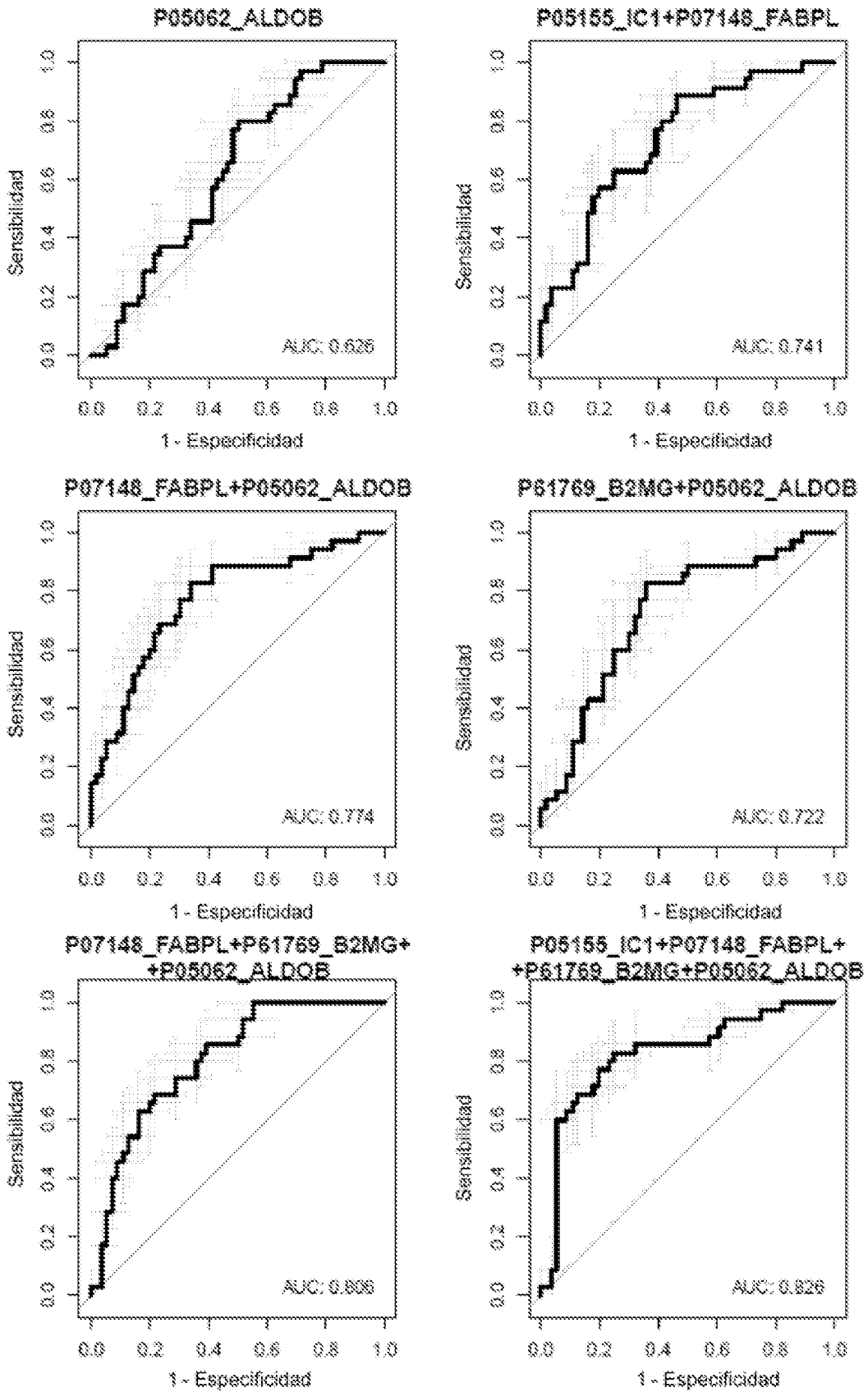


Fig. 9

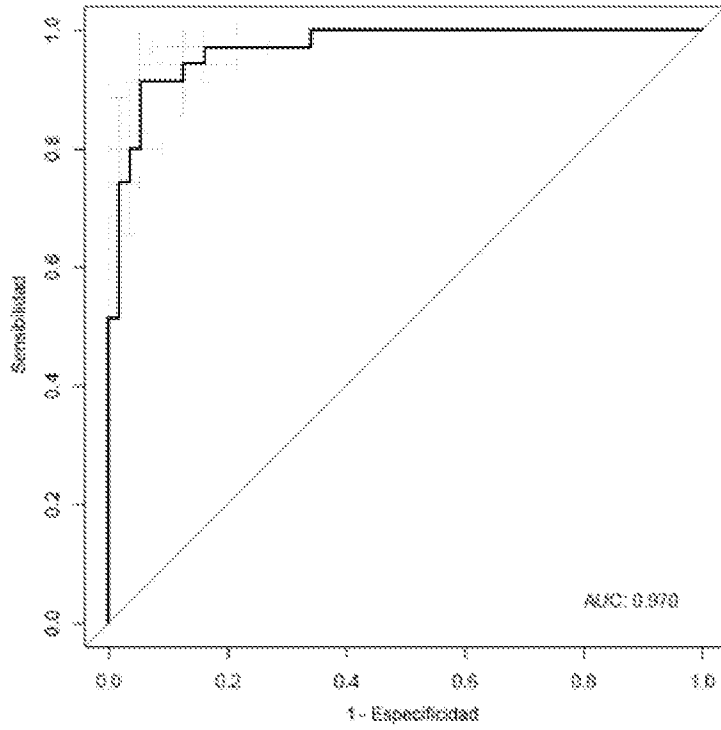


