

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 104**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07108852 .0**
96 Fecha de presentación: **24.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1995596**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54 Título: **Métodos para evaluar el fallo cardíaco en pacientes con fibrilación auricular utilizando péptidos GDF-15**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2012

73 Titular/es:
**F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel , CH**

72 Inventor/es:
**Hess, Georg;
Horsch, Andrea;
Hüdig, Hendrik y
Zdunek, Dietmar**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 379 104 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 evaluar el fallo cardíaco en pacientes con fibrilación auricular utilizando péptidos GDF-15

- 5 La presente invención está relacionada con métodos para el diagnóstico médico. Específicamente, está relacionada con un método de diagnóstico de fallo cardíaco en un sujeto que presenta fibrilación auricular, dicho método comprende determinar la cantidad de GDF- 15 en una muestra de dicho sujeto y comparar dicha cantidad de GDF-15 con una cantidad adecuada de referencia mientras el fallo cardíaco se diagnostica.
- 10 Una de las metas de la medicina moderna es proporcionar regímenes de tratamiento personalizado o individualizado. Estos son regímenes de tratamiento que tiene en cuenta las necesidades individuales de un paciente o riesgos. Los regímenes de tratamiento personalizado o individual deberán tenerse en cuenta para medidas de emergencia cuando sea necesario decidir sobre los regímenes de tratamiento potenciales en un periodo de tiempo corto. Las enfermedades cardíacas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el hemisferio occidental. Dichas enfermedades pueden permanecer asintomáticas durante largos periodos de tiempo. No obstante, pueden tener consecuencias graves una vez ocurre como causa de la enfermedad cardiovascular, un acontecimiento cardiovascular agudo, como un infarto de miocardio.
- 15 El fallo cardíaco es una condición que puede resultar a partir de cualquier trastorno cardíaco estructural o funcional que impide la capacidad del corazón de llenar o bombear una cantidad suficiente de sangre a través del cuerpo. Aún con la mejor terapia, el fallo cardíaco está asociado con una mortalidad anual de alrededor del 10%.
- 20 El fallo cardíaco a menudo permanece sin diagnosticar, particularmente cuando la condición se considera "leve." Las técnicas convencionales de diagnóstico para el fallo cardíaco están basadas en el bien conocido marcador de estrés de volumen vascular NT-proBNP. No obstante, el diagnóstico del fallo cardíaco bajo algunas circunstancias médicas que incluye la fibrilación auricular basada en NT-proBNP parece ser incorrecta para un número significativo de pacientes pero no de todos (por ejemplo, Beck 2004, Canadian Journal of Cardiology 20: 1245-1248; Tsuchida 2004, Journal of Cardiology, 44:1-11). No obstante, en especial los pacientes que padecen de fallo cardíaco y que presentan fibrilación auricular necesitarán de forma urgente –al margen de las intervenciones médicas para la fibrilación auricular- una terapia de apoyo para el fallo cardíaco. Por otro lado, como consecuencia de un diagnóstico incorrecto del fallo cardíaco, muchos pacientes recibirán un régimen de tratamiento que no es suficiente o que incluso puede tener efectos adversos secundarios.
- 25 Por lo tanto, existe una necesidad para las medidas de diagnóstico que permiten un diagnóstico seguro y rápido del fallo cardíaco en pacientes que presentan fibrilación auricular para permitir un régimen de tratamiento médico eficiente.
- 30 El problema técnico subyacente a la presente invención puede verse como la provisión de medios y métodos para cumplir con las necesidades anteriormente mencionadas. El problema técnico se soluciona mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y de ahora en adelante.
- 35 En consecuencia, la presente invención está relacionada con un método de diagnóstico de fallo cardíaco de acuerdo con la reivindicación 1 en un sujeto que presenta fibrilación auricular, dicho método comprende
- 40 a) determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra de dicho sujeto; y
b) comparar la cantidad de GDF-15 determinada en el paso a) con una cantidad de referencia adecuada por el que el fallo cardíaco va a diagnosticarse.
- 45 El método de la presente invención, preferiblemente, es un método in vitro. Además, puede comprender pasos adicionales a los que explícitamente se han mencionado anteriormente. Por ejemplo, pasos adicionales pueden estar relacionados con pretratamientos de muestras o evaluación de los resultados obtenidos por el método. El método de la presente invención puede también utilizarse para monitorización, confirmación, y subclasificación de un sujeto. El método puede llevarse a cabo manualmente o de forma asistida automática. Preferiblemente, el paso (a) y/o (b) pueden estar en parte o totalmente estar asistidos de forma automática, por ejemplo, mediante un equipo robótico adecuado y de sensores para la determinación del paso (a) o una comparación realizada por ordenador en el paso (b).
- 50 El término "diagnosticar" tal como se usa aquí significa valorar si un sujeto que presenta fibrilación auricular padece de fallo cardíaco, o no. Tal como entenderá un experto en la materia, una evaluación no pretende normalmente ser correcta para todos los sujetos (es decir, 100%) a identificar. El término, no obstante, requiere que una porción de sujetos estadísticamente significativa pueda ser identificada (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). Puede determinarse si una porción es estadísticamente significativa sin más trámite que el experto en la materia utilizando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de los intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba de t de Student, prueba de Mann-Whitney etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983. Los intervalos de confianza preferibles están en al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos
- 55 60 65

