



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 176**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07802468 .4**

96 Fecha de presentación : **02.08.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2047275**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2009**

54 Título: **Métodos para valorar el riesgo de intervenciones cardíacas basado en el gen GDF-15.**

30 Prioridad: **04.08.2006 EP 06118464**
28.09.2006 EP 06121413
24.05.2007 EP 07108854

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.09.2011

73 Titular/es:
MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER
Carl-Neuberg-Strasse 1
30625 Hannover, DE

72 Inventor/es: **Wollert, Kai Christoph;**
Kempf, Tibor;
Wallentin, Lars y
Drexler, Helmut

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 365 176 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para valorar el riesgo de intervenciones cardíacas basado en el gen GDF-15

La presente invención se refiere a un método para averiguar si un sujeto está preparado para una intervención cardíaca, basándose en la determinación del factor de diferenciación del crecimiento-15 (GDF-15) en una muestra de un sujeto necesitado de una intervención cardíaca.

Una de las aspiraciones de la medicina moderna es proporcionar tratamientos personalizados o individualizados, es decir, que tengan en cuenta las necesidades o riesgos de cada paciente. Los regímenes de tratamiento personalizado o individualizado también deben tenerse en cuenta para medidas de urgencia. Concretamente, en caso de episodios cardiovasculares agudos hay que optar por un determinado régimen de tratamiento, usualmente en un corto espacio de tiempo. Las complicaciones cardiovasculares, en particular las enfermedades del corazón, son la causa principal de morbilidad y mortalidad en el hemisferio occidental. Las complicaciones cardiovasculares pueden permanecer asintomáticas durante largos periodos de tiempo. No obstante pueden tener consecuencias graves cuando ocurre un episodio cardiovascular agudo, tal como infarto de miocardio, a causa de la complicación cardiovascular.

Las técnicas convencionales de diagnóstico de complicaciones cardiovasculares incluyen mediciones electrocardiográficas y ecocardiográficas, análisis de los síntomas e historial previo del paciente, tal como dolor pectoral y análisis de algunos parámetros clínicos. Estas técnicas convencionales se han reforzado últimamente con el análisis de biomarcadores y en particular de los niveles de troponinas cardíacas en muestras de sangre de pacientes de urgencias. Por otra parte los péptidos natriuréticos también están descritos como biomarcadores adecuados para diagnosticar complicaciones cardiovasculares. Aún más recientemente se ha sugerido que el GDF-15 también es un indicador de complicaciones cardiovasculares (US 2003/0232385; Kempf 2006, *Circ Res* 98: 351-360). El factor de diferenciación del crecimiento-15 (GDF-15) es un miembro de la superfamilia de citocinas que incluye los factores de crecimiento transformante- β . El GDF-15 fue identificado al principio como citocina inhibidora de macrófagos tipo 1 (MIC-1) y posteriormente también se denominó factor de crecimiento transformante- β placentario (Bootcov 1997, *Proc Natl Acad Sci* 94:11514-11519; Tan 2000, *Proc Natl Acad Sci* 97:109-114). Recientemente se ha demostrado que los cardiomiocitos cultivados expresan y secretan GDF-15 a través de vías de señalización dependientes de óxido nítrico y estrés nitrosante cuando se someten a isquemia y reperusión simuladas. Asimismo, empleando un modelo de lesión por isquemia y reperusión miocárdica en ratón, se ha observado que los niveles de expresión de GDF-15 aumentan rápidamente en la zona isquémica tras la ligadura de la arteria coronaria y permanecen elevados durante varios días en el miocardio perfundido (Kempf loc. cit.).

En un estudio realizado con mujeres inicialmente sanas (Brown, D. A. y otros, 2002, *Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study* [Concentración de citocina inhibidora de macrófagos tipo 1 en plasma y riesgo de episodios cardiovasculares en mujeres: un estudio de casos y controles anidados], *The Lancet*, 359: 2159-2163) se ha demostrado que los mayores niveles de GDF-15 predicen episodios cardiovasculares en esta población. Se ha revelado que el nivel umbral indicativo de un riesgo elevado era de 856 pg/ml de GDF-15. Análogamente la patente US 2003/0232385 revela que los niveles de GDF-15 superiores a 850 pg/ml indican un mayor riesgo de episodios cardiovasculares. Kempf y otros (*Circulation*, vol. 114, Suppl. S, p. 721), publicado en octubre de 2006, demuestran que los niveles circulantes de GDF-15 están relacionados con la gravedad del fallo cardíaco crónico y predicen el riesgo de muerte.

Las técnicas convencionales, sobre todo en caso de situaciones urgentes, no sirven normalmente para un obtener un diagnóstico fiable y/o para valorar el riesgo. Por tanto en base a dichas técnicas de diagnóstico no puede establecerse con suficiente exactitud un régimen de tratamiento personalizado. Como consecuencia muchos pacientes recibirán un régimen de tratamiento que es insuficiente o que puede tener efectos secundarios adversos. En muchos casos los episodios cardiovasculares agudos, una vez determinados por las técnicas convencionales de diagnóstico arriba citadas y/o por los niveles de troponina del paciente, suelen tratarse mediante intervenciones cardíacas. Estas intervenciones cardíacas incluyen varios tipos de operaciones angioplásticas y/o cirugía de derivación coronaria, que se llevan a cabo para restituir el flujo sanguíneo correcto, p.ej. en el interior de los vasos coronarios. Sin embargo estas intervenciones no siempre tienen éxito e incluso pueden ser perjudiciales para el paciente. Además son largas y caras. Las mismas dificultades y deficiencias de las técnicas corrientes de evaluación de riesgos se encuentran en las intervenciones a pacientes de fallo cardíaco, p.ej. en terapias farmacológicas tales como el tratamiento con un inhibidor del enzima convertidor de angiotensina, con un bloqueador del receptor de angiotensina, con un beta-bloqueador o con un antagonista de la aldosterona, y en terapias intervencionistas tales como la terapia de resincronización cardíaca (TRC) o el desfibrilador cardioversor implantable (DCI).

Por consiguiente se necesitan medidas de diagnóstico o pronóstico que permitan la estratificación del riesgo individual de un paciente supuestamente necesitado de un determinado régimen de tratamiento, tal como una intervención cardíaca.

El problema técnico subyacente a la presente invención puede interpretarse como la provisión de medios y métodos para satisfacer las necesidades antedichas.

El problema técnico se resuelve mediante las formas de ejecución caracterizadas en las reivindicaciones y en lo sucesivo.

Por tanto la presente invención se refiere a un método para identificar un sujeto susceptible de una intervención cardíaca, que comprende

- 5 a) determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra de un sujeto necesitado de una intervención cardíaca y
- b) comparar la cantidad de GDF-15 determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia, para poder identificar un sujeto susceptible de una intervención cardíaca.

10 El método de la presente invención es, preferiblemente, un método in vitro. Además puede incluir etapas adicionales a las indicadas explícitamente arriba. Por ejemplo, las etapas adicionales pueden consistir en tratamientos previos de la muestra o en la evaluación de los resultados obtenidos por el método. El método de la presente invención se puede usar igualmente para controlar, confirmar y subclasificar un sujeto necesitado de una intervención cardíaca. El método se puede llevar a cabo manualmente o con asistencia automática. Preferiblemente la etapa (a) y/o (b) puede estar total o parcialmente automatizada, p.ej. mediante un aparato sensor adecuadamente robotizado para la determinación de la etapa (a) o una comparación por ordenador en la etapa (b).

15 Tal como se usa aquí, el término "identificar" significa valorar si un sujeto es susceptible de intervención cardíaca o no. Normalmente, como comprenderán los especialistas en la materia, tal valoración no pretende ser correcta para todos (es decir el 100%) los sujetos objeto de identificación. No obstante el término requiere la identificación de una porción estadísticamente significativa de sujetos (p.ej. una cohorte en un estudio de cohortes). El especialista en la materia puede determinar sin más si una porción es estadísticamente significativa empleando varias herramientas
20 bien conocidas de valoración estadística, p.ej. determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t-Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Hay descripciones detalladas en Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Los valores p son preferiblemente de 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Con mayor preferencia al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de los sujetos de una población se pueden identificar correctamente por el método de la presente invención.
25

Tal como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a animales, preferentemente mamíferos y con mayor preferencia humanos.

30 En cualquier caso el método antedicho de la presente invención contempla que el sujeto esté "necesitado de una intervención cardíaca", es decir que muestre síntomas y/o signos físicos claramente asociados a un episodio cardiovascular agudo, p.ej. dolor torácico, disnea, cambios en el ECG y otros, tal como se describe arriba. Con mayor preferencia, que el sujeto presente uno o más episodios de angina de al menos 5 minutos de duración en las 24 h anteriores y un positivo en la prueba de troponina T o I cardíaca o como mínimo 0-5 mm de depresión transitoria o persistente del segmento ST no registrada con anterioridad y no atribuible a trastornos coexistentes. Alternativa, aunque también preferentemente, que el sujeto muestre síntomas de isquemia crecientes o aparecidos
35 en reposo o que justifiquen la sospecha de un infarto agudo de miocardio, con un último episodio en las 48 h previas. La isquemia cardíaca debería verificarse por electrocardiografía (depresión ST = 0-1 mV o inversión de la onda T = 0-1 mV) o por el aumento de marcadores bioquímicos (creatininasa [CK]-MB > 6 ug/l, troponina-T > 0,01 ng/ml, prueba cualitativa de troponina-T positiva o actividad catalítica de CK, CK-B, o CK MB superior al límite diagnóstico local para el infarto de miocardio).

40 Los episodios cardiovasculares agudos son, preferentemente, síndromes coronarios agudos (SCA). Los pacientes de SCA pueden presentar angina de pecho inestable (API) o infarto de miocardio (IM). El IM puede ser con elevación del segmento ST (STEMI) o sin elevación del mismo (NSTEMI). La aparición de un SCA puede ir seguida de una disfunción del ventrículo izquierdo (DVI) y síntomas de fallo cardíaco.

45 El término "intervención cardíaca" engloba los regímenes de tratamiento que comprenden cirugía, microcirugía u otras terapias invasivas que afectan al sistema cardiovascular y preferentemente al corazón. Tal como se usa aquí, intervenciones cardíacas son preferiblemente regímenes de tratamiento cuyo objetivo es restablecer el aporte adecuado de oxígeno al corazón, lo cual se consigue preferentemente restituyendo el flujo de sangre a través de los vasos sanguíneos que sostienen el corazón, es decir los vasos sanguíneos coronarios. Estos vasos sanguíneos se pueden dañar debido p.ej. a placas trombóticas o ateroscleróticas. Por consiguiente las intervenciones cardíacas comprenderán preferentemente la destrucción y/o eliminación de dichas placas y, si es necesario, la reparación del
50 vaso. Las intervenciones cardíacas conforme a la presente invención está escogidas del grupo formado por angioplastia coronaria percutánea, angioplastia coronaria transluminal percutánea con balón, angioplastia láser, implantación de stent coronario o implantación de bypass.

El término "muestra" se refiere a muestras de sangre, plasma o suero.

55 El término "factor de diferenciación del crecimiento-15" o "GDF-15" se refiere a un polipéptido miembro de la superfamilia de citocinas que incluye los factores de crecimiento transformante- β . Los términos polipéptido, péptido y proteína se usan indistintamente a lo largo de esta descripción. El GDF-15 se clonó originalmente como citocina

inhibidora de macrófagos tipo 1 y más tarde se identificó también como factor de crecimiento transformante- β placentario, proteína morfogenética ósea placentaria, gen activado por fármacos antiinflamatorios no esteroideos-1 y factor derivado de próstata (Bootcov loc cit; Hromas, 1997 *Biochim Biophys Acta* 1354:40-44; Lawton 1997, *Gene* 203:17-26; Yokoyama-Kobayashi 1997, *J Biochem* (Tokyo), 122:622-626; Paralkar 1998, *J Biol Chem* 273: 13760-13767). De manera análoga a otras citocinas parecidas al TGF- β , el GDF-15 se sintetiza como una proteína precursora inactiva que experimenta homodimerización con puente disulfuro. Tras la disociación proteolítica del propéptido N-terminal el GDF-15 es secretado como una proteína dímera de 28 kDa (Bauskin 2000, *Embo J* 19:2212-2220). Las secuencias de aminoácidos del GDF-15 están reveladas en WO 99/06445, WO 00/70051, WO 2005/113585 Bottner 1999, *Gene* 237: 105-111, Bootcov loc. cit, Tan loc. cit., *base* 2001, *Mol Pharmacol* 59: 901-908, Hromas loc cit, Paralkar loc cit, Morrish 1996, *Placenta* 17:431-441 o Yokoyama-Kobayashi loc cit.. El GDF-15 empleado aquí también comprende variantes de los polipéptidos GDF-15 específicos anteriormente mencionados. Estas variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que los polipéptidos GDF-15 específicos. En concreto comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos análisis específicos citados en esta descripción, p.ej. mediante ensayos ELISA con anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos GDF-15. En los ejemplos adjuntos se describe un ensayo preferido. Por otra parte debe entenderse que una variante conforme a la presente invención tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere por sustitución, delección y/o adición de al menos un aminoácido y que preferiblemente aún es idéntica en al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos GDF-15 específicos. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos del estado técnico. El grado de identidad debe determinarse preferentemente comparando dos secuencias óptimamente alineadas mediante una ventana comparativa que incluya un fragmento de la secuencia de aminoácidos con adiciones o delecciones (p.ej. huecos o protuberancias) respecto a la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones). El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones de ambas secuencias en que aparece el mismo resto de aminoácido, dividiendo este número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones de la ventana comparativa y multiplicando el resultado por 100, para obtener el tanto por ciento de identidad secuencial. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Add. APL. Math.* 2:482 (1981), el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch *J. Mol Biol* 48:443 (1970), el método de búsqueda por similitud de Pearson y Lipman *Proc. NatL Acad Sci. (USA)* 85:2444 (1988), las implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el paquete de programas de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) o por inspección visual. Si hay dos secuencias identificadas para su comparación, se usa preferiblemente GAP y BESTFIT para determinar su alineación óptima y por tanto su grado de identidad. Preferiblemente se usan valores por defecto de 5,00 para el peso del hueco y de 0,30 para la longitud del hueco. Las variantes arriba mencionadas pueden ser alélicas o cualquier otra especie de homólogos, parálogos u ortólogos específicos. Además las variantes aquí citadas incluyen fragmentos de los polipéptidos GDF-15 específicos o de los tipos de variantes antedichos, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales arriba mencionadas. Dichos fragmentos pueden ser p.ej. productos de degradación de los polipéptidos GDF-15. También se incluyen variantes que difieren por modificaciones postraslacionales tales como fosforilación o miristilación.

Determinar la cantidad de GDF-15 o de cualquier otro péptido o polipéptido citado en esta descripción significa medir la cantidad o la concentración, con preferencia semicuantitativa o cuantitativamente. La medición se puede realizar directa o indirectamente. Medición directa significa medir la cantidad o la concentración del péptido o polipéptido en base a una señal obtenida del propio péptido o polipéptido, cuya intensidad está directamente relacionada con el número de moléculas de péptido presentes en la muestra. Dicha señal – designada aquí a veces como señal de intensidad – se puede obtener p.ej. midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta consiste en medir una señal obtenida de un componente secundario (es decir, de un componente que no es el propio péptido o polipéptido) o de un sistema de lectura de datos biológicos, p.ej. respuestas celulares, ligandos, marcadores o productos de reacciones enzimáticas medibles.