Fig. 10

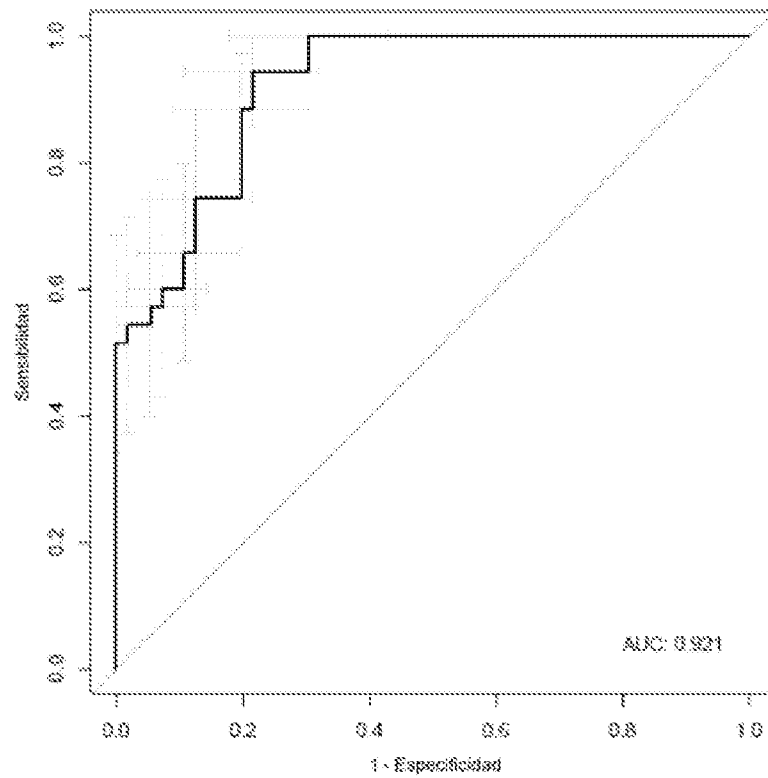


