



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 315 034**

⑫ Número de solicitud: 200401621

⑬ Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **02.07.2004**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2009**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.2009

⑱ Solicitante/s: **LABORATORIOS INDAS, S.A.**
Camino de las Huertas, 2-Edificio Indas
28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, ES

⑲ Inventor/es: **Egido, Jesús y**
Vivanco, Fernando

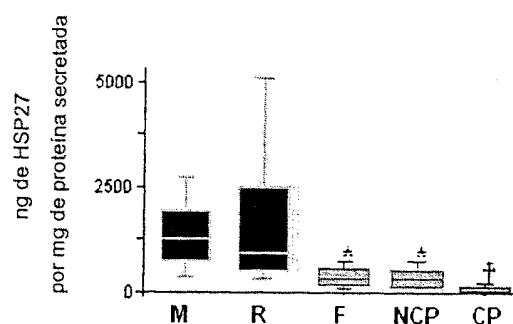
⑳ Agente: **Carpintero López, Francisco**

㉑ Título: **Proteína de choque térmico 27 (HSP-27) como marcador de enfermedad cardiovascular.**

㉒ Resumen:

Proteína de choque térmico 27 (HSP-27) como marcador de enfermedad cardiovascular.

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* útil para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o para pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular y/o para evaluar la eficacia de tratamiento reductor del riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína de choque térmico-27 (HSP27, Heat Shock Protein-27).



ES 2 315 034 A1

DESCRIPCIÓN

Proteína de choque térmico 27 (HSP-27) como marcador de enfermedad cardiovascular.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona en general con el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares. En particular, se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* para identificar el riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular.

10 **Antecedentes de la invención**

Las enfermedades cardiovasculares tienen una gran relevancia en los países occidentales ya que además de ser la causa principal de mortalidad (1), originan un alto grado de discapacidad y una gran repercusión socioeconómica, por lo que su prevención es un área de gran importancia para la salud pública. El término enfermedad cardiovascular designa enfermedades cardíacas y de los vasos sanguíneos incluyendo aterosclerosis, enfermedades coronarias, cerebrovasculares e hipertensión arterial, entre otros.

Algunos trastornos cardiovasculares como infarto de miocardio o isquemia están asociados con la aterosclerosis. En el proceso de aterogénesis, el acúmulo de lípidos en la pared vascular, secundario a la disfunción endotelial, actúa como un estímulo desencadenante de una reacción que llevará a la formación de una cápsula fibrosa que envolverá a un núcleo lipídico central. Las placas pueden complicarse con la formación de un trombo que, si ocluye total ó parcialmente el vaso, dará lugar a un síndrome coronario agudo: angina inestable, infarto agudo de miocardio ó muerte súbita.

Es importante destacar que aunque se han hecho grandes avances en el conocimiento de los mecanismos involucrados en este proceso, no se está utilizando en la actualidad ningún marcador en el diagnóstico de esta enfermedad. Se han realizado multitud de estudios analizando diversas proteínas séricas y sólo la proteína C reactiva (C Reactive Protein; CRP), un marcador general de inflamación, parece tener cierto valor predictivo de enfermedad vascular (2-7). Recientemente se ha demostrado que durante los estadios tempranos de la aterosclerosis carotídea, la concentración de CRP es un marcador de la actividad más que de la extensión de la aterosclerosis (8). Además, estudios recientes parecen sugerir que la CRP puede ser más un mediador de la aterosclerosis que un marcador de la enfermedad (9-13). A pesar de esto, datos recientes muestran que su capacidad predictiva es moderada (14), y sigue sin ser usada en la práctica habitual en la mayoría de los centros hospitalarios.

Las proteínas de choque térmico o "Heat Shock Proteins" (HSPs) se producen en grandes cantidades por las células como respuesta al estrés mecánico, a la estimulación con citoquinas o a las altas temperaturas, para protegerse de estas condiciones adversas. (15). Las HSPs se clasifican por su tamaño molecular, incluyendo la HSP27, HSP60, HSP70 y HSP90, entre otras (16). En los últimos años, se ha evidenciado la participación de las HSPs en el proceso aterosclerótico. Así, se ha observado que las HSPs están expresadas en las lesiones ateroscleróticas (17-19), aunque el papel que desempeñan estas proteínas en la aterosclerosis no está totalmente aclarado.