Según la presente invención la cantidad de un péptido o polipéptido se puede determinar por todos los medios conocidos para averiguar la cantidad de un péptido en una muestra, incluyendo dispositivos de inmunoensayo y métodos que utilicen moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo sándwich, de competición u otros. Dichos ensayos producirán una señal indicativa de la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además la intensidad de la señal se puede relacionar preferiblemente de forma directa o indirecta (p.ej. inversamente proporcional) con la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Otros métodos adecuados consisten en medir una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido, como su masa molecular exacta o su espectro RMN. Dichos métodos comprenden preferiblemente biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos como espectrómetros de masas, analizadores RMN o aparatos cromatográficos. Otros métodos están basados en microplacas ELISA, inmunoensayos totalmente automatizados o robotizados (disponibles por ejemplo en analizadores Elecsys[®]), CBA (un ensayo enzimático de fijación de cobalto disponible por ejemplo en analizadores Roche-Hitachi[®]) y ensayos de aglutinación con látex (disponibles por ejemplo en analizadores Roche-Hitachi[®]).

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende preferiblemente las etapas de (a) poner en contacto una célula capaz de provocar una respuesta celular, cuya intensidad indique la cantidad de péptido o

polipéptido, con dicho péptido o polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular. Para medir respuestas celulares, la muestra, procesada o no, se agrega preferiblemente a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión medible de un gen indicador o la secreción de una sustancia, p.ej. un péptido, un polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o la sustancia genera una señal de intensidad relacionada con la cantidad de péptido o polipéptido.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende también preferiblemente la etapa de medir una señal de intensidad procedente del péptido o polipéptido contenido en la muestra. Como se ha descrito arriba esta señal puede ser la intensidad observada a una m/z variable específica del péptido o polipéptido analizado en un espectro de masas o un espectro de RMN específico del péptido o polipéptido.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido puede comprender preferiblemente las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) eliminar (opcionalmente) el ligando no fijado, (c) medir la cantidad de ligando fijado. El ligando fijado genera una señal de intensidad. Según la presente invención, la fijación puede ser covalente o no covalente. Según la presente invención un ligando puede ser cualquier compuesto, p.ej. un péptido, un polipéptido, un ácido nucleico o una molécula pequeña, que se une al péptido o polipéptido aquí descrito. Los ligandos preferidos incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos como receptores o fijadores del péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos que comprendan los dominios de fijación para los péptidos, y aptámeros, p.ej. de ácidos nucleicos o peptídicos. Los métodos para preparar dichos ligandos son bien conocidos del estado técnico. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también es proporcionada por proveedores comerciales. El especialista en la materia conoce métodos para crear derivados de estos ligandos que sean más afines o específicos. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en ácidos nucleicos, péptidos o *polipéptidos*. Luego se puede ensayar la fijación de estos derivados conforme a procedimientos de selección conocidos del estado técnico, p.ej. expresión de fagos. Los anticuerpos aquí citados pueden ser policlonales y monoclonales, y también fragmentos de los mismos, como Fv, Fab y F(ab)₂, capaces de fijar antígenos o haptenos. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena simple y anticuerpos híbridos humanizados, en los cuales se combinan secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que posee una deseada especificidad contra antígenos y secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donantes incluirán normalmente al menos los restos de aminoácidos fijadores de antígeno, pero también pueden comprender otros restos de aminoácidos estructuralmente y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos pueden prepararse por varios métodos bien conocidos del estado técnico. El ligando o agente se une preferiblemente de manera específica al péptido o polipéptido. Unión específica, según la presente invención, significa que el ligando o agente no debería unirse sustancialmente (por "reacción cruzada") a otro péptido, polipéptido o sustancia existente en la muestra analizada. El péptido o polipéptido fijado de forma específica debería unirse preferiblemente con una afinidad al menos 3 veces mayor, preferiblemente al menos 10 veces mayor y sobre todo al menos 50 veces mayor que a cualquier otro péptido o polipéptido relevante. Una unión no específica es tolerable si aún se puede distinguir y medir inequívocamente, por ejemplo, según su tamaño en un Western Blot, o por su mayor abundancia en la muestra. La unión del ligando puede medirse por cualquier método conocido del estado técnico. Este método es preferiblemente semicuantitativo o cuantitativo. A continuación se describen métodos adecuados.

En primer lugar la fijación del ligando puede medirse directamente, p.ej. mediante RMN o por resonancia de plasmón superficial.

En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido en cuestión, se puede medir un producto de la reacción enzimática (p.ej. se puede medir la cantidad de una proteasa determinando la cantidad de sustrato escindido, p.ej. en un Western Blot). Alternativamente el propio ligando puede presentar propiedades enzimáticas y el complejo "ligando/péptido o polipéptido" o el ligando fijado por el péptido o polipéptido, respectivamente, se puede poner en contacto con un sustrato adecuado que permita la detección a través de la señal de intensidad generada. Para medir productos de reacción enzimática la cantidad de sustrato debe ser preferiblemente saturante. El sustrato también se puede marcar antes de la reacción con un marcador detectable. Preferiblemente la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado, entendiendo como tal el tiempo necesario para obtener una cantidad de producto detectable, preferiblemente medible. En vez de medir la cantidad de producto se puede medir el tiempo necesario para que aparezca una cantidad determinada de producto (p.ej. detectable).

En tercer lugar el ligando se puede acoplar de forma covalente o no covalente a un marcador que permita detectar y medir el ligando. El ligando se puede marcar por métodos directos o indirectos. El marcaje directo consiste en acoplar el marcador directamente (por enlace covalente o no covalente) al ligando. El marcaje indirecto consiste en unir (por enlace covalente o no covalente) un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debería unirse específicamente al primer ligando. Este ligando secundario se puede acoplar a un marcador apropiado y/o ser la diana (receptor) de un ligando terciario que se una al ligando secundario. Los ligandos secundarios, terciarios o incluso de mayor orden se usan a menudo para aumentar la señal. Como ligandos secundarios y de mayor orden pueden resultar adecuados anticuerpos, anticuerpos secundarios y el muy conocido sistema de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también puede "etiquetarse" con una o más etiquetas conocidas del estado técnico, las cuales pueden ser dianas para otros ligandos de orden superior. Como etiquetajes adecuados cabe citar biotina, digoxigenina, His-Tag, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, myctag, hemaglutinina del

virus de la gripe A (HA), proteína fijadora de maltosa y análogos. En el caso de un péptido o polipéptido el etiquetaje se halla preferiblemente en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Son marcadores adecuados todos los que pueden detectarse por un método apropiado. Como marcadores típicos cabe citar partículas de oro, perlas de látex, ésteres de acridano, luminol, rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radioactivos, marcadores magnéticos ("p.ej. perlas magnéticas", incluyendo marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos incluyen p.ej. peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de los mismos. Los substratos adecuados para la detección comprenden diaminobencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro-azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponibles como solución estándar recién preparada de Roche Diagnostics, CDP-Star® (Amersham Biosciences), ECF® (Amersham Biosciences). Una combinación adecuada de enzima-substrato puede dar un producto de reacción coloreado, fluorescente o quimioluminescente medible mediante métodos conocidos del estado técnico (p.ej., empleando una película sensible a la luz o un sistema de cámara apropiado). Para medir la reacción enzimática sirven análogamente los criterios arriba indicados. Como marcadores típicos de fluorescencia cabe citar proteínas fluorescentes (como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo Texas, fluoresceína y los colorantes Alexa (p.ej. Alexa 568). Otros marcadores fluorescentes se pueden adquirir p.ej. de Molecular Probes (Oregon). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Los marcadores radiactivos típicos incluyen S³⁵, I¹²⁵, P³², P³³ y análogos. Un marcador radiactivo se puede detectar por cualquier método conocido y apropiado, p.ej. mediante un film fotosensible o un fotosensor de fósforo "Phosphor Imager". Los métodos de medición adecuados según la presente invención también incluyen la precipitación (en concreto inmunoprecipitación), la electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia generada eléctricamente), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), ensayos inmunoenzimáticos tipo sándwich, inmunoensayos electroquimioluminescentes tipo sándwich (ECLIA), fluoroinmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos (DELFI A), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría mejorada con látex o inmunoensayos en fase sólida. Otros métodos conocidos del estado técnico (como la electroforesis en gel, electroforesis en gel 2D, electroforesis en gel de poli(acrilamida) SDS (SDS-PAGE), Western Blotting y espectrometría de masas) se pueden emplear individualmente o en combinación con marcadores u otros métodos de detección, tal como se ha descrito anteriormente.

La cantidad de un péptido o polipéptido también se puede determinar del modo siguiente: (a) poner en contacto un soporte sólido que lleva un ligando para el péptido o polipéptido, tal como se ha descrito arriba, con una muestra que contiene el péptido o polipéptido y (b) medir la cantidad de péptido o polipéptido fijado al soporte. El ligando, preferentemente escogido del grupo formado por ácido nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está preferentemente inmovilizado sobre un soporte sólido. Los materiales para la elaboración de soportes sólidos son bien conocidos del estado técnico y comprenden, entre otros, materiales de columnas comercialmente disponibles, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos, pocillos y paredes de placas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede estar unido a muchos soportes diferentes. Como ejemplos muy conocidos de soportes cabe mencionar vidrio, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas), agarosas y magnetita. Para los fines de la presente invención el soporte puede ser de tipo soluble o insoluble. Los métodos adecuados para fijar/ inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, sin limitarse a ellos, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. También se contempla el uso de "matrices en suspensión" como matrices conforme a la presente invención (Nolan 2002, *Trends Biotechnol* 20(1):9-12). En estas matrices suspendidas el soporte, p.ej. una microperla o microesfera, se halla en suspensión. La matriz consta de distintas microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que llevan diferentes ligandos. Los métodos para producir dichas matrices, basados por ejemplo en la química de fase sólida y en grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (US 5.744.305).

Tal como se usa aquí, el término "cantidad" engloba la cantidad absoluta de un polipéptido o péptido, la cantidad relativa o concentración de dicho polipéptido o péptido, así como cualquier valor o parámetro relativo a los mismos o derivable de ellos. Dichos valores o parámetros incluyen los valores de las señales de intensidad de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidos por mediciones directas de dichos péptidos, p.ej. valores de intensidad en los espectros de masas o de RMN. Asimismo se incluyen todos los valores o parámetros obtenidos por mediciones indirectas especificadas en cualquier parte de esta descripción, p.ej. niveles de expresión determinados de los sistemas de lectura biológicos en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidas de los ligandos específicamente unidos. Debe entenderse que los valores relacionados con las cantidades o parámetros anteriormente citados también pueden obtenerse mediante todas las operaciones matemáticas corrientes.

Tal como se emplea aquí, el término "comparar" se refiere a la comparación de la cantidad del péptido o polipéptido contenido en la muestra objeto del análisis con una cantidad de una fuente de referencia idónea especificada en cualquier parte de esta descripción. Debe entenderse que, tal como se usa aquí, comparar se refiere a la comparación de parámetros o valores correspondientes, p.ej. una cantidad absoluta se compara con otra cantidad absoluta de referencia, mientras que una concentración se compara con otra concentración de referencia, o una señal de intensidad obtenida de una muestra ensayada se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación mencionada en la etapa b) del método de la presente invención se puede realizar manualmente o por ordenador. En caso de comparación asistida por ordenador el valor cuantitativo hallado

puede compararse mediante un programa informático con valores correspondientes a referencias adecuadas almacenadas en un banco de datos. Además el programa informático puede evaluar el resultado de la comparación, es decir, proporcionar automáticamente la valoración deseada en un formato de salida apropiado. Basándose en la comparación de la cantidad determinada en la etapa a) con la cantidad de referencia es posible apreciar si un sujeto puede someterse a una intervención cardíaca, es decir, si pertenece al grupo de sujetos que pueden tratarse con éxito mediante la intervención cardíaca. Por tanto la cantidad de referencia debe elegirse de manera que una diferencia o una similitud entre las cantidades comparadas permita identificar el sujeto analizado como perteneciente al grupo de sujetos susceptibles de intervención cardíaca o identificar aquellos sujetos analizados que no pueden someterse a una intervención cardíaca.

Así pues, tal como se usa aquí, el término "cantidad de referencia" se refiere a una cantidad que permite valorar, tal como se ha indicado arriba, si un sujeto necesitado de una intervención cardíaca puede someterse a ella. Por tanto la referencia puede venir de (i) un sujeto conocido que haya sido tratado satisfactoriamente, es decir, sin aparición de efectos adversos tales como infarto o mortalidad o de efectos secundarios causados por el régimen de tratamiento, o de (ii) un sujeto conocido que no haya sido tratado satisfactoriamente, es decir, que haya sufrido infarto o que haya muerto por complicaciones cardiovasculares posteriores a una intervención cardíaca o que no obtenga ningún beneficio del régimen de tratamiento. Además la cantidad de referencia define un valor límite, por encima del cual se considerará que un sujeto es susceptible de una intervención cardíaca y por debajo del cual se juzgará que un sujeto no puede tratarse satisfactoriamente mediante la intervención cardíaca. La cantidad de referencia aplicable a cada sujeto variará en función de varios parámetros fisiológicos, tales como edad, sexo o subpoblación, así como de los medios empleados para la determinación de dicho polipéptido o péptido. Mediante el método de la presente invención se puede determinar una cantidad de referencia adecuada, a partir de una muestra de referencia que debe analizarse junto con la muestra de ensayo, es decir simultánea o subsecuentemente. Como cantidad de referencia que sirva de valor umbral puede tomarse el límite normal superior (LNS), es decir el límite superior de la cantidad fisiológica hallada en una población de sujetos aparentemente sanos. El LNS de una determinada población de sujetos se puede calcular por diversas técnicas bien conocidas. Una técnica apropiada puede consistir en determinar la mediana de la población para las cantidades de péptido o polipéptido analizadas por el método de la presente invención. Un valor umbral (es decir, una cantidad de referencia) del GDF-15 es al menos una hasta dos veces el LNS. En este contexto el LNS es de 1200 pg/ml.

Por lo tanto la cantidad de referencia que define un valor umbral de GDF-15 conforme a la presente invención es de 1200 pg/ml.

Una cantidad de GDF-15 mayor que la de referencia indica que un sujeto es susceptible de intervención cardíaca.

En el estudio subyacente a la presente invención se ha encontrado ventajosamente que el GDF-15 es un biomarcador de pronóstico fiable para valorar el éxito de intervenciones cardíacas en sujetos necesitados de ellas, es decir, sujetos que padecen complicaciones cardiovasculares y en particular aquellos que están afectados por episodios cardiovasculares agudos o fallo cardíaco. Gracias a la presente invención se puede realizar fácilmente una estratificación riesgo/éxito antes de someter un paciente a una intervención cardíaca. Si el paciente no resulta apto para una intervención cardíaca se puede evitar esta terapia peligrosa, que requiere mucho tiempo y es muy costosa. Por tanto, además de evitarle al sujeto los efectos secundarios adversos y graves que acompañan a una intervención cardíaca, el método de la presente invención será beneficioso para el sistema sanitario por el ahorro de recursos. Según el método de la presente invención aquí descrito, tanto arriba como en lo sucesivo, debe entenderse que la cantidad de GDF-15 o los medios para su determinación se pueden emplear en la elaboración de una composición diagnóstica destinada a identificar un sujeto susceptible de una intervención cardíaca.

En una forma de ejecución preferida de la presente invención dicho método incluye además la determinación de la cantidad de una troponina cardíaca en dicha muestra del sujeto y la comparación de la cantidad de la troponina cardíaca con una cantidad de referencia.

El término "troponinas cardíacas" se refiere a todas las isoformas de troponina expresadas en células del corazón y preferiblemente en las células subendocárdicas. Estas isoformas están bien identificadas en el estado técnico, tal como se describe p.ej. en Anderson 1995, *Circulation Research*, vol. 76, nº. 4: 681-686 y en Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493. Troponina cardíaca se refiere preferentemente a troponina T y/o a troponina I y con mayor preferencia a troponina T. Debe entenderse que en el método de la presente invención las isoformas de troponina pueden determinarse de manera conjunta, es decir simultánea o secuencialmente, o individual, es decir sin analizar de ningún modo la otra isoforma. Las secuencias de aminoácidos de la troponina T y la troponina I humanas están reveladas en Anderson, loc cit y Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493.