Fig. 11

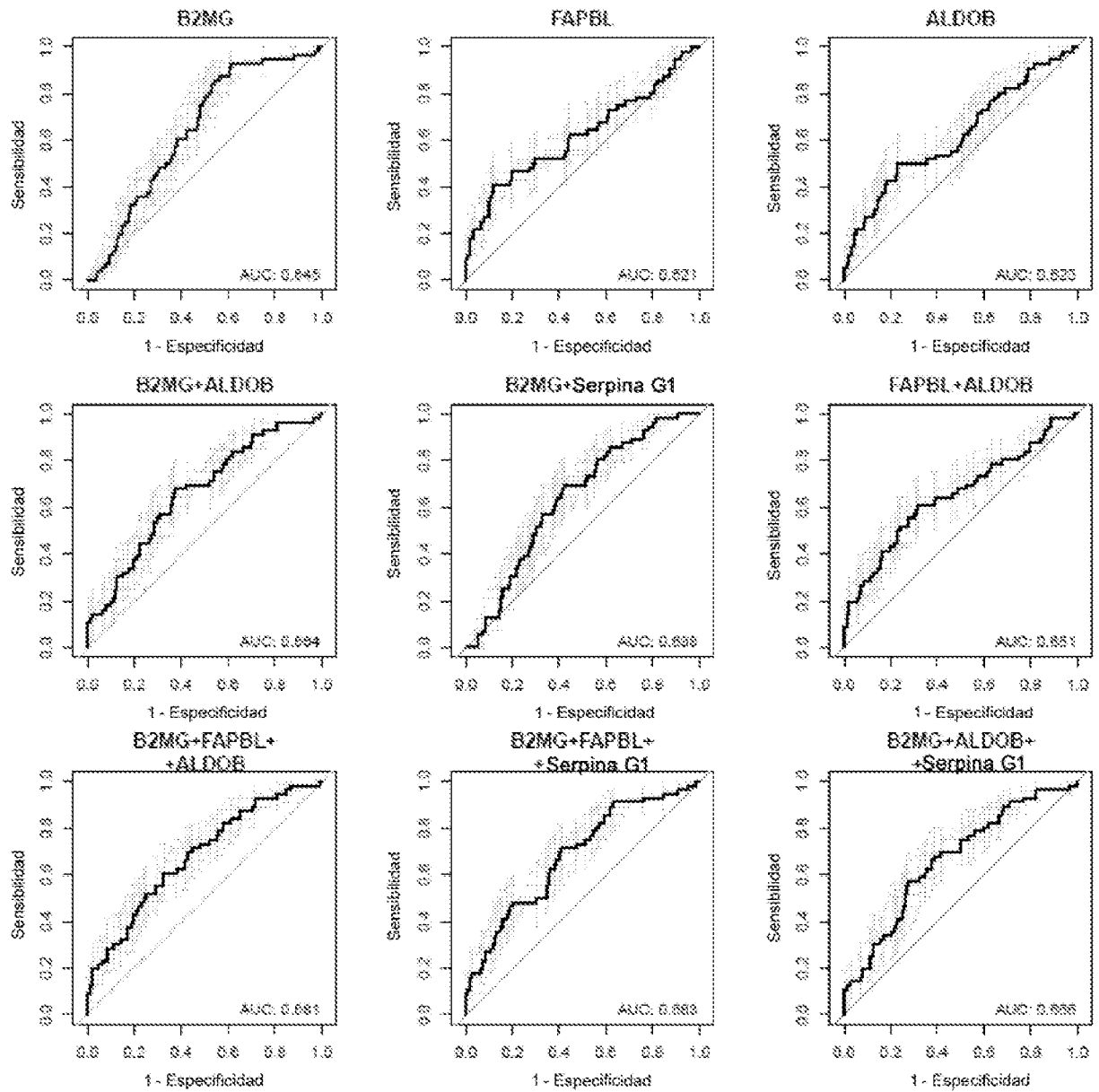


Fig. 11 (cont.)