La identificación temprana de pacientes con riesgo de desarrollar un trastorno o evento cardiovascular sería de gran importancia ya que disminuiría la mortalidad y morbilidad asociada a esta enfermedad. La existencia en los servicios hospitalarios de tests específicos para el estudio de riesgo de trastorno o evento cardiovascular, podría ser de gran ayuda para la prevención y posible profilaxis de dicha enfermedad.

La presente invención proporciona un método *in vitro* de diagnóstico y/o pronóstico para identificar un perfil de riesgo de enfermedad cardiovascular de manera rápida, sencilla y eficaz. Esta invención es útil para identificar individuos con riesgo de sufrir un trastorno cardiovascular y útil para evaluar la eficacia de los tratamientos con fármacos que reducen el riesgo de trastorno cardiovascular.

Objeto de la invención

La presente invención proporciona un método de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno cardiovascular y/o un método *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína de choque térmico-27 (HSP27, Heat Shock Protein-27).

Un objeto de la invención lo constituye un método de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en particular la determinación de los niveles de la proteína se realiza en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un método de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los

niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un fluido fisiológico, más particularmente es sangre, suero, plasma u orina.

5 Otro objeto particular de la invención lo constituye un método de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un extracto celular, o un cultivo celular, o células.

10 Otro objeto particular de la invención lo constituye un método de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un tejido o extracto tisular.

15 La presente invención proporciona un test de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27.

20 Un objeto de la invención lo constituye un test de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en particular la determinación de los niveles de la proteína se realiza en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular.

25 Otro objeto particular de la invención lo constituye un test de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un fluido fisiológico, más particularmente es sangre, suero, plasma u orina.

30 Otro objeto particular de la invención lo constituye un test de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un extracto celular, o un cultivo celular, o células.

35 Otro objeto particular de la invención lo constituye un test de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un tejido o extracto tisular.

40 La presente invención proporciona un kit de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular, que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27.

45 Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular, que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27. Más en particular el kit contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular.

50 Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante un ensayo ELISA.

55 Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante western blot.

60 Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la

ES 2 315 034 A1

proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante espectrometría de masas.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante anticuerpos específicos.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante microarrays de proteínas.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP27, en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante un ensayo PCR para un precursor genético de la proteína HSP27.

La presente invención proporciona un método diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27.

Un objeto de la invención lo constituye un método de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular, el agente farmacológico es un agente anti-hipertensivo, anti-inflamatorio, antitrombótico, antiplaquetario, fibrinolítico, agentes reductores de lípidos, inhibidores directos de la trombina, inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa, bloqueantes de los canales de calcio, bloqueantes de los receptores alfa o beta adrenérgicos, inhibidores de la cicloxigenasa-2 o sistemas inhibidores de la angiotensina.

Otro objeto de la invención lo constituye un método de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular el trastorno cardiovascular está asociado a la enfermedad aterosclerótica, y/o hipertensión y/o hiperlipidemia y/o enfermedad coronaria y/o enfermedad cerebrovascular.

Otro objeto de la invención lo constituye un método de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular la determinación de los niveles de la proteína se realiza en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular.

Otro objeto de la invención lo constituye un método de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular la determinación de los niveles de la proteína se realiza en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un fluido fisiológico, más particularmente es sangre, suero, plasma u orina.

Otro objeto de la invención lo constituye un método de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular la determinación de los niveles de la proteína se realiza en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un extracto celular, o un cultivo celular, o células.

Otro objeto de la invención lo constituye un método de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular la determinación de los niveles de la proteína se realiza en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un tejido o extracto tisular.

La presente invención proporciona un test de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27.