Por tanto el término "troponina cardíaca" también incluye variantes de las troponinas específicas antes citadas, es decir, preferiblemente de troponina T o de troponina I. Dichas variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas que las troponinas cardíacas específicas. En concreto, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales, si son detectables por los mismos ensayos específicos mencionados en esta descripción, p.ej. mediante ensayos ELISA con anticuerpos policlonales o monoclonales que reconozcan específicamente dichas troponinas cardíacas. También debe entenderse que una variante, en el sentido de la presente invención, tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere por sustitución, delección y/o adición de al

menos un aminoácido y que preferiblemente sigue siendo idéntica en al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de la troponina específica. Las variantes pueden ser alélicas o cualquier otra especie de homólogos, parálogos u ortólogos específicos. Además las variantes aquí citadas incluyen fragmentos de las troponinas cardíacas específicas o de los tipos de variantes antedichas, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales arriba mencionadas. Dichos fragmentos pueden ser p.ej. productos de degradación de las troponinas. También se incluyen variantes que difieren por modificaciones postraslacionales tales como fosforilación o miristilación.

Como ya se ha expuesto arriba, una cantidad preferente de referencia que sirva de umbral puede tomarse del LNS. El LNS para una determinada población de sujetos se puede establecer del modo especificado en otra parte de esta descripción. Un umbral preferido (es decir, una cantidad de referencia) de una troponina cardíaca, en particular de troponina T o I, es como mínimo de una vez, con mayor preferencia de dos hasta cinco veces, el LNS. Preferiblemente, en este contexto, el LNS es de 0,01 ng/ml para la troponina T y de 0,1 ng/ml para la troponina I.

Por tanto la cantidad de referencia que define un valor umbral para la troponina T es preferiblemente, según la presente invención, de 0,01 ng/ml, 0,02 ng/ml o 0,05 ng/ml.

Con mayor preferencia, una cantidad de troponina cardíaca superior a la de referencia es indicativa de que un sujeto es susceptible de intervención cardíaca.

En otra forma de ejecución preferida de la presente invención el método comprende también (es decir, además de la determinación de GDF-15 y/o de troponina cardíaca) la determinación de la cantidad de un péptido natriurético en dicha muestra del sujeto y la comparación de la cantidad del péptido natriurético con una referencia.

El término "péptido natriurético" comprende los tipos denominados péptido natriurético auricular (ANP) y péptido natriurético cerebral (BNP) y variantes de ellos con el mismo potencial predictivo. Los péptidos natriuréticos según la presente invención comprenden los tipos ANP y BNP y variantes de los mismos (véase p.ej. Bonow, 1996, *Circulation* 93: 1946-1950). Los péptidos ANP incluyen los tipos pre-proANP, proANP, NT-proANP y ANP. Los péptidos BNP incluyen los tipos pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP y BNP. El pre-pro-péptido (134 aminoácidos en el caso del pre-proBNP) comprende un péptido corto señalizador que se disocia enzimáticamente liberando el propéptido (108 aminoácidos en el caso del proBNP). A su vez el propéptido se disocia en un propéptido N-terminal (NT-propéptido, 76 aminoácidos en el caso del NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso del BNP, 28 aminoácidos en el caso del ANP).

Los péptidos natriuréticos preferidos según la presente invención son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP y variantes de los mismos. ANP y BNP son las hormonas activas y tienen una vida media más breve que sus respectivas contrapartes inactivas NT-proANP y NT-proBNP. El BNP se metaboliza en la sangre, mientras que el NT-proBNP circula por ella como una molécula intacta y como tal se elimina renalmente. La vida media in vivo del NT-proBNP es 120 minutos mayor que la del BNP, que es de 20 minutos (Smith 2000, *J Endocrinol* 167: 239-46.). Las preanalíticas con NT-proBNP son más resistentes y facilitan el transporte de la muestra a un laboratorio central (Mueller 2004, *Clin Chem Lab Med* 42: 942-4.). Las muestras de sangre se pueden almacenar a la temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o expedirse sin pérdida de recuperación. En cambio el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C produce una pérdida de concentración de al menos un 20% (Mueller loc.cit; Wu 2004, *Clin Chem* 50: 867-73.). Por tanto, en función del periodo de tiempo o de las propiedades de interés, puede ser más conveniente medir las formas activas o las formas inactivas del péptido natriurético.

Los péptidos natriuréticos más preferidos según la presente invención son NT-proBNP o variantes del mismo. Tal como se ha expuesto arriba brevemente el NT-proBNP humano, conforme a la presente invención, es un polipéptido que comprende preferiblemente una longitud de 76 aminoácidos correspondiente a la porción N-terminal de la molécula del NT-proBNP humano. La estructura del BNP y NT-proBNP humanos ya ha sido descrita detalladamente en el estado técnico anterior, p.ej. en las patentes WO 02/089657, WO 02/083913 o en Bonow loc. cit. El NT-proBNP utilizado aquí es preferiblemente NT-proBNP humano como el descrito en la patente EP 0 648 228 B1. Estos documentos del estado técnico anterior se incorporan aquí como referencia en lo que se refiere a las secuencias específicas del NT-proBNP y de sus variantes ahí reveladas. El NT-proBNP conforme a la presente invención comprende asimismo alelos y otras variantes de dicha secuencia específica del NT-proBNP humano arriba discutidas. En concreto se contemplan variantes de polipéptidos que en el nivel de aminoácidos son al menos un 60% idénticas, con mayor preferencia al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% al NT-proBNP humano. De modo básicamente análogo también se contemplan productos de degradación proteolítica aún reconocibles por los medios de diagnóstico o por ligandos dirigidos contra el correspondiente péptido de longitud completa. También se incluyen variantes de polipéptidos con deleciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos respecto a la secuencia aminoácida del NT-proBNP humano, siempre que dichos polipéptidos tengan características de NT-proBNP, que en este caso se refieren a propiedades inmunológicas y/o biológicas. Las variantes del NT-proBNP tienen preferiblemente propiedades inmunológicas (es decir composición epitópica) comparables a las del NT-proBNP. Por tanto las variantes serán reconocibles por los antedichos medios o ligandos empleados para determinar la cantidad de los péptidos natriuréticos. Las propiedades biológicas y/o inmunológicas de NT-proBNP se pueden detectar mediante el ensayo descrito en Karl y otros (Karl

1999, *Scand J Clin Invest* 59:177-181), Yeo y otros (Yeo 2003, *Clinica Chimica Acta* 338:107-115). Las variantes también incluyen péptidos modificados por postraslación, como los péptidos glicosilados. También es una variante conforme a la presente invención un péptido o polipéptido modificado después de recoger la muestra, por ejemplo mediante unión covalente o no covalente de un marcador, en particular de tipo radiactivo o fluorescente, al péptido.

- 5 Como ya se ha expuesto arriba, una cantidad de referencia preferida que sirva de umbral puede tomarse del LSN. El LSN para una población determinada de sujetos se puede determinar del modo especificado en cualquier parte de esta descripción. Un valor umbral preferido (es decir, una cantidad de referencia) para un péptido natriurético y en particular para el NT-proBNP es de al menos una vez, con mayor preferencia dos hasta cuatro veces, el LSN. En este contexto el LSN del NT-proBNP es preferiblemente de 300 pg/ml. Los LSN de otros péptidos natriuréticos
10 conocidos del estado técnico son de 40 pg/ml para el ANP, 100 pg/ml para el BNP y 500 pmol/l para el NT-proANP.

Por tanto la cantidad de referencia que define un valor umbral de NT-proBNP conforme a la presente invención es preferiblemente de 600 pg/ml o 1200 pg/ml y con mayor preferencia de 1000 pg/ml.

Con mayor preferencia, una cantidad de un péptido natriurético superior a la de referencia es indicativa de que un sujeto es susceptible de intervención cardíaca.

- 15 Debe entenderse que las definiciones y explicaciones de los términos indicadas arriba y en lo sucesivo se aplican correspondientemente en toda la exposición restante.

- También se revela un dispositivo para identificar un sujeto susceptible de intervención cardíaca, adaptado a la realización del método de la presente invención, que comprende medios para determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra del sujeto y medios para comparar dicha cantidad con una de referencia, identificando un sujeto
20 susceptible de intervención cardíaca.

- Tal como se usa aquí, el término "dispositivo" se refiere a un sistema que comprende al menos los medios antes citados, conectados operativamente entre sí para permitir la predicción. Los medios preferidos para determinar la cantidad de GDF-15, preferiblemente en combinación con una troponina cardíaca y/o con un péptido natriurético, y los medios para efectuar la comparación están revelados arriba en relación con el método de la presente invención.
25 El modo de conectar los medios de forma operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, ahí donde se usan medios para determinar automáticamente la cantidad de péptidos, los datos recogidos por estos medios de funcionamiento automático pueden procesarse, p.ej. mediante un programa informático, para obtener los resultados deseados. En tal caso los medios están comprendidos preferiblemente en un solo dispositivo, el cual, por tanto, puede incluir una unidad analizadora para la medición de la cantidad de péptidos o polipéptidos en una muestra aplicada y una unidad computadora para procesar los datos resultantes de la evaluación.
30 Alternativamente, ahí donde se usan medios tales como tiras de ensayo para determinar la cantidad de péptidos o polipéptidos, los medios de comparación pueden comprender tiras de control o tablas que asignen la cantidad determinada a una cantidad de referencia. Las tiras de ensayo van acopladas preferiblemente a un ligando que se une de forma específica a dichos péptidos o polipéptidos. La tira o el dispositivo incluye preferiblemente medios para
35 detectar la unión de dichos péptidos o polipéptidos a dicho ligando. Los medios de detección preferidos se revelan en relación con el método de la presente invención arriba descrito. En tal caso los medios están conectados operativamente de forma que el usuario del sistema reúna el resultado de la determinación de la cantidad y su valor diagnóstico o predictivo, siguiendo las instrucciones e interpretaciones indicadas en un manual. En dicha forma de ejecución los medios se pueden presentar como dispositivos separados y, preferentemente, van empaquetados
40 juntos en forma de kit. El especialista en la materia reconocerá fácilmente cómo conectar los medios. Se prefieren aquellos dispositivos que pueden aplicarse sin los conocimientos especializados de un médico clínico, como p.ej. tiras de ensayo o aparatos electrónicos que solo deben cargarse con una muestra. Los resultados pueden estar indicados como datos sin procesar que deben ser interpretados por el médico. No obstante, preferiblemente, la salida del dispositivo son datos procesados, es decir evaluados, cuya interpretación no requiere un médico. Otros
45 dispositivos preferidos son las unidades/aparatos de análisis (p.ej. biosensores, matrices, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen específicamente el péptido natriurético, dispositivos de resonancia de plasmones superficiales, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masas, etc.) o unidades/aparatos de evaluación como los mencionados arriba conforme a la presente invención.

- Asimismo se revela un kit de realización del método de la presente invención para identificar un sujeto susceptible de intervención cardíaca. Dicho kit comprende medios para determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra de un sujeto y medios para comparar dichas cantidades con otras de referencia, identificando un sujeto susceptible de
50 intervención cardíaca.

- Tal como se usa aquí, el término "kit" se refiere a un conjunto de los medios antedichos, disponibles preferiblemente por separado o en un paquete único que comprende, también preferiblemente, instrucciones para la realización del
55 método de la presente invención.

Las figuras representan:

Figura 1: (A) Probabilidad acumulada de infarto agudo de miocardio durante 2 años por terciles de niveles de GDF-15 al ingreso de 1034 pacientes no invasivos con SCA-NSTE (<1200 n=400, 1200 - 1800 n=394, >1800

n=240) inscritos en el ensayo FRISC II ($P < 0,0001$ por ensayo de rango logarítmico). (B) Probabilidad acumulada de infarto agudo de miocardio durante 2 años por terciles de niveles de GDF-15 al ingreso de 1045 pacientes invasivos con SCA-NSTE (<1200 n=416, 1200 - 1800 n=376, >1800 n=253) inscritos en el ensayo FRISC II ($P = 0,6915$ por ensayo de rango logarítmico).

5 **Figura 2:** Probabilidad acumulada de muerte durante 1 año según terciles de niveles de GDF-15 al ingreso de 2081 pacientes con SCA-NSTE inscritos en el ensayo GUSTO-IV ($P < 0,001$ por ensayo de rango logarítmico).

10 **Figura 3:** Análisis mediante curvas de característica operativa del receptor (ROC) que relacionan los niveles de biomarcador con la mortalidad durante 1 año en 2081 pacientes con SCA-NSTE inscritos en el ensayo GUSTO-IV. Las áreas calculadas por debajo de las curvas fueron de 0,757 para NT-proBNP, 0,728 para la eliminación de creatinina, 0,629 para CRP y 0,620 para troponina T.

15 **Figura 4:** Mortalidad durante 1 año de seguimiento entre subgrupos de pacientes con SCA-NSTE inscritos en el ensayo GUSTO-IV, sin (panel A) y con (panel B) un historial previo de infarto de miocardio, según terciles de niveles de GDF-15 y de NT-proBNP al ingresar. En cada columna se indica el número de muertes por número de pacientes.

20 **Figura 5** (no es parte de la presente invención). (A) Supervivencia acumulada en pacientes con fallo cardíaco crónico de la cohorte de derivación por cuartiles de GDF-15 ($P < 0,001$ por ensayo de rango logarítmico). (B) Supervivencia acumulada en pacientes con fallo cardíaco crónico de la cohorte de validación; los pacientes se agruparon según los niveles de corte definidos en la cohorte de derivación ($P < 0,001$ por ensayo de rango logarítmico). El número de pacientes en peligro se indica abajo.

25 **Figura 6** (no es parte de la presente invención). Predictores univariante de mortalidad durante el seguimiento de pacientes con fallo cardíaco crónico de las cohortes de derivación (A) y de validación (B). Se indican los índices de riesgo con intervalos de confianza del 95%, valores Chi^2 y valores P. La creatinina, el ácido úrico, el NT-proBNP y el GDF-15 no se distribuyeron normalmente y por tanto se transformaron en sus logaritmos naturales antes del análisis; los índices de riesgo se refieren a un incremento de una unidad en la escala de logaritmos naturales de estas variables.

Figura 7 (no es parte de la presente invención). (A) Índice de supervivencia sin episodios adversos de pacientes en un periodo de tiempo de 30 días. Los pacientes se han clasificado según sus niveles de GDF-15 (superiores o inferiores a 4.600 ng/l); (B) Índice de supervivencia en un periodo de tiempo de 180 días.