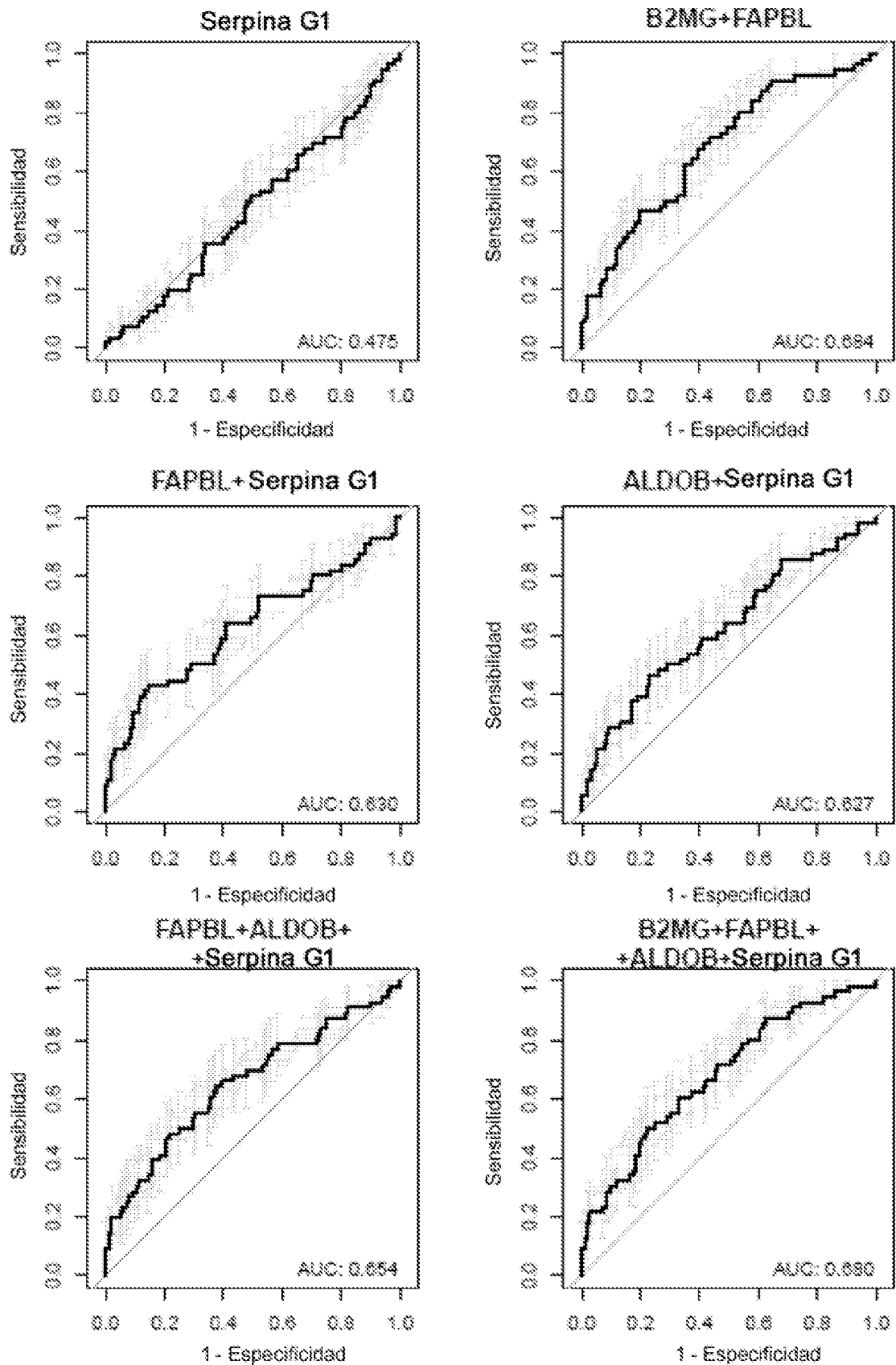


Fig. 12