Un objeto de la invención lo constituye un test de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular, el agente farmacológico es un agente anti-hipertensivo, anti-inflamatorio, antitrombótico, antiplaquetario, fibrinolítico, agentes reductores de lípidos, inhibidores directos de la trombina, inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa, bloqueantes de los canales de calcio, bloqueantes de los receptores alfa o beta adrenérgicos, inhibidores de la cicloxigenasa-2 o sistemas inhibidores de la angiotensina.

Otro objeto de la invención lo constituye un test de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular el trastorno cardiovascular está asociado a la enfermedad aterosclerótica, y/o hipertensión y/o hiperlipidemia y/o enfermedad coronaria y/o enfermedad cerebrovascular.

Otro objeto de la invención lo constituye un test de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular la determinación de los niveles de la proteína se realiza en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular.

Otro objeto de la invención lo constituye un test de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular la determinación de los niveles de la proteína se realiza en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un fluido fisiológico, más particularmente es sangre, suero, plasma u orina.

Otro objeto de la invención lo constituye un test de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular la determinación de los niveles de la proteína se realiza en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un extracto celular, o un cultivo celular, o células.

Otro objeto de la invención lo constituye un test de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular, mediante la determinación de la proteína HSP27. En particular la determinación de los niveles de la proteína se realiza en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indican la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, la muestra biológica es un tejido o extracto tisular.

La presente invención proporciona un kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27. Más en particular el kit contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento o evento para reducir el riesgo de trastorno cardiovascular que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante un ensayo ELISA.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento o evento para reducir el riesgo de trastorno cardiovascular que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante western blot.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento o evento para reducir el riesgo de trastorno cardiovascular que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante espectrometría de masas.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento o evento para reducir el riesgo de trastorno cardiovascular que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante anticuerpos específicos.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento o evento para reducir el riesgo de trastorno cardiovascular que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante microarrays de proteínas.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento o evento para reducir el riesgo de trastorno cardiovascular que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular. Más en particular, el kit contiene los reactivos necesarios para determinar la proteína HSP27 mediante un ensayo PCR para un precursor genético de la proteína HSP27.

Descripción de las figuras

Figura 1

La figura muestra los geles de la electroforesis bidimensional (2-DE) de los secretomas de la arteria control A, y de la placa complicada B. Los círculos muestran las dos bandas correspondientes a la HSP27 que se corresponden con los diferentes estados de fosforilación.

Figura 2

La figura muestra los resultados del Western-blot para HSP27 (A), HSP60 (B) y HSP70 (C). En las muestras control (1-3) y en las muestras de carótidas (4-6).

Figura 3

Cuantificación de la proteína HSP27 por ELISA: M: mamaria, R: radial, F: femoral, NCP: placa no complicada de carótida, CP: placa complicada de carótida.

Figura 4

Niveles plasmáticos de la proteína HSP27 en pacientes ateroscleróticos e individuos control.

Figura 5

Niveles plasmáticos de la proteína HSP27 en individuos sanos y en pacientes hipertensos.

Figura 6

Expresión de HSP27 en arterias humanas.

Descripción detallada de la invención

Los inventores realizaron un experimento en el que compararon los niveles de la proteína HSP27 secretada por placas ateroscleróticas y arterias normales. Para ello, se incubaron muestras procedentes de endarterectomías y de arterias control en un medio de cultivo libre de proteínas que permitía estudiar de manera independiente las proteínas liberadas por las áreas sanas y lesionadas. A continuación se procedió a la determinación de la proteína HSP27 mediante diferentes técnicas conocidas por el estado de la técnica (análisis proteómico, Western blot, ELISA y análisis inmunohistoquímico). Sorprendentemente, los investigadores comprobaron los niveles de HSP27 secretados por las placas ateroscleróticas habían descendido drásticamente comparados con los niveles de las arterias control.

Las muestras de tejido fueron obtenidas de 28 pacientes (estenosis carotídea > 70%, 21 hombres/7 mujeres; edad = 68 ± 9 años, 86% hipertensos, 39% diabéticos, 54% hiperlipídicos) que se sometieron a una endarterectomía. Se tomaron muestras de sangre de los pacientes endarterectomizados y de voluntarios sanos sin diferencias significativas de sexo y edad. Se recogió el medio condicionado de 36 arterias control (24 mamaria, 12 radial) y 35 endarterectomías ateroscleróticas (10 femoral, 25 carótida).