30 Los siguientes ejemplos ilustran exclusivamente la presente invención. De ningún modo deben interpretarse como limitativos del ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1: Determinación de GDF-15, NT-proBNP y troponina en muestras de suero y plasma

35 Para determinar la concentración de GDF-15 en muestras de suero y plasma se desarrolló un ensayo inmunoradiométrico (IRMA), empleando un anticuerpo policlonal IgG de cabra anti GDF-15 humano, purificado por cromatografía de afinidad con GDF-15, de R&D Systems (AF957). Por la noche se recubrieron tubos Maxisorp Startubes (Nunc) a 4°C con 0,5 µg de IgG anti-GDF-15 en tampón de carbonato de Na 0,1 M (pH 9,0) y después se lavaron dos veces con suero fisiológico que contenía 0,1% de Tween 20, tamponado con fosfato. Se diluyeron muestras de suero o de plasma (100 µl) 1:1 con tampón de ensayo (30 g/l de BSA, 10 g/l de IgG bovina, 1% de suero de cabra, 0,1% de azida Na, NaCl 1 M, tampón de fosfato Na 40 mM, pH 7,4), se añadieron a los tubos y se incubaron durante 16 horas a 4°C. Tras dos etapas de lavado se diluyeron 10 ng de IgG anti-GDF-15 yodada [125 I] (actividad específica 0,74 MBq/µg) en 200 µl de tampón de ensayo, se añadieron a cada tubo y se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente. Tras tres etapas de lavado finales se cuantificó en un contador gamma (LKB Wallac 1261) la radiactividad fijada. En cada ensayo se generó una curva estándar con GDF-15 humano recombinante de R&D Systems (957-GD/CF). Los resultados con nuevos lotes de proteína GDF-15 recombinante se comprobaron en muestras estándar de plasma y cualquier desviación superior al 10% se corrigió introduciendo un factor de ajuste para este ensayo. Las mediciones de GDF-15 en muestras de suero y plasma del mismo paciente dieron resultados prácticamente idénticos tras la corrección final por factores de dilución. El límite de detección del ensayo fue de 20 pg/ml. El coeficiente de variación intraensayo determinado para niveles de GDF-15 medios de 744, 1518 y 8618 pg/ml fue respectivamente del 5,6, 5,9 y 6,5%. El coeficiente de variación intraensayo determinado para niveles de GDF-15 medios de 832, 4739 y 9230 pg/ml fue respectivamente del 8,6, 5,7 y 4,4%.

Los niveles de troponina T fueron determinados mediante un ensayo de tercera generación en un analizador Elecsys 2010 (Roche Diagnostics), con un límite de detección de 0,01 ng/ml.

Los niveles de NT-proBNP fueron determinados mediante un inmunoensayo en un Elecsys 2010, con un límite de detección de 20 pg/ml.

55 **Ejemplo 2:** Análisis de las diferencias entre regímenes de tratamientos invasivos y no invasivos en los pacientes con SCA-NSTE del estudio FRISC II

Los pacientes para el estudio FRISC II se reclutaron entre junio de 1996 y mayo de 1998 en 58 hospitales escandinavos, de los cuales 16 eran centros de intervención. Se podían escoger pacientes si tenían síntomas de isquemia que aumentaran o aparecieran en reposo o justificaran la sospecha de infarto agudo de miocardio, con el último episodio dentro de las 48 horas antes del inicio del tratamiento con dalteparina o con heparina estándar. La isquemia miocárdica tenía que verificarse por electrocardiografía (depresión ST \geq 0-1 mV o inversión de la onda T \geq 0-1 mV) o por el aumento de marcadores bioquímicos (creatininasa [CK]-MB $>$ 6 ug/l, troponina-T $>$ 0,01 ng/ml, prueba cualitativa de troponina-T positiva o actividad catalítica de CK, CK-B, o CK MB superior al límite diagnóstico local para el infarto de miocardio). Los criterios de exclusión fueron: mayor riesgo de episodios de sangrado, anemia o indicación o tratamiento de trombolisis en las 24 horas anteriores, angioplastia en los últimos 6 meses, figurar en una lista de espera para revascularización coronaria, otra enfermedad cardíaca aguda o grave, insuficiencia renal o hepática, osteoporosis reconocida como clínicamente relevante, otras enfermedades graves, hipersensibilidad a fármacos aleatorizados, suposición de dificultades para cooperar o participar en este u otros ensayos clínicos, pacientes con cirugía previa a corazón abierto, edad avanzada (p.ej. $>$ 75 años) u otros trastornos que hacían inapropiada la aleatorización para una revascularización temprana. El estudio FRISC II fue un ensayo prospectivo, aleatorizado y multicéntrico con grupos paralelos. Comparamos tratamientos invasivos y no invasivos por diseño factorial. A la mitad de los pacientes de cada grupo se le asignó aleatoriamente un tratamiento a largo plazo con dalteparina o placebo por vía subcutánea durante 3 meses. La comparación de las estrategias invasivas y no invasivas fue abierta y la comparación del tratamiento de dalteparina a largo plazo con el placebo fue doble ciego.

En los grupos invasivos el objetivo era realizar todos los procedimientos invasivos en los 7 días siguientes al inicio con dalteparina al descubierto. Los tratamientos invasivos directos fueron: angiografía coronaria a los pocos días del reclutamiento, con la intención de revascularizar en los 7 días siguientes al inicio del tratamiento abierto. Se recomendó la revascularización para todos los pacientes con una obstrucción de al menos el 70% del diámetro en cualquier arteria que irriga una porción sustancial del miocardio. Se recomendó la intervención coronaria percutánea si había una o dos lesiones objetivas y se prefirió la cirugía de derivación arterial coronaria en pacientes con enfermedad de tres vasos o de la arteria principal izquierda.

El tratamiento no invasivo incluyó angiografía coronaria en pacientes con síntomas refractarios o recurrentes a pesar del tratamiento médico máximo o isquemia grave en una prueba de esfuerzo limitado por síntomas, antes del alta. Los criterios de la prueba de esfuerzo para realizar la angiografía y revascularización fueron: depresión ST \geq 0,3 mV, dolor pectoral limitante asociado a una baja carga de trabajo máximo ($<$ 90 W en hombres o $<$ 70 W en mujeres) o a un descenso de la presión sanguínea, o una elevación ST sin ondas Q concomitantes precedentes o una inversión de la onda T en la prueba de esfuerzo. Durante el seguimiento se tuvieron en cuenta los procedimientos invasivos, independientemente de la estrategia aleatorizada, para todos los pacientes con síntomas incapacitantes, inestabilidad recurrente o reinfarcto.

Al ingresar, los pacientes se trataron inicialmente de manera abierta con infusión subcutánea de dalteparina o heparina estándar, ajustada para el tiempo de tromboplastina parcial activada. A partir de la distribución aleatoria, todos los pacientes recibieron 120 UI/kg de dalteparina cada 12 horas (dosis máxima de 10.000 UI) por vía subcutánea, durante al menos 5 días en el grupo no invasivo y hasta la finalización de los procedimientos en el grupo invasivo. Después los pacientes recibieron dos inyecciones diarias subcutáneas de dalteparina o placebo. Las mujeres que pesaban menos de 80 kg y los hombres que pesaban menos de 70 kg recibieron 5.000 UI de dalteparina o placebo y los hombres y mujeres de peso superior a estos valores recibieron 7.500 UI. Este régimen se mantuvo durante 3 meses, con los pacientes autoinyectándose con jeringas monodosis precargadas, tras el alta hospitalaria. La última inyección del tratamiento con dalteparina en ensayo abierto o doble ciego se administró antes de las 12 h previas a los procedimientos coronarios. Tras la angioplastia se reanudó la administración de dalteparina o placebo 2-6 horas después de extraer la vaina. Tras la administración de una infusión del inhibidor abciximab de la glicoproteína IIb/IIIa no se reanudó la administración de dalteparina o placebo hasta 24 h después. Tras la cirugía de derivación de arterias coronarias todos los pacientes recibieron en abierto 5.000 UI de dalteparina dos veces al día, hasta la movilización, y el tratamiento en doble ciego se inició unos días antes del alta. El cumplimiento de este régimen se controló pidiendo a los pacientes que anotaran todas las inyecciones en diarios y contando las jeringas devueltas o no usadas por los pacientes ambulatorios. Al ingresar se administró a todos los pacientes una dosis inicial de 300-600 mg de aspirina, seguida de una dosis de mantenimiento de 75-320 mg una vez al día. Se administró un β -bloqueador, a no ser que estuviera contraindicado. En caso necesario se pudieron agregar nitratos orgánicos y antagonistas de calcio. Conforme a las modernas directrices de tratamiento se recomendó la reducción del colesterol con estatinas, inhibidores del enzima convertidor de angiotensina para la disfunción ventricular izquierda y tratamiento antidiabético agresivo. Se fomentó el uso de abciximab durante las intervenciones coronarias percutáneas. Se recomendó ticlopidina durante 3-4 semanas tras la colocación de un stent. Al ingresar, o como más tarde al realizar la distribución aleatoria, se analizaron localmente las muestras de sangre para determinar las concentraciones de hemoglobina, el recuento de leucocitos y plaquetas, el tiempo de protrombina, creatinina, glucosa, hemoglobina A10 en caso necesario, triglicéridos, colesterol, colesterol HDL y LDL. Los marcadores bioquímicos de lesión miocárdica se analizaron al ingreso, tras nuevos episodios de dolor pectoral fuerte y antes y 4-24 h después de la revascularización. El marcador de lesión miocárdica usado con mayor frecuencia fue la CK-MB masa, pero algunos centros utilizaron la actividad de CK total, CK-B o ambas. En la mayoría de hospitales se disponía de determinación cuantitativa de troponina-T. Con fines explorativos proporcionamos a todos los centros un test cualitativo de troponina-T, la segunda generación de Cardio-T (Roche-Boehringer Mannheim, Mannheim,

- Alemania). Al realizar la distribución aleatoria, las muestras de sangre de todos los pacientes se guardaron congeladas a -70°C para el análisis central de troponina-T y otros marcadores. Se hizo electrocardiografía convencional de 12 derivaciones al ingresar, al realizar la distribución aleatoria, en las 24 h previas a procedimientos invasivos, al obtener el alta del hospital, a los 3 y 6 meses en visitas ambulatorias y ante cualquier sospecha de angina inestable recurrente o de infarto de miocardio. Los pacientes del grupo no invasivo que no tuvieron contraindicaciones hicieron una prueba de esfuerzo limitado por síntomas en bicicleta 16 h antes del alta. Se realizó electrocardiografía con una evaluación estándar de la función ventricular izquierda en 1951 pacientes antes del alta y siempre antes de los procedimientos invasivos. Todos los resultados de las pruebas de esfuerzo y los electrocardiogramas se enviaron a un laboratorio central para su valoración.
- El objetivo principal fue comprobar los efectos de la estrategia invasiva y no invasiva en el criterio de valoración compuesto de muerte e infarto de miocardio a los 6 meses. Otros criterios predefinidos fueron muerte total, infarto de miocardio, síntomas de angina, necesidad de angiografía coronaria posterior y revascularización, episodios de sangrado y apoplejía. El infarto de miocardio se definió mediante dos de los tres típicos criterios convencionales: dolor pectoral, registro electrocardiográfico diagnóstico (sobre todo de nuevas ondas Q) o un incremento del marcador bioquímico de lesión miocárdica según las siguientes definiciones. Para el infarto de miocardio no relacionado con el procedimiento: concentración de CK-MB masa mayor que el límite diagnóstico del hospital local en una medición; actividad catalítica CK, CK-B o CKMB superior al doble del límite local en una medición. Para el infarto de miocardio relacionado con intervenciones coronarias percutáneas: CK-MB masa 1,5 veces el límite diagnóstico del hospital local para infarto de miocardio en una medición; actividad catalítica CK, CK-B o CKMB en una medición tres veces superior al límite o en dos mediciones 1,5 veces el límite local. Las ondas Q nuevas solo se usaron para el diagnóstico del infarto de miocardio relacionado con cirugía de derivación de arterias coronarias. Las causas de muerte deberían establecerse por necropsia. Todos los informes de muertes, infartos de miocardio, aumentos de marcadores bioquímicos relacionados con intervenciones coronarias percutáneas y nuevas ondas Q en electrocardiografía del laboratorio central fueron juzgados por un comité independiente de actos clínicos. La calidad de los datos se aseguró mediante la verificación continua de la obtención de datos en todos los informes de casos registrados, por parte de controladores externos empleados por la compañía farmacéutica patrocinadora. Todos los episodios cardíacos (criterios de eficacia) y datos de episodios adversos se enviaron continuamente desde los centros a la junta de control de datos y seguridad. El estudio cumplió la Declaración de Helsinki y todos los comités éticos locales aprobaron el protocolo.
- Las concentraciones de GDF-15 en suero o plasma se determinaron al ingresar, utilizando el mismo ensayo inmunoradiométrico (IRMA) descrito en el estudio GUSTO IV (véase el anterior ejemplo 1). Las diferentes proporciones de episodios trascendentes (infarto de miocardio a los 2 años, muerte a los 2 años, infarto de miocardio y muerte a los 2 años) se registraron por terciles de niveles de GDF-15 (< 1200 pg/ml; 1200-1800 pg/ml; > 1800 pg/ml) en el grupo asignado a la estrategia de tratamiento invasivo y en el grupo asignado a la estrategia de tratamiento no invasivo. Se usó el método de Kaplan-Meier para ilustrar la sucesión temporal de episodios durante el seguimiento respecto a los terciles de GDF-15 en ambos grupos (figura 1).

La siguiente tabla 1 muestra los riesgos de mortalidad (muerte) y/o de otro infarto agudo de miocardio (IAM).

Tabla 1: resultado a los 2 años en relación con una estrategia invasiva frente a una estrategia no invasiva en 1045 pacientes invasivos y 1034 pacientes no invasivos con SCA-NSTE inscritos en el ensayo FRISC II

	Terciles de GDF-15	No invasivo % de episodios (total N)	Invasivo % de episodios (total N)	Cociente de probabilidades estimado (IC 95%)	Valor p
Muerte/IAM	< 1200	9,3 (400)	9,6 (416)	1,044 (0,652 hasta 1,669)	0,8584
	1200-1800	16,5 (394)	11,2 (376)	0,637 (0,420 hasta 0,966)	0,0337
	> 1800	27,9 (240)	14,6 (253)	0,442 (0,282 hasta 0,693)	0,0004
IAM	< 1200	8,0 (400)	8,2 (416)	1,024 (0,619 hasta 1,693)	0,9278
	1200-1800	12,9 (394)	9,8 (376)	0,734 (0,468 hasta 1,150)	0,1772
	> 1800	21,7 (240)	9,5 (253)	0,379 (0,225 hasta 0,638)	0,0003
Muerte	< 1200	1,8 (400)	1,4 (416)	0,822 (0,274 hasta 2,466)	0,7261
	1200-1800	4,1 (394)	2,1 (376)	0,514 (0,217 hasta 1,215)	0,1292
	> 1800	13,3 (240)	6,3 (253)	0,439 (0,234 hasta 0,823)	0,0102

Ejemplo 3: Análisis de mortalidad y reinfarcto de miocardio a corto y largo plazo en los pacientes con SCA-NSTE del estudio GUSTO-IV

- Las muestras investigadas eran de pacientes con SCA-NSTE, del ensayo GUSTO-IV realizado entre 1999 y 2000. El diseño detallado y los resultados principales del ensayo han sido publicados (Simoons 2001, *Lancet* 98:351-360; Ottervanger 2003, *Circulation*, 107: 437-442). Los pacientes elegibles para el estudio eran de al menos 21 años de edad y habían tenido uno o más episodios de angina de al menos 5 minutos de duración, en las 24 horas siguientes al ingreso, y un positivo en la prueba de troponina cardíaca o al menos 0,5 mm de depresión del segmento ST. Los pacientes se trataron aleatoriamente con infusión de abciximab o placebo durante 24 o 48 horas, además del

tratamiento médico estándar. En 30 días de seguimiento se registró la mortalidad total y la proporción de infartos de miocardio dictaminados. Tras 1 año de seguimiento solo se registró la mortalidad total. En un subestudio con 399 pacientes consecutivos reclutados en localidades suecas se dispuso de muestras de plasma al ingresar (es decir en estado basal) y a las 24 horas, 48 horas y 72 horas, las cuales fueron las primeras que se analizaron en el presente estudio. Basándose en los resultados significativos de esta cohorte se decidió analizar niveles de GDF-15 en muestras de suero tomadas de otros 1682 pacientes aleatorios al ingresar en el ensayo, a fin de conseguir al menos 2000 pacientes y poder investigar las interacciones con otros biomarcadores utilizados para el pronóstico, es decir troponina T, NT-proBNP, CRP y eliminación de creatinina.