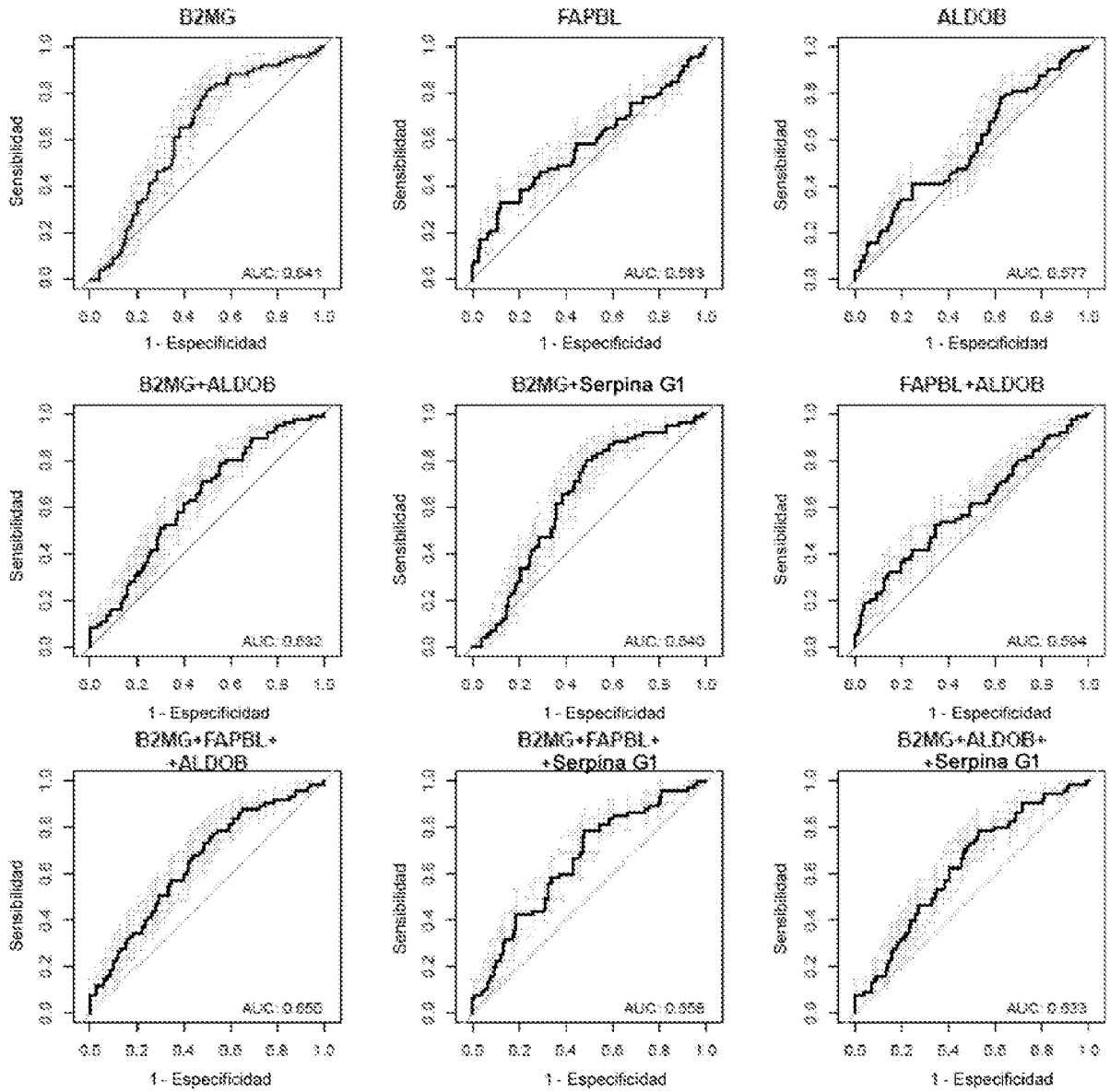


Fig. 12 (cont.)