Las muestras fueron cortadas e incubadas por separado durante 24 horas en un medio PRMI libre de suero a 37°C. Se recogió el medio condicionado, se centrifugó y la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

5 La invención puede ser mejor entendida con la explicación de los siguientes términos:

“Enfermedad cardiovascular” designa: enfermedades cardíacas y de los vasos sanguíneos incluye pero no limita aterosclerosis, hipertensión arterial, enfermedades coronarias, enfermedades cerebrovasculares o enfermedades periféricas.

10 “Proteína de choque térmico-27” designa isoformas, modificaciones postraduccionales, formas truncadas o fragmentos de la proteína HSP27.

15 “Determinación de la proteína HSP27” designa tanto determinación cuantitativa como cualitativa, mediante las técnicas conocidas por el estado de la técnica, incluyendo pero no excluyendo, análisis proteómico, Western blot, ELISA, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas, anticuerpos específicos, microarrays o ensayo PCR (Polymerase Chain Reaction) para un precursor genético de la proteína.

20 Ejemplos

Ejemplo 1

Análisis proteómico

25 600 µg de proteínas se precipitaron con 10% ácido tricloroacético en acetona con 0.07% de 2-mercaptoetanol (1 h, -20°C) y se lavó con acetona fría (-20°C, 20 min) antes de que la electroforesis bidimensional (2-DE) se realizara. Los péptidos de las proteínas digeridas fueron analizados en un espectrómetro de masas Voyager DE STR MALDI-TOF (Perspective Biosystem). Las proteínas fueron identificadas utilizando el programa MASCOT y las bases de datos de secuencias proteicas de SWISS PROT y NCBI. Los fosfopéptidos fueron caracterizados por Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) y por Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)(20) combinada con MALDI Q-TOF MS/MS (20-22).

35 El análisis 2-DE de los secretomas de las muestras de endarterectomía carotídea versus arterias mamarias control y la identificación de HSP27 por espectrometría de masas (MS), muestran que la secreción de HSP27 era diferente en ambas muestras (figura 1). Las isoformas de HSP27 fueron caracterizadas por análisis LC-MS/MS. Las señales correspondientes del péptido QLpS82SGVSEIR (m/z: 578.24(+2)) para la proteína HSP27 de la mancha 1 y QLS82SGVSEIR (m/z: 538.25 (+2)) de la mancha 2, demostraron que HSP27 en el mancha 1 estaba fosforilada. Los resultados fueron confirmados por IMAC y MALDI MS/MS (21-22).

40

Ejemplo 2

Western blot

45 Se cargaron 15 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 12% y se realizó la electroforesis como se describe (23). Los Blots fueron incubados con anticuerpos anti-HSP27 (sc-9012, Santa Cruz), anti-HSP60 (sc-1052) y anti-HSP70 (SPA-812 Stressgen).

50 Los análisis por Western blot mostraron que la secreción de HSP27 es menor en placas ateroscleróticas (femoral: F, placas carótidas no complicadas: NCP, placas carótidas complicadas: CP) comparada con las arterias control (mamaria: M, radial: R) (Fig. 2).

55 Ejemplo 3

ELISA

60 Se midieron los niveles de HSP27 soluble de tejido y plasma mediante un ELISA cuantitativo utilizando un kit comercial (Oncogene). Los resultados demostraron que los niveles de HSP27 secretados por las placas ateroscleróticas, eran menores que los secretados por las placas control M: 1243 (734-1909), R: 910(505-2508); F: 303(138-526); NCP: 315 (119-515); CP: 33 (17-111) (Fig 3).

65

Ejemplo 4

Preparación de antígeno para el ensayo ELISA

a. *Expresión y purificación del antígeno de interés*

El tejido de partida fueron células endoteliales. Se realizó una extracción de RNA total, posteriormente se obtuvieron los mensajeros específicos (mRNA) y mediante RT-PCR se obtuvo el cDNA, que fue amplificado mediante la utilización de cebadores específicos.