un 99 %. Los valores p, son preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, o 0,0001. Más preferiblemente, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de los sujetos de una población pueden identificarse de forma adecuada mediante el método de la presente invención.

5 Diagnosticar de acuerdo con la presente invención incluye monitorización, confirmación, subclasificación y predicción de la enfermedad relevante, síntomas o riesgos de los mismos. Monitorizar se refiere a seguir el rastro de una enfermedad ya diagnosticada. Confirmación se refiere a fundamentar o fortalecer un diagnóstico ya realizado utilizando otros indicadores o marcadores. Subclasificación se refiere a definir además un diagnóstico de acuerdo con una subclase diferente de la enfermedad diagnosticada, por ejemplo, definir de acuerdo con formas leves y moderadas de la enfermedad.

10 El término "sujeto" tal como se usa aquí está relacionado con animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. Preferiblemente, el sujeto al que se refiere de acuerdo con el método anteriormente mencionado padece de un fallo cardíaco o presenta los síntomas o parámetros clínicos, como un aumento del nivel de NT-proBNP que lo acompaña, es decir, que es al menos sospechoso de padecer de un fallo cardíaco. Además, el sujeto al que se refiere de acuerdo con la presente invención también presentará fibrilación auricular.

15 "Fibrilación auricular" tal como se usa aquí se refiere a un ritmo cardíaco anormal que involucra las dos cámaras superiores del corazón. En un ritmo cardíaco normal, el impulso generado por el nodo sino-atrial se propaga a través del corazón y provoca la contracción del músculo cardíaco y bombea sangre. En la FA, los impulsos eléctricos regulares del nodo sino-atrial están sustituidos por impulsos eléctricos rápidos y desorganizados, que resultan en latidos irregulares del corazón. La fibrilación auricular puede diagnosticarse, preferiblemente, mediante un electrocardiograma. Las características que se encuentran son, preferiblemente, la ausencia de ondas P, actividad eléctrica desorganizada en su lugar, e irregularidad del intervalo R-R debido a la conducción irregular de impulsos hacia los ventrículos. Independientemente del fallo cardíaco, los sujetos que presentan fibrilación auricular poseen cantidades aumentadas del biomarcador de referencia para el fallo cardíaco NT-proBNP en sangre. En consecuencia, dicho sujetos no pueden diagnosticarse de forma fiable para el fallo cardíaco basado en tan solo su NT-proBNP.