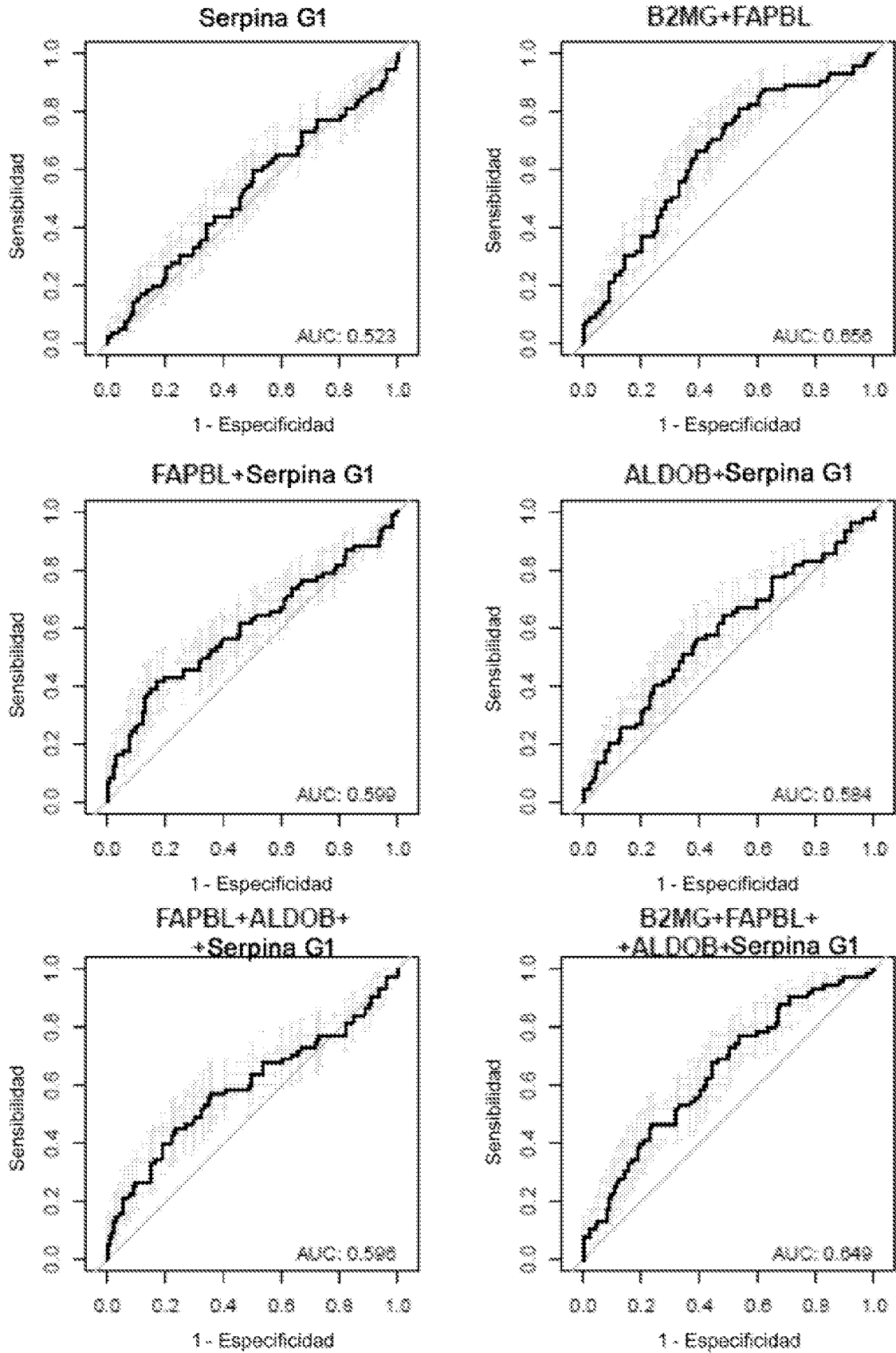


Fig. 13