También se obtuvieron muestras de plasma de sujetos aparentemente sanos incluidos en el grupo de mujeres y hombres suecos y en el estudio de la enfermedad isquémica cardíaca (SWISCH). Esta población estaba formada por 429 personas mayores que se equipararon por edad y sexo a otra población contemporánea de SCA-NSTE incluida en el ensayo de Fragmin y revascularización rápida durante la inestabilidad en la enfermedad arterial coronaria (FRISC II). El diseño detallado y algunos resultados de biomarcadores del ensayo SWISCH están publicados. Los sujetos con un ECG de 12 derivaciones anormal en reposo, medicación cardiovascular, enfermedad cardiovascular comprobada, con otra enfermedad crónica o con una enfermedad aguda fueron excluidos de la población de control. Se requirió que todos los participantes en el estudio SWISCH presentaran niveles normales de creatinina, glucosa en sangre y hemoglobina, y recuentos normales de leucocitos y plaquetas.

Las características del estado basal se presentan en forma de números y proporciones. Los datos continuos están expresados en forma de mediana y rangos intercuartiles. Las comparaciones de variables continuas entre casos y controles se evaluaron mediante ensayos U de Mann-Whitney, no paramétricos. Para evaluar las relaciones entre los niveles de GDF-15 y las características del estado basal, y los niveles de troponina T, NT-proBNP, CRP y eliminación de creatinina, en los terciles de GDF-15, se usaron tanto los coeficientes de correlación de rango de Spearman entre GDF-15 y estos factores, como la prueba de tendencia de Cochran-Armitage para las relaciones entre las proporciones de varios grupos. Los coeficientes de correlación de Spearman y la prueba de rangos asignados de Wilcoxon se usaron para comparar las variaciones de GDF-15 con el tiempo en el grupo de pacientes. Las diferencias de proporciones en los episodios trascendentes (infarto de miocardio a los 30 días, muerte a los 30 días, infarto de miocardio y muerte a los 30 días, muerte a 1 año) en terciles de niveles de GDF-15 se valoraron mediante la prueba de tendencia de Cochran-Armitage. El método de Kaplan-Meier se usó para ilustrar la sucesión temporal de episodios durante el seguimiento respecto a los terciles de GDF-15 y la evaluación estadística se realizó mediante la prueba de rango logarítmico (figura 2). Para identificar los predictores de muerte a 1 año se utilizaron análisis de regresión logística simple. Todas las variables se analizaron luego en un análisis de regresión logística múltiple. Para la comparación adicional de los valores de pronóstico de GDF-15, troponina T, NT-proBNP, CRP y eliminación de creatinina respecto a la muerte a 1 año se generaron curvas de característica operativa del receptor (ROC) y se calcularon las áreas bajo las curvas (figura 3). Todos los análisis de datos se efectuaron empleando el programa estadístico SAS 9.0.

Niveles de GDF-15 en sujetos de control aparentemente sanos

Los controles estaban formados por 288 hombres (67,1%) y 141 mujeres (32,9%) con una mediana de edad de 65 años (rango intercuartil de 59 a 71 años), de los cuales el 14,5% eran fumadores habituales. La mediana de nivel de GDF-15 en esta población fue de 762 pg/ml, con 460 pg/ml y 1191 pg/ml como los percentiles 10° y 90°, respectivamente. El límite normal superior (LNS) se redondeó por tanto a 1200 pg/ml. La mediana (rango intercuartil) de los niveles de NT-proBNP, CRP y eliminación de creatinina fue de 74 (46 hasta 113) pg/ml, 1,40 (0,79 hasta 2,40) ug/ml y 73 (62 hasta 86) ml/min, respectivamente. Los niveles de GDF-15 se correlacionaron directamente con la edad (ro de Spearman = 0,21; $P < 0,001$) y la actividad antiinflamatoria (CRP, ro = 0,18; $P < 0,001$) e inversamente con la eliminación de creatinina (ro = -0,14; $P = 0,002$). En este grupo no hubo correlaciones importantes en cuanto al sexo, hábito de fumar o NT-proBNP.

Niveles de GDF-15 en pacientes de SCA-NSTE al ingresar

Los pacientes de SCA-NSTE constaron de 1315 hombres (63,2%) y 766 mujeres (36,8%) con una mediana de edad de 66 años (rango intercuartil de 57 a 74 años). A pesar de que los pacientes eran algo mayores que los controles sanos ($P = 0,014$), las dos cohortes eran bien comparables en cuanto a edad y sexo. El tratamiento aleatorio con abciximab no tuvo ninguna influencia en los niveles de GDF-15 medidos en cualquier momento y por lo tanto los grupos distribuidos aleatoriamente se combinaron. En la tabla 2 figura el tiempo de comienzo del síntoma hasta el ingreso, la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular, las manifestaciones previas y los tratamientos de la enfermedad cardiovascular, los signos de isquemia persistente en el ECG y los niveles basales troponina T, NTproBNP, CRP y eliminación de creatinina en esta población de pacientes. Los pacientes de SCA-NSTE presentaron significativamente ($P < 0,001$) mayores niveles de GDF-15 en comparación con los controles sanos; la mediana fue de 1445 pg/ml y los percentiles 10°, 33°, 66° y 90° fueron respectivamente de 850 pg/ml, 1187 pg/ml, 1817 pg/ml y 3314 pg/ml. Por tanto unos dos tercios de los pacientes con SCA-NSTE tenían niveles de GDF-15 por encima del LNS (90° percentil) de los controles sanos. Como este LNS correspondía al tercil inferior de los pacientes, éstos se estratificaron en terciles (con límites de corte de 1200 y 1800 pg/ml) al relacionarlos con el resultado.

Relación entre los niveles de GDF-15 y los factores clínicos y bioquímicos en el SCAS-NSTE

El aumento de los terciles de GDF-15 al ingresar se relacionó directamente con la edad, el sexo femenino, el historial de hipertensión y diabetes, las manifestaciones previas de enfermedad cardíaca, es decir angina de pecho, infarto de miocardio, revascularización coronaria y fallo cardíaco, terapia inhibitoria de la ACE, y también con marcadores de isquemia persistente y necrosis, disfunción miocárdica e inflamación, tal como indica la depresión del segmento ST y los niveles troponina T, NTproBNP y CRP (tabla 2); los niveles de GDF-15 se relacionaron inversamente con el hábito de fumar y la eliminación de creatinina (tabla 2). En un análisis de regresión múltiple, empleando el logaritmo natural de GDF-15 como la variable dependiente, se relacionaron significativamente con el GDF-15 los siguientes factores: edad ($P < 0,001$), sexo masculino ($P < 0,001$), tiempo desde la aparición de los síntomas hasta el ingreso ($P = 0,006$; relación inversa), hábito de fumar ($P < 0,001$), diabetes ($P < 0,001$), historial de fallo cardíaco ($P < 0,001$), depresión del segmento ST ($P = 0,050$), NT-proBNP ($P < 0,001$), CRP ($P < 0,001$) y eliminación de creatinina ($P < 0,001$; relación inversa). No hubo ninguna relación independiente respecto al nivel de troponina T ($P = 0,436$).

Tabla 2: Características de los pacientes con SCA-NSTE según los terciles de niveles de GDF-15 al ingresar

	Estudio de derivación (n = 235)	Estudio de validación (n = 220)	Valor P
Características clínicas			
Edad [años]	66 (56-72)	63 (58-69)	0,161
Sexo masculino	215 (91,5)	197 (89,5)	0,479
IMC [kg/m ²] ^a	25,4 (23,0 - 29,3)	26,1 (23,7 - 28,7)	0,444
Etiología isquémica	168 (71,5)	140 (63,6)	0,085
Gravedad del fallo cardíaco y biomarcadores			
Clase NYHA	2,7 ± 0,8	2,2 ± 0,7	< 0,001
I	12 (5,1)	31 (14,1)	
II	84 (35,7)	111 (50,5)	
III	96 (40,9)	72 (32,7)	
IV	43 (18,3)	6 (2,7)	
FEVI [%]	30 (24 - 40)	33 (27 - 38)	0,082
Creatinina [μmol/l]	102 (84 - 137)	99 (90-115)	0,430
Eliminación de creatinina [ml/min] ^a	71,5 (45,6 - 90,8)	68,4 (53,8 - 88,8)	0,638
Ácido úrico [μmol/l] ^b	422 (345 - 529)	390 (330 - 450)	0,392
Hemoglobina [g/dl] ^c	13,8 (12,3-14,9)	14,0 (13,1-14,8)	0,108
NT-proBNP [ng/l]	1340 (434 - 3740)	521 (209 -1070)	< 0,001
GDF-15 [ng/l]	2240 (1232 - 4010)	1465 (1004 - 2194)	< 0,001
Medicación en el estado basal			
Inhibidor de ACE o BRA	183 (77,9)	213 (96,8)	0,004
Bloqueador β	112 (47,7)	146 (66,4)	< 0,001
Diurético	167 (71,1)	194 (88,2)	< 0,001
Espironolactona	58 (24,7)	50 (22,7)	0,703

Los valores son n (%), mediana (25° y 75° percentiles) o media ± DE. ^aDatos de 216 pacientes en la cohorte de derivación y 198 pacientes en la cohorte de validación; ^bdatos de 207 pacientes en la cohorte de validación; ^cdatos de 214 pacientes en la cohorte de validación. IMC significa índice de masa corporal; FEVI, fracción de eyección ventricular izquierda; BRA, bloqueador del receptor de angiotensina.

15

Evolución temporal de los niveles de GDF-15 en el SCA-NSTE

Se estudió la evolución temporal de los niveles de GDF-15 en suero durante un episodio de enfermedad arterial coronaria inestable en una cohorte de 399 pacientes de la población SCA-NSTE, cuyas muestras se tomaron al ingresar y a las 24 horas, 48 horas y 72 horas. El análisis por regresión lineal del logaritmo natural de GDF-15 frente al tiempo reveló una pendiente débil pero estadísticamente significativa ($P = 0,010$), lo cual indica que durante este intervalo de tiempo hubo una subida gradual. Sin embargo, tal como se muestra en la tabla 3, los niveles de GDF-15 en estos cuatro puntos estaban dentro del mismo rango. La variación temporal entre los resultados fue muy limitada, tal como demuestra la estrecha correlación entre los niveles de GDF-15 al ingresar y en los momentos posteriores (tabla 3). El 67,4%, 69,7% y 70,4% de los pacientes tuvo unos niveles de GDF-15 superiores al LNS a las 24 horas, 48 horas y 72 horas, respectivamente.

25

Tabla 3: Evolución temporal de los niveles de GDF-15 en el SCA-NSTE

	Línea base	Seguimiento		
		24 horas	48 horas	72 horas
GDF-15 (ng/l)				
Mediana	1499	1575	1630	1664
Rango intercuartil	(1151 a 2203)	(1112 a 2286)	(1163 a 2396)	(1140 a 2357)
Coefficientes de correlación de Spearman	---	0,89	0,80	0,72
Seguimiento frente a línea base		P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
Variación del nivel de GDF-15 (seguimiento frente a línea base, ng/l)	---	48	74	124
Mediana		(-111 a 253)	(-146 a 360)	(-143 a 434)
Rango intercuartil		P = 0,001	P < 0,001	P < 0,001

5 En una cohorte de 399 pacientes se determinaron los niveles de GDF-15 al ingresar (línea base) y a las 24 horas, 48 horas y 72 horas. Se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman y los valores P para describir las relaciones entre los niveles de GDF-15 en el seguimiento y en la línea base. Las variaciones de los niveles de GDF-15 en el seguimiento, comparados con los de la línea base, se evaluaron mediante la prueba de rangos asignados de Wilcoxon.

Niveles de GDF-15 y mortalidad en el SCA-NSTE

10 El riesgo de muerte de pacientes con SCA-NSTE durante el seguimiento aumentó notablemente a mayores niveles de GDF-15 al ingresar (figura 2). Las curvas de mortalidad de Kaplan-Meier en los diferentes terciles mostraron una pronta separación, con unas tasas de mortalidad a los 30 días del 0,6%, 2,0% y 4,3%, respectivamente (P < 0,001). La separación entre las curvas continuó durante el primer año posterior al incidente y tras 1 año de seguimiento las tasas de mortalidad fueron del 1,5%, 5,0% y 14,1% en los respectivos terciles (P < 0,001). Los análisis ROC también demostraron que el GDF-15 es un poderoso indicador bioquímico de mortalidad, con un área bajo la curva (ABC) de 0,757 en comparación con NT-proBNP (ABC = 0,735), eliminación de creatinina (ABC = 0,728), CRP (ABC = 0,629) y troponina T (ABC = 0,620) (figura 3). Por análisis de regresión logística simple se relacionó la edad, el historial de hipertensión, la diabetes, la angina de pecho o infarto de miocardio previo, el historial de fallo cardíaco congestivo y los niveles de troponina T, NT-proBNP, CRP, eliminación de creatinina y GDF-15 con la mortalidad a 1 año (tabla 4).

15 Empleando un método de regresión logística múltiple, la edad, el infarto de miocardio previo y los mayores niveles de NT-proBNP y GDF-15 resultaron ser los únicos predictores independientes (tabla 4). Entre estos indicadores de riesgo independientes el nivel de GDF-15 resultó ser el mejor predictor de mortalidad (tabla 4). Los resultados no variaron al emplear un método de eliminación progresiva o estratificación del GDF-15 y de los otros biomarcadores en terciles. Igualmente, al añadir una sola cada vez en el marco de una selección gradual, las únicas variables significativas fueron la edad, el infarto de miocardio previo, el NTproBNP y el GDF-15. En concreto los niveles de GDF-15 medidos en la cohorte de 399 pacientes al ingresar y en momentos posteriores proporcionaron una información similar del pronóstico de mortalidad a 1 año, aunque, al parecer, los niveles de GDF-15 en las primeras 24 horas tuvieron el mayor valor predictivo (tabla 5).

30 **Tabla 4:** Análisis de regresión logística de la mortalidad a 1 año en 2081 pacientes con SCA-NSTE respecto a las características de la línea base, del historial médico y de las mediciones al ingresar

	Modelo univariado		Modelo multivariado	
	Tasa estimada de posibilidades (IC 95%)	Valor P	Tasa estimada de posibilidades (IC 95%)	Valor P
Edad (por año)	1,087 (1,066 a 1,108)	< 0,001	1,044 (1,013 a 1,077)	0,006
Sexo (masculino frente a femenino)	0,723 (0,513 a 1,018)	0,064	1,134 (0,730 a 1,764)	0,574
Tiempo a partir de los síntomas (horas)	0,995 (0,971 a 1,020)	0,695	0,980 (0,951 a 1,010)	0,185
Hábito de fumar ¹	0,727 (0,466 a 1,135)	0,161	1,674 (0,930 a 3,012)	0,086
Historial de hipertensión ¹	1,796 (1,265 a 2,550)	0,001	1,102 (0,715 a 1,699)	0,658
Historial de hipercolesterolemia ¹	1,016 (0,692 a 1,490)	0,936	1,386 (0,876 a 2,192)	0,163
Diabetes mellitus ¹	2,251 (1,564 a 3,240)	< 0,001	1,396 (0,883 a 2,207)	0,153
Angina de pecho previa ¹	1,727 (1,221 a 2,445)	0,002	1,075 (0,694 a 1,664)	0,746
Infarto de miocardio previo ¹	2,945 (2,087 a 4,156)	< 0,001	1,904 (1,224 a 2,963)	0,004
Revascularización previa ¹	0,746 (0,437 a 1,273)	0,283	0,583 (0,311 a 1,093)	0,092
Historial de fallo cardíaco ¹	3,404 (2,124 a 5,454)	< 0,001	1,161 (0,647 a 2,084)	0,617
Depresión del segmento ST \geq 0,5 mm ¹	1,348 (0,851 a 2,134)	0,203	1,068 (0,603 a 1,889)	0,822
Troponina T ²	1,255 (1,141 a 1,381)	< 0,001	1,085 (0,948 a 1,241)	0,236
NT-proBNP ²	1,902 (1,674 a 2,161)	< 0,001	1,296 (1,063 a 1,580)	0,010
CRP ²	1,453 (1,278 a 1,654)	< 0,001	1,045 (0,888 a 1,230)	0,596
Eliminación de creatinina ³	0,962 (0,954 a 0,971)	< 0,001	0,995 (0,982 a 1,009)	0,494
GDF-15 ²	4,817 (3,625 a 6,402)	< 0,001	2,197 (1,431 a 3,371)	< 0,001

¹Sí; ²Una unidad en la escala logarítmica natural para las variables troponina T, NT-proBNP, CRP y GDF-15, por haberse transformado en sus logaritmos naturales antes del análisis; ³Variación de 1 ml/min.