Una vez obtenidos los productos de PCR, se clonaron en el plásmido pGEM (Invitrogen); a continuación, verificamos mediante secuenciación y se continuó con el desarrollo del proceso.

A continuación se clonaron en dos tipos de vectores, para expresarlo en dos sistemas de expresión diferentes (bacterias y levaduras).

b. *Expresión y purificación del antígeno de interés en bacterias*

El vector de expresión del antígeno recombinante se obtuvo por la inserción del antígeno, obtenido a partir del pGEM-ANTÍGENO, en el vector pGEX4T3 (Amersham Biosciences). El plásmido resultante fue introducido por transformación en la cepa de *Escherichia coli* BL21 Codon+ RIL (Stratagen) que dio lugar a la proteína de fusión GST-ANTÍGENO.

Las bacterias se lisaron y se realizó la extracción de la proteína de fusión GST-ANTÍGENO de los cuerpos de inclusión. Posteriormente se pasó por una columna de afinidad (Glutathione- Sepharose 4B, Amersham Biosciences) y se digirió con trombina (Sigma).

Las proteínas fueron purificadas del homogeneizado obtenido mediante una cromatografía de intercambio iónico en una columna Mono Q (Amersham Biosciences) y otra posterior de penetrabilidad (Superdex 75; Amersham Biosciences), ambas utilizando un equipo automático FPLC.

El proceso de purificación del antígeno fue validado mediante la realización de ensayos de inmunodetección en cada paso utilizando para ello anticuerpos específicos.

c. *Expresión y purificación del antígeno de interés en levaduras (*Pichia pastoris*)*

El fragmento obtenido por PCR fue subclonado en el vector pBluescript y posteriormente en el vector de expresión en levaduras pGAP za.

Una vez clonado se llevó a cabo la expresión en *Pichia pastoris* en condiciones óptimas y a continuación se realizó el proceso de purificación.

El primer paso de purificación se hizo mediante una cromatografía de afinidad usando como soporte una matriz de Sepharose 4B (Amersham Biosciences). El segundo paso de purificación se llevó a cabo utilizando una cromatografía de intercambio iónico en una columna Mono Q (Amersham Biosciences) y posteriormente una cromatografía de penetrabilidad como en el caso anterior (Superdex 75) utilizando el FPLC.

Al igual que en el caso de la expresión del antígeno en bacterias, el proceso de purificación fue validado con la realización de ensayos de inmunodetección en cada paso con la utilización de anticuerpos específicos.

Ejemplo 5

Medida de los niveles de HSP27 en plasma

Se midieron los niveles de HSP27 en plasma de pacientes con estenosis carotídea y controles sanos. Los niveles de HSP27 circulantes fueron 20 veces menores en los pacientes con aterosclerosis carotídea en relación con los sujetos sanos (Fig. 4). Los niveles de la proteína HSP27 se midieron también en el plasma de individuos sanos y en pacientes hipertensos, los niveles de la proteína HSP27 fueron significativamente menores en los pacientes hipertensos en relación con los sujetos sanos. (Fig. 5).

Ejemplo 6

Análisis inmunohistoquímico

Las muestras fueron fijadas con paraformaldehído integrado en parafina y la inmunohistoquímica se realizó en secciones de 4 μm como se describe (23) usando un anticuerpo policlonal de cabra anti- human HSP27 (sc-1049) y anti-SMC- α -actina (clone 1^a4, DAKO). Los resultados mostraron que tanto las placas ateroscleróticas como las arterias mamarias expresaron la proteína HSP27 (Fig. 6).

Referencias

1. **Murray CJ, Lopez AD.** Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349:1269-76.

2. **Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al:** The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 331:417-424, 1994.

3. **Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, et al.:** Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 99:855-860, 1999.

4. **Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al.** C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000; 342: 836-843.

5. **Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N.** Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA.* 2001; 285: 2481-2485.

6. **Ridker PM.** High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation.* 2001; 103: 1813-1818.

7. **Ridker PM, Rifai N, Rose L et al.** Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002; 347: 1557-1565.