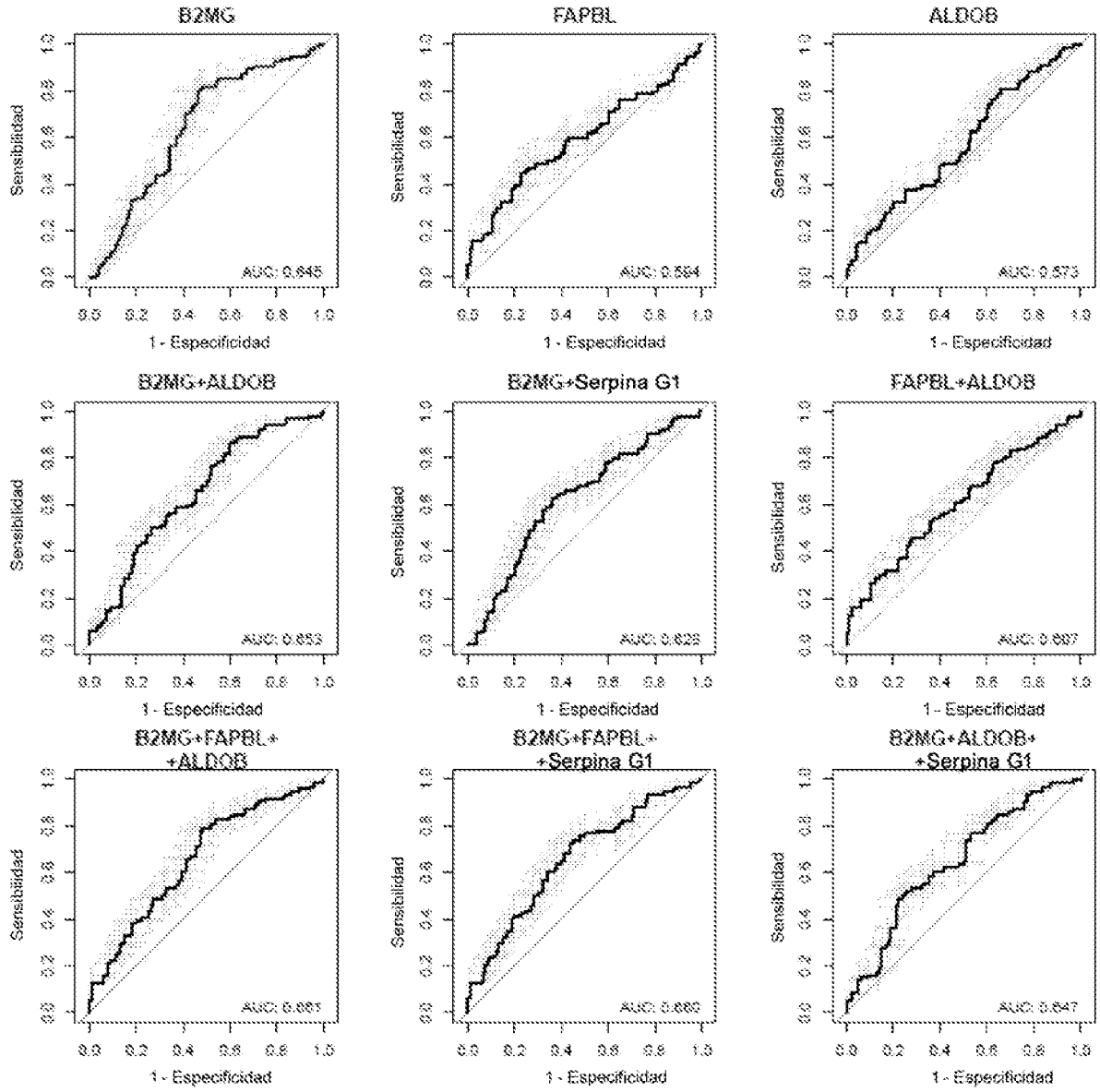


Fig. 13 (cont.)