Tabla 5: Terciles de GDF en línea base y seguimiento como predictores de mortalidad a 1 año

	Mortalidad a 1 año según los niveles de GDF-15 en / a las			
	Línea base	24 horas	48 horas	72 horas
GDF-15 < 1200 ng/l	1 (0,8)	3 (2,5)	3 (2,7)	5 (4,5)
GDF-15 1200-1800 ng/l	3 (2,4)	0 (0)	5 (4,3)	2 (1,7)
GDF-15 > 1800 ng/l	19 (12,7)	20 (12,1)	15 (8,7)	16 (9,5)
Valor P*	< 0,001	< 0,001	0,037	0,051

5 En una cohorte de 399 pacientes se determinaron los niveles de GDF-15 al ingresar (línea base) y a las 24, 48 y 72 horas. En cada momento los pacientes se estratificaron en terciles según sus niveles de GDF-15. Se registra el número de muertes (%) a 1 año por terciles de GDF-15. *Prueba de tendencia de Cochran-Armitage.

Niveles de GDF-15 y riesgo de infarto de miocardio recurrente en el SCA-NSTE

10 El nivel de GDF-15 al ingresar también estuvo notablemente relacionado con el riesgo de desenlace compuesto de muerte o infarto de miocardio recurrente a los 30 días. Con terciles crecientes de GDF-15, el riesgo de muerte o infarto de miocardio a los 30 días fue del 5,0, 6,9 y 10,8%, respectivamente ($P < 0,001$). Esta relación se dedujo principalmente de la asociación del GDF-15 con la mortalidad. Aunque el riesgo de otro infarto de miocardio dentro de los 30 días posteriores al incidente estaba relacionado significativamente con terciles crecientes de GDF-15, significativamente con tasas de 4,8, 5,6 y 7,2%, respectivamente ($P = 0,048$), no hubo ninguna relación independiente entre el GDF-15 y la tasa infarto de miocardio recurrente a los 30 días en el análisis de regresión logística múltiple.

Combinación de GDF-15 con marcadores de pronóstico en el SCA-NSTE

20 Los análisis de regresión logística múltiple demostraron que el GDF-15 y el NT-proBNP eran los únicos biomarcadores importantes para un pronóstico independiente de mortalidad. Por consiguiente se combinaron terciles de estos marcadores y se usaron como principal predictor clínico independiente de mortalidad, antes del infarto de miocardio. Los resultados revelan que una combinación de terciles crecientes de niveles de GDF-15 y de NT-proBNP proporcionaba información adicional del pronóstico e identificaba estratos de pacientes con una tasa de mortalidad a 1 año comprendida entre 0,3 y 13,7% en pacientes sin un historial previo de infarto de miocardio y entre 4,7 y 23,6% en pacientes con historial previo de infarto de miocardio (figura 4). Estas relaciones se modificaron adicionalmente por la edad del paciente, con una variación relativa del 4,4% en el riesgo de mortalidad por cada año de edad (tabla 4).

25 **Ejemplo 3:** Utilidad del GDF-15 para el pronóstico de pacientes con fallo cardíaco crónico (este ejemplo no forma parte de la presente invención)

30 Se investigó inicialmente la relación de los niveles de GDF-15 con los parámetros clínicos y bioquímicos en la línea base y con la supervivencia en una cohorte de 235 pacientes con FCC inscritos en cuatro centros europeos, en Atenas (Grecia, $n = 51$), Londres (Reino Unido, $N = 89$) y Wrocław / Zabre (Polonia, $n=95$) (cohorte de derivación). En la cohorte de validación evaluamos prospectivamente la hipótesis de principio de la cohorte de derivación, es decir, que los niveles crecientes de GDF-15 circulante proporcionan información de pronóstico independiente en pacientes con FCC. La cohorte de validación incluyó 220 pacientes con FCC reclutados en Verona (Italia). Todos los pacientes participaron en proyectos diseñados para investigar nuevos biomarcadores neurohormonales e inflamatorios en el pronóstico del fallo cardíaco crónico y dieron su consentimiento por escrito. En todos los pacientes el diagnóstico del FCC se basó en síntomas y signos clínicos y en pruebas de dilatación o disfunción sistólica del ventrículo izquierdo por ventriculografía con radionúclidos o invasiva, o por ecocardiografía. Todos los pacientes tenían un historial mínimo de seis meses de FCC y estaban estabilizados por medicación, al menos cuatro semanas antes del estudio. Los pacientes con infarto de miocardio en las 12 semanas anteriores, enfermedad inflamatoria o maligna conocida o niveles creatinina $> 400 \mu\text{mol/l}$ fueron excluidos. Los comités éticos institucionales de todas las sedes participantes en el estudio aprobaron el protocolo.

45 El seguimiento de los pacientes se realizó mediante valoraciones ambulatorias y contacto telefónico. La situación de supervivencia se inspeccionó el 25 de mayo de 2005 en la cohorte de derivación y el 31 de mayo de 2006 en la cohorte de validación. Ningún paciente quedó sin seguimiento. El criterio principal del estudio fue la mortalidad por todas las causas. En la cohorte de validación también se dispuso de información sobre la causa de la muerte. En el momento de la inspección se registraron nueve pacientes sometidos a trasplante de corazón.

50 Tras un tiempo de reposo ≥ 10 minutos en posición semiyacente se sacaron muestras de sangre venosa para determinar el GDF-15 y otros parámetros. Las concentraciones de GDF-15 se determinaron mediante un ensayo inmunoradiométrico (IRMA), empleando un anticuerpo policlonal IgG de cabra anti GDF-15 humano, purificado por cromatografía de afinidad con GDF-15, de R&D Systems (AF957), como se ha descrito recientemente. Todas las mediciones de GDF-15 fueron realizadas en la Escuela médica de Hannover por investigadores que no conocían las características de los pacientes ni sus resultados. Los niveles de NT-proBNP se determinaron mediante un inmunoensayo de quimioluminiscencia (ELICIA, Roche Diagnostics). Las mediciones de creatinina, ácido úrico y hemoglobina se efectuaron en los centros participantes en el estudio. La eliminación de creatinina se calculó según la ecuación de Cockcroft y Gault.

Las características de la línea base se expresan como mediana (25° y 75° percentiles), media \pm desviación estándar o números absolutos y porcentajes, según convenga. Se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para la distribución normal de las variables continuas. Las variables continuas se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney o la prueba t de Student para datos no apareados. Las comparaciones entre estratos de pacientes se llevaron a cabo mediante la prueba de Kruskal-Wallis o ANOVA. Las proporciones se compararon mediante la prueba de chi cuadrado. Se aplicaron análisis de regresión múltiple para identificar factores asociados independientemente a niveles de GDF-15. Se emplearon análisis de riesgos proporcionales de Cox univariante y multivariante para evaluar las asociaciones de pronósticos. Se usaron gráficos de Kaplan-Meier para ilustrar la sucesión de episodios durante el seguimiento de los niveles de GDF-15 y la valoración estadística se realizó por análisis de regresión de Cox. Para comparar los valores de pronóstico de GDF-15, creatinina, ácido úrico, hemoglobina y NT-proBNP se generaron curvas de característica operativa del receptor (ROC) y se calcularon las áreas bajo las curvas (ABC). Todos los análisis de datos se efectuaron con los programas estadísticos StatView 5.0.1 o MedCalc 8.2.0.3 (análisis ROC).

La cohorte de derivación constaba de 235 pacientes con una mediana de edad de 66 años (25° y 75° percentiles, 56 - 72). Las características clínicas y bioquímicas de los pacientes están resumidas en la tabla 6. La mediana del nivel de GDF-15 fue 2240 (1232 - 4010) ng/l. Aproximadamente tres cuartas partes de los pacientes (75,3%) tenían unos niveles de GDF-15 superiores a 1200 ng/l, el límite normal superior (LNS) en sujetos ancianos aparentemente sanos. Los niveles de GDF-15 se relacionaron estrechamente con la clase funcional NYHA: NYHA I: 850 (646 - 1747) ng/l, NYHA II: 1621 (1025 - 2563) ng/l, NYHA III: 2510 (1385 - 3686) ng/l, NYHA IV: 4869 (2722 - 8807) ng/l (P < 0,001 para la tendencia). Como el LNS correspondía al límite del cuartil inferior de la cohorte de derivación, los pacientes se estratificaron en cuartiles (límites de corte de 1200, 2200 y 4000 ng/l) para los demás análisis. De los 235 pacientes de la cohorte de derivación 68 (28,9%) murieron durante el seguimiento. Las tasas de mortalidad a los 12 y 18 meses fueron del 15,0% (IC 95%, 10,3 - 19,7) y 22,9% (IC 95%, 16,5 - 29,3), respectivamente. El riesgo de muerte durante el seguimiento aumentó notablemente con cuartiles crecientes de GDF-15 (figura 5A). Las tasas de mortalidad fueron del 2,0, 8,7, 10,5 y 37,5% a los 12 meses y del 2,0, 23,8, 19,1 y 45,6% a los 18 meses en los respectivos cuartiles (P < 0,001).

La cohorte de validación constaba de 220 pacientes con una mediana de edad de 63 (58 - 69) años. Los pacientes de la cohorte de validación eran menos sintomáticos (clase NYHA), tenían niveles de NT-proBNP más bajos y se trataron más a menudo con inhibidores de ACE o con bloqueadores del receptor de angiotensina, bloqueadores β o diuréticos, pero tenían su edad, distribución por sexos, índice de masa corporal, etiología de fallo cardíaco, FEVI, función renal y sus niveles de ácido úrico y hemoglobina eran comparables con la cohorte de derivación (tabla 6). La mediana del nivel de GDF-15 fue 1465 (1004 - 2194) ng/l, significativamente inferior a la de la cohorte de derivación (tabla 6); en la cohorte de validación el 65% de los pacientes tuvieron niveles de GDF-15 superiores al LNS. Los niveles de GDF-15 se relacionaron estrechamente con la clase funcional NYHA en la cohorte de validación: NYHA I: 1106 (849 - 1682) ng/l, NYHA II: 1294 (1007 - 1945) ng/l, NYHA III: 1903 (1122 - 2650) ng/l, NYHA IV: 4147 (1971 - 5905) ng/l (P < 0,001 para la tendencia).

Tabla 6: Características de los pacientes

	Estudio de derivación (n = 235)	Estudio de validación (n = 220)	Valor P
Características clínicas			
Edad [años]	66 (56-72)	63 (58-69)	0,161
Sexo masculino	215 (91,5)	197 (89,5)	0,479
IMC [kg/m ²] ^a	25,4 (23,0 - 29,3)	26,1 (23,7 - 28,7)	0,444
Etiología isquémica	168 (71,5)	140 (63,6)	0,085
Gravedad del fallo cardíaco y biomarcadores			
Clase NYHA	2,7 \pm 0,8	2,2 \pm 0,7	< 0,001
I	12 (5,1)	31 (14,1)	
II	84 (35,7)	111 (50,5)	
III	96 (40,9)	72 (32,7)	
IV	43 (18,3)	6 (2,7)	
FEVI [%]	30 (24 - 40)	33 (27 - 38)	0,082
Creatinina [μ mol/l]	102 (84 - 137)	99 (90-115)	0,430
Eliminación de creatinina [ml/min] ^a	71,5 (45,6 - 90,8)	68,4 (53,8 - 88,8)	0,638
Hemoglobina [g/dl] ^c	13,8 (12,3-14,9)	14,0 (13,1-14,8)	0,108
NT-proBNP [ng/l]	1340 (434 - 3740)	521 (209 -1070)	< 0,001
GDF-15 [ng/l]	2240 (1232 - 4010)	1465 (1004 - 2194)	< 0,001
Medicación en el estado basal			
Inhibidor de ACE o BRA	183 (77,9)	213 (96,8)	0,004
Bloqueador β	112 (47,7)	146 (66,4)	< 0,001
Diurético	167 (71,1)	194 (88,2)	< 0,001
Espironolactona	58 (24,7)	50 (22,7)	0,703
Ácido úrico [μ mol/l] ^b	422 (345 - 529)	390 (330 - 450)	0,392

Los valores son n (%), mediana (25° y 75° percentiles) o media \pm DE. ^aDatos de 216 pacientes en la cohorte de

derivación y 198 pacientes en la cohorte de validación; ^bdatos de 207 pacientes en la cohorte de validación; ^cdatos de 214 pacientes en la cohorte de validación. IMC significa índice de masa corporal; FEVI, fracción de eyección ventricular izquierda; BRA, bloqueador del receptor de angiotensina.

De los 220 pacientes de la cohorte de validación 49 (22,3%) murieron durante el seguimiento. Las tasas de mortalidad a los 12, 18 y 60 meses fueron del 4,6% (IC 95%, 1,9 - 7,3), 6,9% (IC 95%, 3,6 - 10,2) y 18,6% (IC 95%, 13,3 - 23,9), respectivamente. Al usar los límites de corte establecidos en la cohorte de derivación los mayores niveles de GDF-15 se relacionaron estrechamente con la mortalidad por todas las causas (figura 5B). Las tasas de mortalidad fueron del 3,5, 3,8, 8,0 y 6,3% a los 12 meses, del 5,9, 3,8, 10,7 y 26,3% a los 18 meses y del 10,7, 16,2, 27,2 y 53,1% a los 60 meses, en pacientes con niveles de GDF-15 \leq 1200 ng/l, entre 1201 y 2200 ng/l, entre 2201 y 4000 ng/l y $>$ 4000 ng/l, respectivamente ($P < 0,001$). Tanto los pacientes que murieron por fallo cardíaco progresivo como los que murieron repentinamente tenían niveles de GDF-15 claramente superiores en comparación con los supervivientes (tabla 7).

Tabla 7: Análisis multivariante de la mortalidad por todas las causas mediante regresión de Cox

Características	Cohorte de derivación		Cohorte de validación	
	TR (IC 95%)	Valor P	TR (IC 95%)	Valor P
Edad (cada 10 años)	1,158 (0,906-1,479)	0,241	1,190 (0,776-1,826)	0,425
Sexo masculino	3,491 (0,787-15,49)	0,100	1,018 (0,369-2,811)	0,973
Etiología isquémica	1,101 (0,627-1,931)	0,738	1,009 (0,525-1,939)	0,979
FEVI (por 10% de descenso)	1,609 (1,241-2,086)	$< 0,001$	1,843 (1,177-2,885)	0,008
Clase NYHA (por clase)	1,296 (0,889-1,891)	0,177	1,039 (0,640-1,688)	0,877
Ln de creatinina	2,329 (0,939-5,781)	0,068	0,523 (0,102-2,684)	0,437
Ln de ácido úrico	0,903 (0,398-2,047)	0,806	0,817 (0,239-2,787)	0,747
Hb (por 1 g/dl de descenso)	1,094 (0,939-1,273)	0,248	0,952 (0,758-1,197)	0,676
Ln de NT-proBNP	1,076 (0,836-1,386)	0,569	1,153 (0,824-1,613)	0,407
Ln de GDF-15	2,156 (1,307-3,566)	0,003	2,888 (1,345-6,200)	0,007

Se indican las tasas de riesgo (TR) con intervalos de confianza (IC) del 95% y los valores P. La creatinina, el ácido úrico, el NTproBNP y el GDF-15 no estaban distribuidos normalmente y por tanto se transformaron en sus logaritmos naturales antes del análisis. Las tasas de riesgo se refieren a un aumento de una unidad de la escala de logaritmos naturales en estas variables. Hb significa hemoglobina.