8. **Hashimoto H, Kitagawa K, Hongaku H, Shimizu Y, Sakaguchi M, Nagai Y et al.** C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. *Circulation* 2001; 104:63-67.

9. **Verma S, Wang CH, Li SH, et al.** A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation.* 2002; 106: 913-919.

10. **Verma S, Li SH, Badiwala MV, et al.** Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation.* 2002; 105: 1890-1896.

11. **Wang CH, Li SH, Weisel RD, et al.** C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation.* 2003; 107: 1783-1790.

12. **Verma S, Wang CH, Weisel RD, et al.** Hyperglycemia potentiates the proatherogenic effects of C-reactive protein: reversal with rosiglitazone. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35: 417-419.

13. **Devaraj S, Xu DY, Jialal I.** C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 2003; 107: 398-404.

14. **Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V.** C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004 Apr 1;350(14):1387-97.

15. **Xu Q.** Role of Heat Shock Proteins in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1547.

16. **Benjamin, IJ, McMillan, DR.** Stress (Heat Shock) Proteins: Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res* 1998; 83:117-132.

17. **Johnson AD, Berberian PA, Tytell M, et al.** Differential distribution of 70-kD heat shock protein in atherosclerosis: Its potential role in arterial SMC survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 27-36.

18. **Kleindienst R, Xu Q, Willeit J et al.** Immunology of atherosclerosis: Demonstration of HSP60 expression and T lymphocytes bearing alpha/beta or gamma/delta receptor in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1993; 142: 1927-1937.

19. **Rocnik E, Chow LH, Pickering JG.** HSP47 is expressed in fibrous regions of human atheroma and is regulated by growth factors and oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*. 2000; 101: 1229-1233.

20. **Duran MC, Mas S, Martin-Ventura JL et al.** Proteomic analysis of human vessels: application to atherosclerotic plaques. *Proteomics*. 2003; 3:973-8.

21. **Stensballe A, Andersen S, Jensen ON.** Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics* 2001; 1:207-22.

22. **Bennett KL, Stensballe A, Podtelejnikov AV et al.** Phosphopeptide detection and sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2002; 37:179-90.

23. **Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Martin-Ventura JL, et al.** 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors decrease Fas ligand expression and cytotoxicity in activated human T lymphocytes. *Circulation*. 2003; 108:1506-13.

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno o evento cardiovascular **caracterizado** por la determinación de la proteína HSP27.

2. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende la determinación de los niveles de la proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular.

3. Método, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la muestra biológica es un fluido fisiológico.

4. Método, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el fluido fisiológico es sangre.

5. Método, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el fluido fisiológico es suero.

6. Método, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el fluido fisiológico es plasma.

7. Método, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el fluido fisiológico es orina.

8. Método, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la muestra biológica es una célula o un cultivo celular o un extracto celular.

9. Método, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la muestra biológica es un tejido o un extracto tisular.

10. Kit de diagnóstico *in vitro* para identificar un perfil de riesgo de trastorno o evento cardiovascular y/o pronosticar la evolución de un trastorno cardiovascular **caracterizado** porque contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27.

11. Kit de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica un riesgo de sufrir un trastorno o evento cardiovascular.

12. Kit de diagnóstico *in vitro*, según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante un ensayo ELISA.

13. Kit de diagnóstico *in vitro*, según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante un western blot.

14. Kit de diagnóstico *in vitro*, según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante espectrometría de masas.

15. Kit de diagnóstico *in vitro*, según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante anticuerpos específicos.

16. Kit de diagnóstico *in vitro*, según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante microarrays de proteínas.

17. Kit de diagnóstico *in vitro*, según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante un ensayo PCR para un precursor genético de la proteína HSP27.

18. Método de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento con agentes farmacológicos que disminuyen el riesgo de trastorno o evento cardiovascular **caracterizado** porque comprende la determinación de los niveles de proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica la eficacia o no de dicho tratamiento para reducir el riesgo de trastorno o evento cardiovascular.