Varias características clínicas y parámetros bioquímicos son indicativos de un pobre pronóstico en pacientes con FCC y el análisis univariante por regresión de Cox confirmó la utilidad de varios de estos acreditados marcadores en ambas cohortes de pacientes (figura 6, A y B). La edad avanzada, una clase NYHA alta, un FEVI reducido, la poca eliminación de creatinina y unos niveles elevados de creatinina y NT-proBNP se relacionaron con un mayor riesgo de muerte en ambas cohortes. Los niveles elevados de ácido úrico, el menor índice de masa corporal y las bajas concentraciones de hemoglobina predijeron la mortalidad por todas las causas solo en la cohorte de derivación. En correspondencia con los datos representados en la figura 5, los niveles más altos de GDF-15 se relacionaron con un aumento importante de la mortalidad en ambas cohortes. El análisis multivariante por regresión de Cox reveló que el GDF-15 y la FEVI eran los únicos predictores independientes de mortalidad por todas las causas, tanto en la cohorte de derivación como en la cohorte de validación (tabla 7). Los resultados no variaron tomando el GDF-15 como variable continua. En el material combinado, el GDF-15 ($P < 0,001$) junto con la FEVI ($P < 0,001$) y la edad ($P = 0,003$) aparecieron como predictores independientes. Al incluir en el modelo el índice de masa corporal y la eliminación de creatinina (datos obtenidos de 408 pacientes), el GDF-15 ($P < 0,001$) junto con la FEVI ($P < 0,001$) y la eliminación de creatinina ($P = 0,045$) predijeron independientemente la mortalidad por todas las causas. Los análisis de curvas ROC revelaron además que el GDF-15 es un fuerte indicador bioquímico de mortalidad, con un área bajo la curva (ABC) de 0,830 (IC 95%, 0,783 - 0,870), que no difería representativamente ($P = 0,523$) del ABC del NT-proBNP (0,852; IC 95%, 0,806 - 0,890), pero era significativamente mucho mayor ($P < 0,001$) que las ABC de la creatinina (0,646; IC 95%, 0,589 - 0,700), del ácido úrico (0,657; IC 95%, 0,598 - 0,708) y de la hemoglobina (0,655; IC 95%, 0,598 - 0,708). El mejor nivel de GDF-15 para predecir la mortalidad a los 18 meses en la población combinada de pacientes fue de 2729 ng/l (sensibilidad, 81,1%; especificidad, 71,2%; cociente de probabilidad positivo, 2,81). Los análisis adicionales por curvas ROC indicaron que 2729 ng/l era el mejor valor de corte para predecir la mortalidad a los 12 meses (datos no representados).

Ejemplo 4: Utilidad del GDF-15 para el pronóstico en pacientes con embolismo pulmonar (este ejemplo no forma parte de la presente invención).

Se ha determinado la cantidad de GDF-15 en muestras de suero de una cohorte de 123 pacientes con embolismo pulmonar agudo, del modo descrito en los ejemplos anteriores. Los pacientes con embolismo pulmonar agudo tenían valores mediana de GDF-15 significativamente elevados (2,196 pg/ml; percentiles 25°-75°: 1.333 a 3.457 pg/ml) en comparación con individuos sanos ($p < 0,001$). En concreto el 82% ($n = 101$) tenía niveles de GDF-15 mayores que el límite normal superior de 1.200 pg/ml. Los pacientes que desarrollaron complicaciones graves (necesitaron intubación, administración de catecolamina o reanimación cardiopulmonar) o que murieron en los 30 días posteriores al muestreo ($n = 17$) tenían niveles en suero de hasta 6.039 pg/ml en la mediana y percentiles 25°-75° de 2.778 a

19.722 pg/ml, mientras que los pacientes sin complicaciones tenían niveles en suero de 2.036 pg/ml en la mediana y percentiles 25°-75° de 1.279 pg/ml a 3.176 pg/ml ($p < 0,001$). La evaluación de los datos demostró que un nivel de GDF-15 superior a 4.600 pg/ml indicaba un riesgo 10 veces mayor de desarrollar complicaciones o de muerte (es decir, el riesgo aumentaba del 5,0% hasta el 52,2%; $p < 0,001$); véase figura 7 (A). A los seis meses el riesgo de muerte había aumentado hasta 7,7 veces ($n = 22$); véase figura 7 (B).

5

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Método para averiguar si un sujeto afectado de un síndrome coronario agudo necesita una intervención cardíaca, el cual consiste en
- a) determinar la cantidad del factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15) en una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto necesitado de una intervención cardíaca y
- 10 b) comparar la cantidad de GDF-15 encontrada en la etapa a) con una cantidad de referencia de 1200 pg/ml, de manera que una cantidad de GDF-15 superior a 1200 pg/ml indica que un sujeto es susceptible de terapia cardíaca y dicha intervención cardíaca se elige del grupo constituido por angioplastia coronaria percutánea, angioplastia coronaria transluminal percutánea con balón, angioplastia láser e implantación de stent coronario o implantación de bypass.
- 15 **2.** El método de la reivindicación 1, que además comprende la determinación de la cantidad de una troponina cardíaca en dicha muestra del sujeto y la comparación de la cantidad de troponina cardíaca con una cantidad de referencia.
- 20 **3.** El método de la reivindicación 2, en que dicha troponina cardíaca es la troponina T.
- 4.** El método según una de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende la determinación de la cantidad de un péptido natriurético en dicha muestra del sujeto y la comparación de la cantidad del péptido natriurético con una referencia.
- 25 **5.** El método de la reivindicación 4, en que dicho péptido natriurético es el NT-proBNP.
- 6.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el cual dicha cantidad de referencia es de 0,01 ng/ml para la troponina cardíaca y dicha troponina cardíaca es la troponina T.
- 30 **7.** El método de la reivindicación 6, en el cual una cantidad de la troponina cardíaca superior a la cantidad de referencia indica que un sujeto es susceptible de una intervención cardíaca.
- 8.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el cual dicha cantidad de referencia es de 1000 pg/ml para el péptido natriurético y dicho péptido natriurético es el NT-proBNP.
- 35 **9.** El método de la reivindicación 8, en el cual una cantidad del péptido natriurético superior a la cantidad de referencia indica que un sujeto es susceptible de una intervención cardíaca.