19. Método, según la reivindicación 18, **caracterizado** porque el agente farmacológico es un agente antihipertensivo, antiinflamatorio, antitrombótico, antiplaquetario, fibrinolítico, agentes reductores de lípidos, inhibidores directos de la trombina, inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa, bloqueantes de los canales de calcio, bloqueantes de los receptores alfa o beta adrenérgicos, inhibidores de la ciclooxigenasa-2 o sistemas inhibidores de la angiotensina.

20. Método, según la reivindicación 18, **caracterizado** porque el trastorno o evento cardiovascular está asociado a la enfermedad aterosclerótica y/o hipertensión y/o hiperlipidemia y/o enfermedad coronaria y/o enfermedad cerebrovascular.

21. Método, según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la muestra biológica es un fluido fisiológico.

22. Método, según la reivindicación 21, **caracterizado** porque el fluido fisiológico es sangre.

ES 2 315 034 A1

23. Método de evaluación, según la reivindicación 21, **caracterizado** porque el fluido fisiológico es suero.

24. Método, según la reivindicación 21, **caracterizado** porque el fluido fisiológico es plasma.

5 25. Método, según la reivindicación 21, **caracterizado** porque el fluido fisiológico es orina.

26. Método, según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la muestra biológica es un extracto celular, o un cultivo celular o células.

10 27. Método, según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la muestra biológica es un tejido o extracto tisular.

28. Kit de diagnóstico *in vitro* para evaluar la eficacia de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno cardiovascular, **caracterizado** porque comprende la determinación de la proteína HSP27 en una muestra biológica, donde la alteración de los niveles de la proteína HSP27 indica la eficacia o no de un tratamiento para reducir el riesgo de trastorno cardiovascular.

29. Kit, según la reivindicación 28, **caracterizado** porque contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la proteína HSP27.

20 30. Kit, según la reivindicación 29, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante un ensayo ELISA.

31. Kit, según la reivindicación 29, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante western blot.

25 32. Kit, según la reivindicación 29, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante espectrometría de masas.

33. Kit, según la reivindicación 29, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante anticuerpos específicos.

34. Kit, según la reivindicación 29, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante microarrays de proteínas.

35 35. Kit, según la reivindicación 29, **caracterizado** porque la determinación de la proteína HSP27 se lleva a cabo mediante un ensayo PCR para un precursor genético de la proteína HSP27.

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

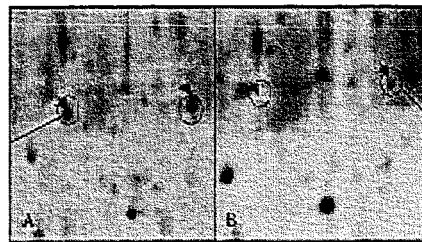


FIGURA 2

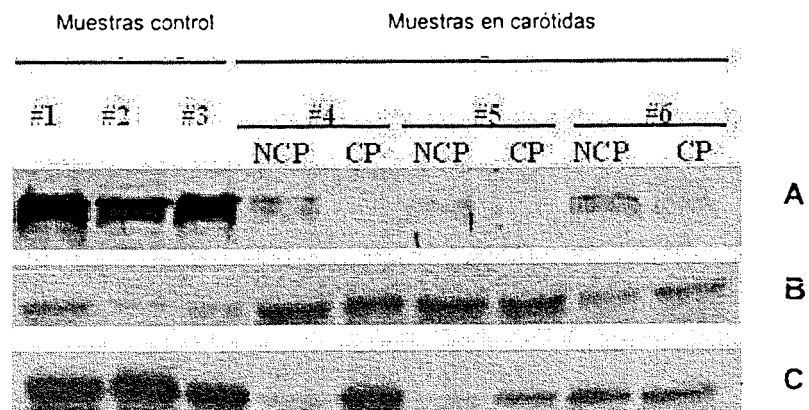


FIGURA 3

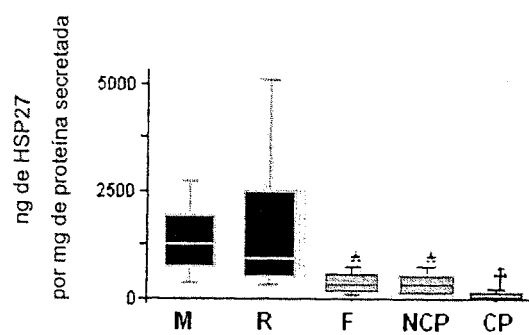


FIGURA 4

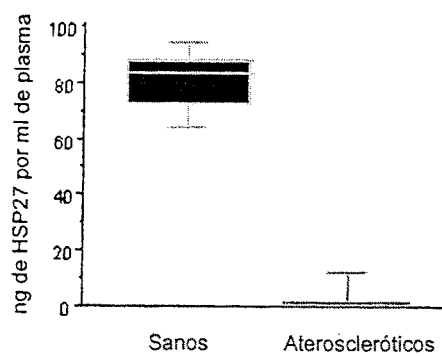


FIGURA 5

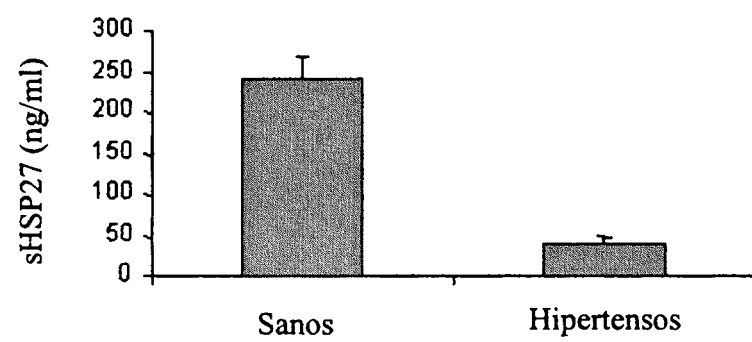
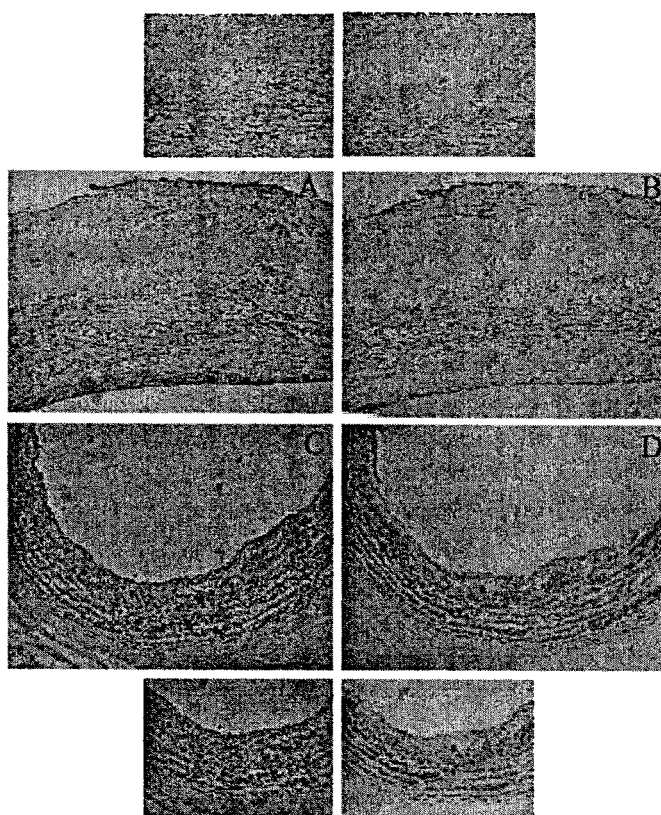


FIGURA 6





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 315 034

⑫ Nº de solicitud: 200401621

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **02.07.2004**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **G01N 33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 0072023 A2 (SEMMELEWEIS UNIVERSITY OF MEDIC ET AL) 30.11.2000, todo el documento.	1-35
A	XU, Q. "Role of heat shock proteins in atherosclerosis". ARTERIOSCLER. THROMB. VASC. BIOL. 2002. Vol. 22, páginas 1547-1559, todo el documento.	1-35
A	WO 03016527 A2 (PROBIOX, S.A.) 27.02.2003, todo el documento.	1-35

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

23.02.2009

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1