Figura 1

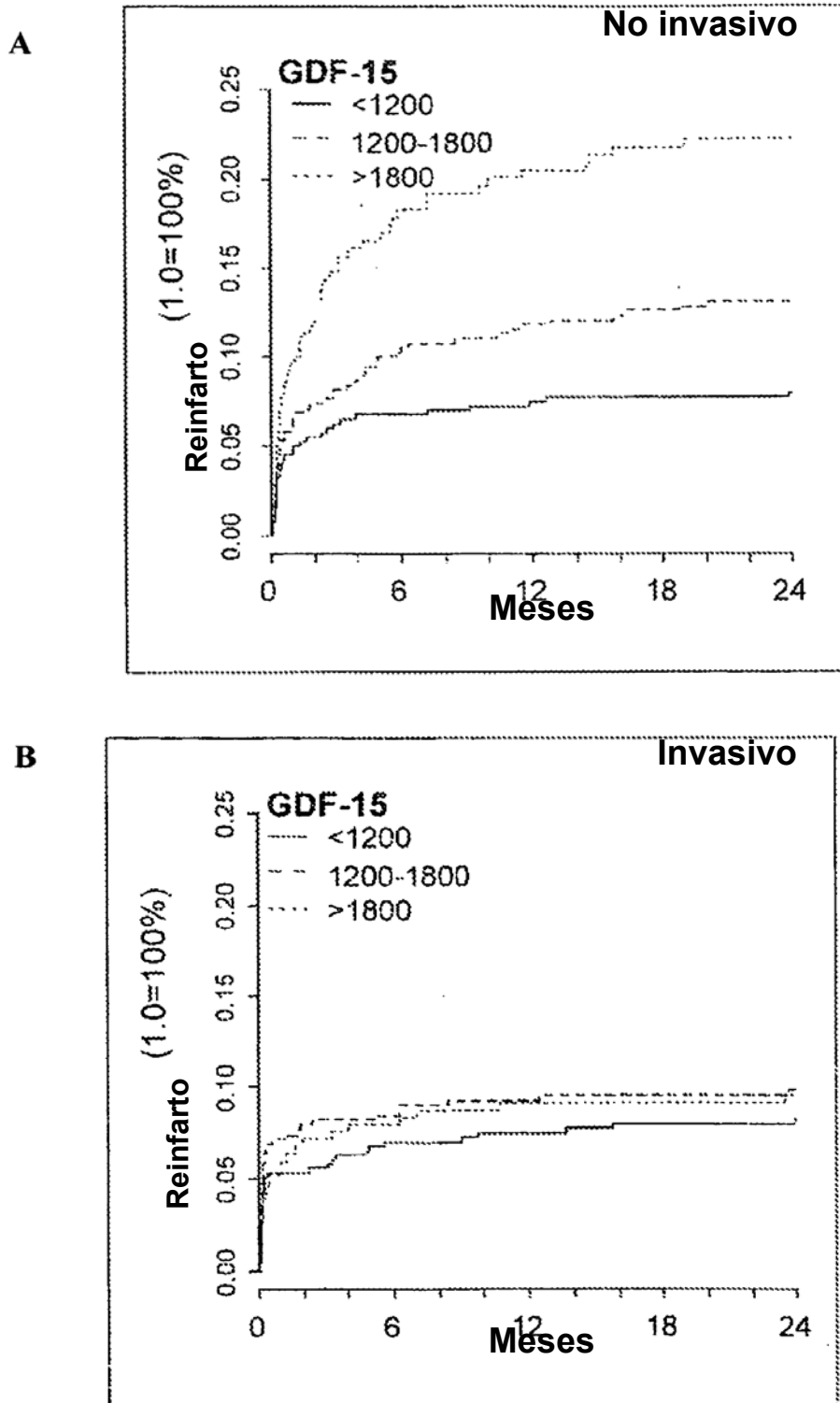


Figura 2

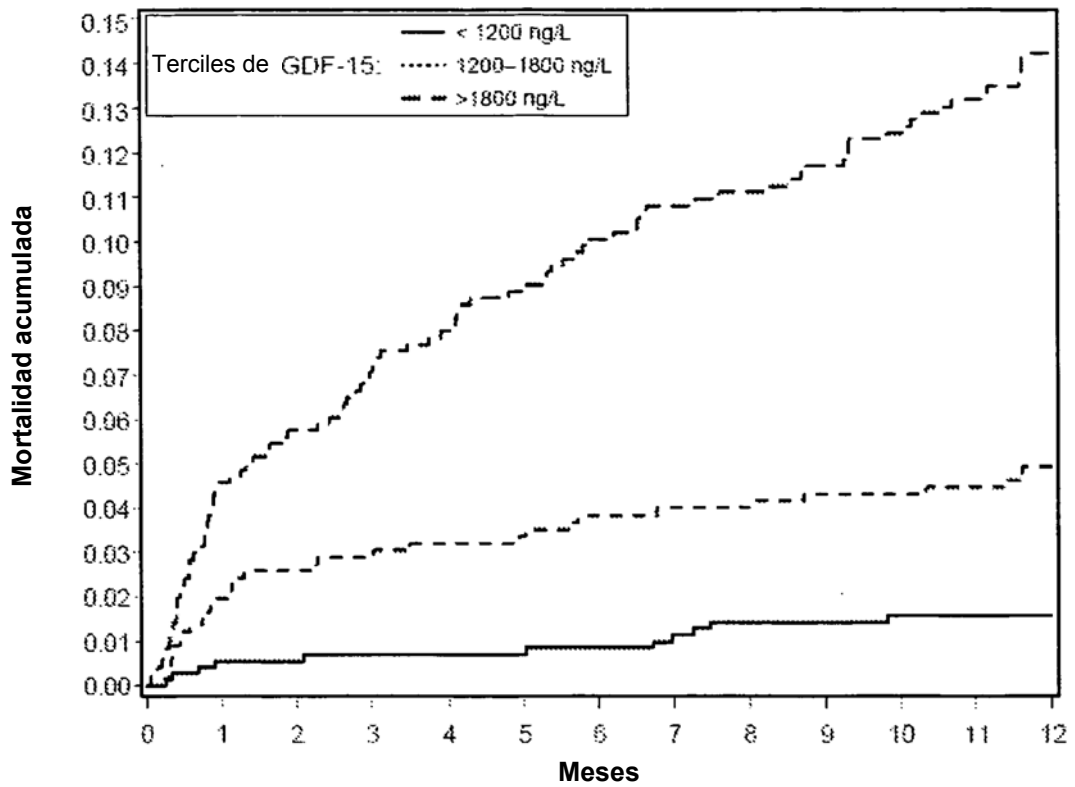


Figura 3

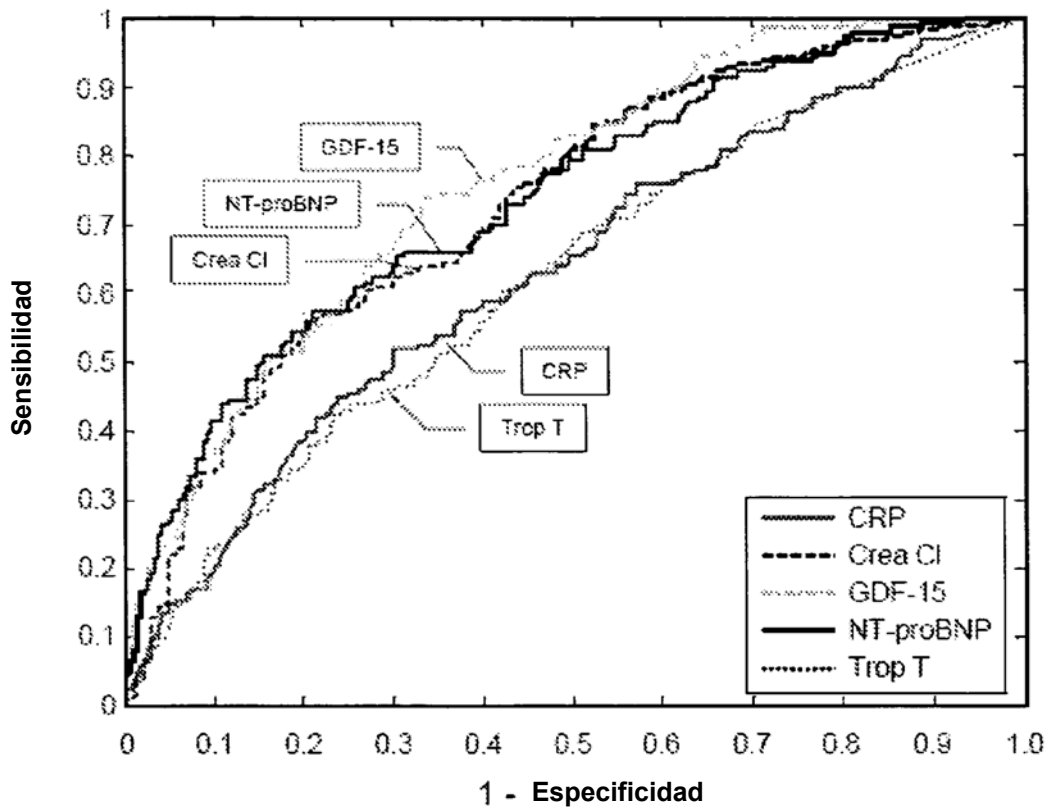


Figura 4

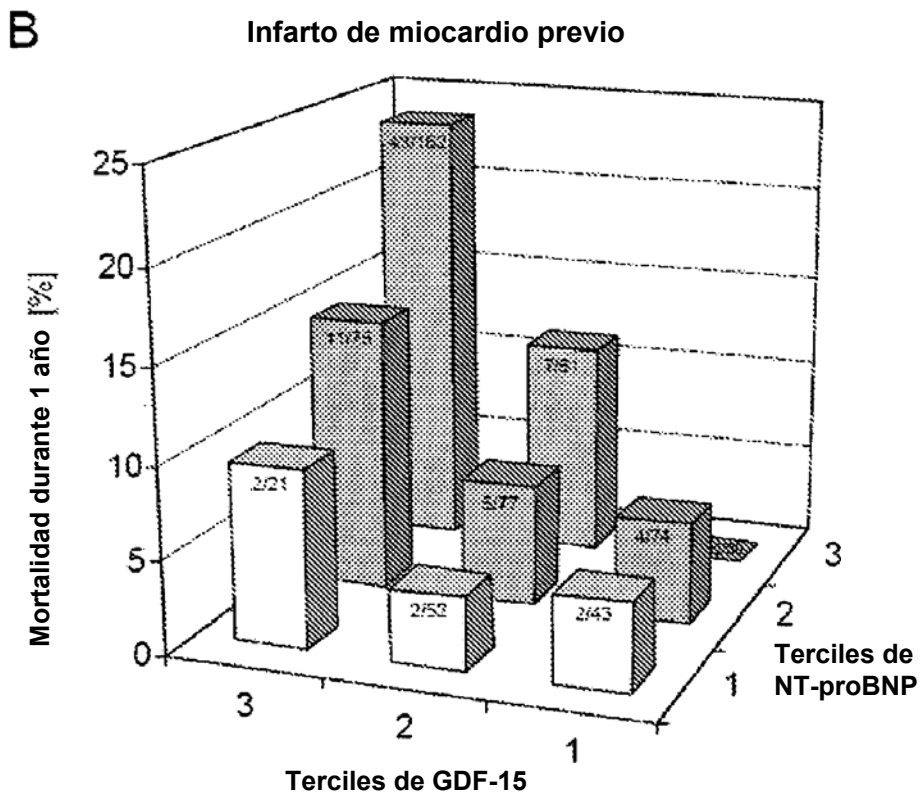
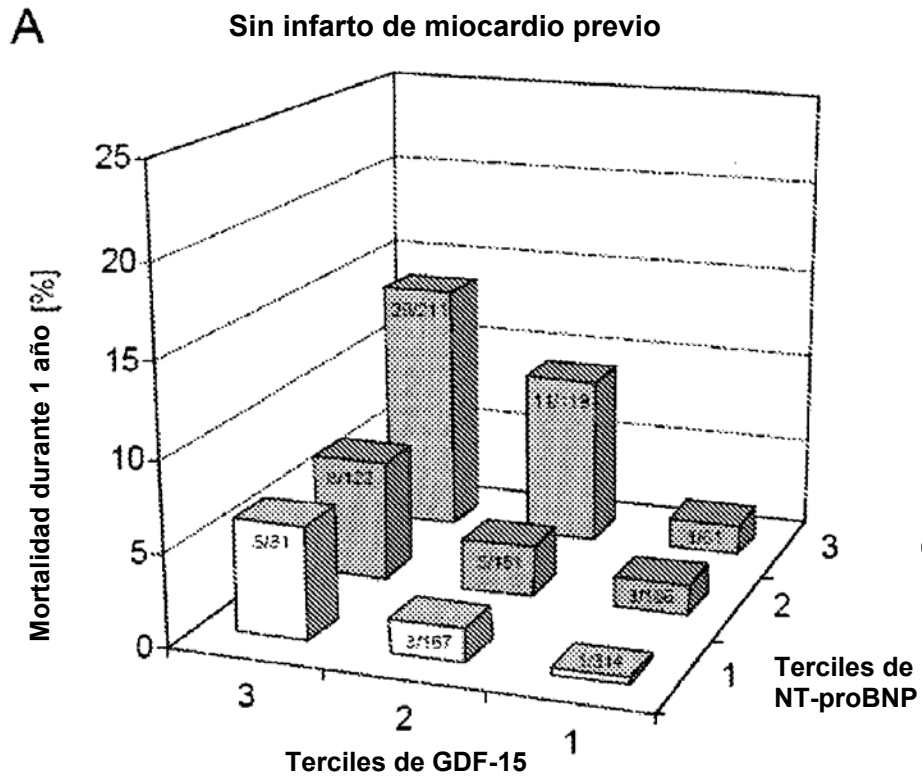


Figura 5

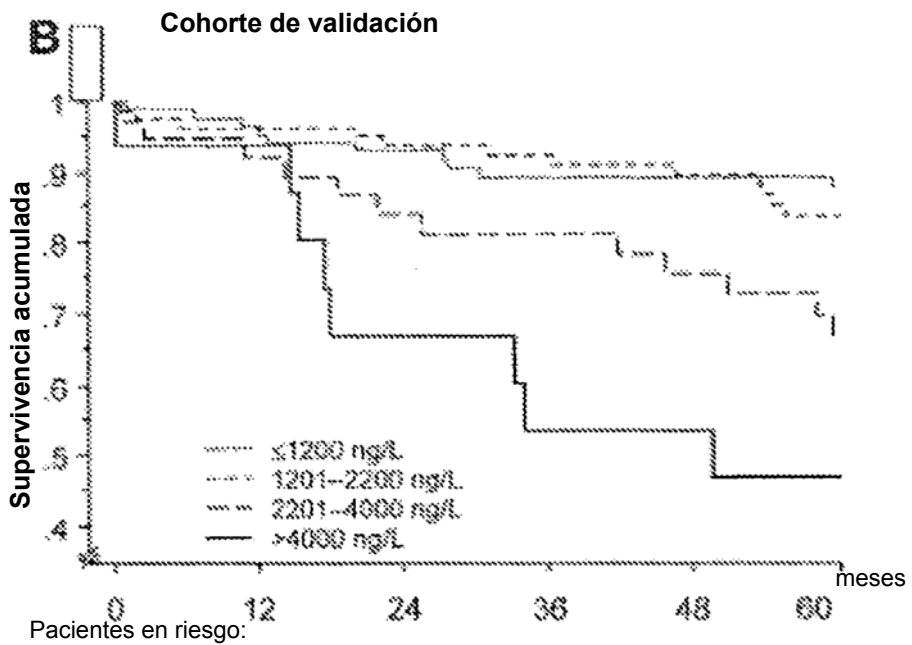
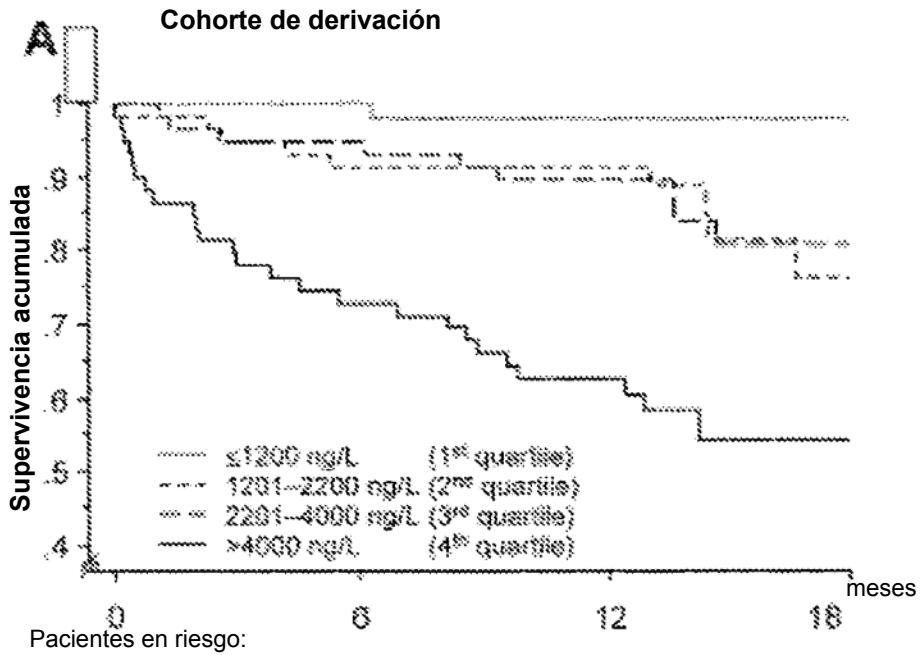


Figura 6

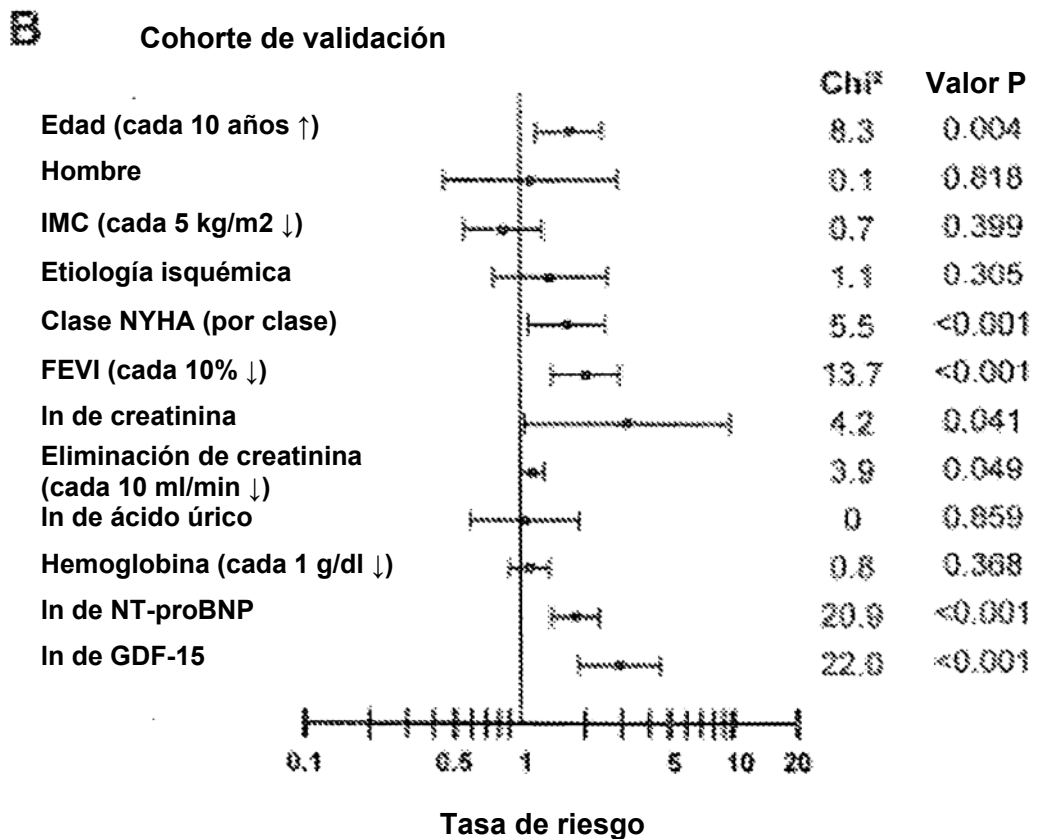
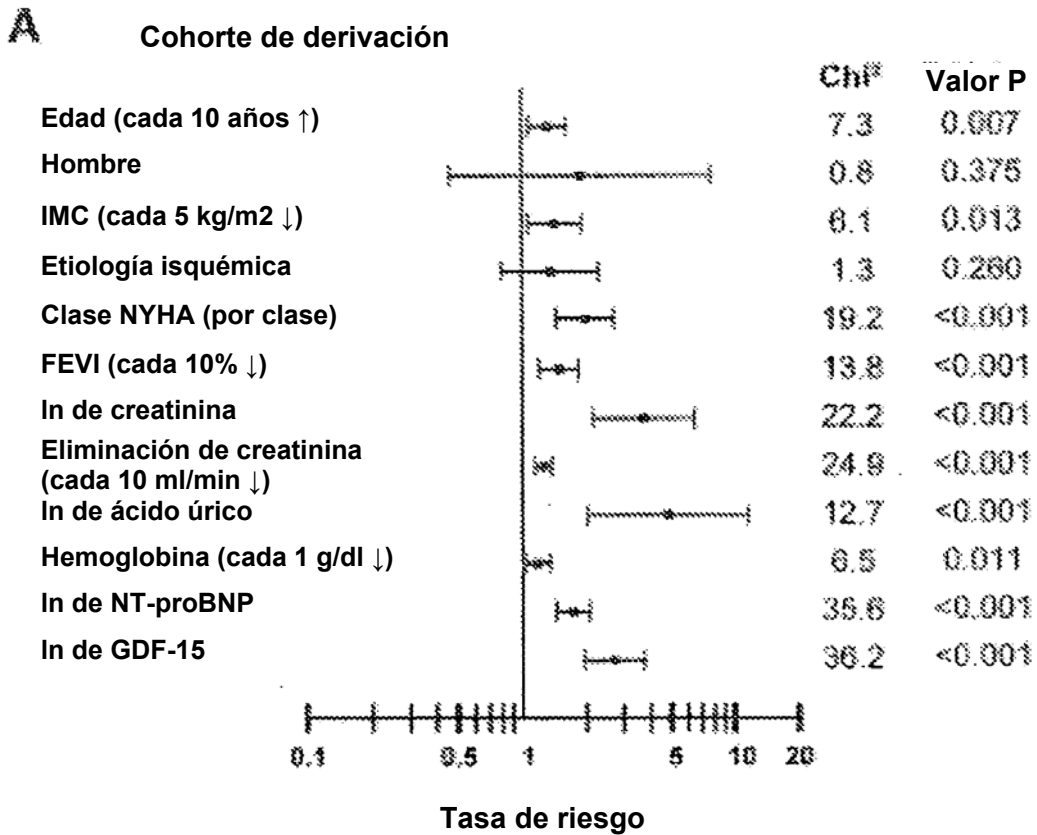
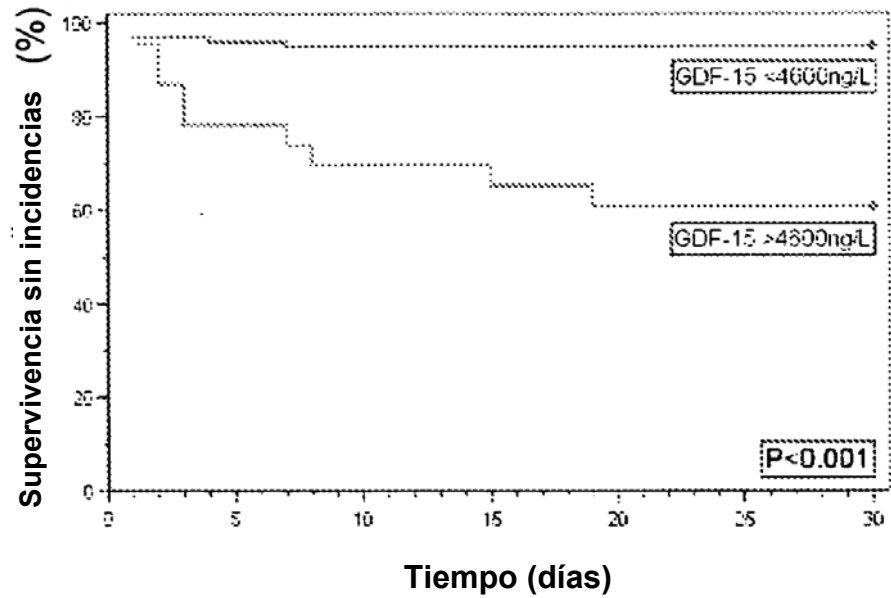


Figura 7

A.



B.