20 No obstante, en una realización preferible del método de la presente invención, el método comprende además (es decir, además de la determinación de GDF-15) los pasos de determinar la cantidad de un péptido natriurético en dicha muestra del sujeto y comparar la cantidad del péptido natriurético con una referencia. Dichos pasos adicionales pueden llevarse a cabo de forma simultánea o antes o posteriormente a la determinación de GDF-15 de acuerdo con el método de la presente invención. Más preferiblemente, el péptido natriurético está determinado inicialmente y el fallo cardíaco se confirmará como se ha descrito aquí mediante una posterior determinación de GDF-15.

25 El término "péptido natriurético" comprende los péptidos de tipo péptido natriurético atrial (ANP) y péptido natriurético cerebral (BNP) y variantes de los mismos que poseen el mismo potencial predictivo. Los péptidos natriuréticos de acuerdo con la presente invención comprenden los péptidos de tipo ANP y BNP y variants de los mismos (véase por ejemplo, Bonow, 1996, Circulation 93: 1946-1950). Los péptidos de tipo ANP comprenden pre-proANP, proANP, NT-proANP, y ANP. Los péptidos de tipo BNP comprenden pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP, y BNP. El pre-pro péptido (134 aminoácidos en el caso de pre-proBNP) comprende un péptido señal corto, que está enzimáticamente escindido para liberar el pro péptido (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El pro péptido se escinde además en un pro péptido N-terminal (pro péptido NT, 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de BNP, 28 aminoácidos en el caso de ANP). Los péptidos natriuréticos preferibles de acuerdo con la presente invención son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP, y variantes de las mismas. ANP y BNP son las hormonas activas y poseen una vida media más corta que sus correspondientes homólogos inactivos, NTproANP y NT-proBNP. BNP se metaboliza en la sangre, mientras que NT-proBNP circula en la sangre como una molécula intacta y como tal se elimina por vía renal. La vida media in-vivo de NTproBNP es 120 min más larga que la de BNP, que es de 20 min (Smith 2000, J Endocrinol. 167: 239-46.). Los preanálisis son más robustos con NT-proBNP permitiendo un transporte fácil de la muestra a un laboratorio central (Mueller 2004, Clin Chem Lab Med 42: 942-4.). Las muestras de sangre pueden almacenarse a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o embarcarse sin pérdida de recuperación. En contraste, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°Celsius conduce a una pérdida de concentración de al menos un 20 % (Mueller loc.cit.; Wu 2004, Clin Chem 50: 867-73.). Por lo tanto, dependiendo de la duración o propiedades de interés, ya sea la medición de las formas activas o inactivas del péptido natriurético, puede ser ventajoso. Los péptidos natriuréticos más preferibles de acuerdo con la presente invención son NT-proBNP o variantes de las mismas. Tal como se ha discutido brevemente anteriormente, la NT-proBNP humana, tal como se refiere de acuerdo con la presente invención, es un polipéptido que comprende, preferiblemente, 76 aminoácidos de longitud que corresponde con la porción N-terminal de la molécula NT-proBNP humana. La estructura de la BNP humana y NTproBNP se ha descrito ya en detalle en el estado de la técnica previo, por ejemplo, WO 02/089657, WO 02/083913 o Bonow loc. cit. Preferiblemente, NT-proBNP humana tal como se usa aquí es NT-proBNP humana tal como se describe en PE 0 648 228 B1. Estos documentos del estado de la técnica previo se incorporan aquí por referencia con respecto a las secuencias específicas de NT-proBNP y las variantes de las mismas allí. El NT-proBNP referido de acuerdo con la presente invención abarca además las variantes alélicas y otras variantes de dicha secuencia específica para NT-

proBNP humano discutido anteriormente. De forma específica, están previstas variantes de polipéptidos que están a nivel de aminoácido al menos un 60 % idénticos, más preferiblemente 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 % idéntico, al NT-proBNP humano. Sustancialmente similar y también previstos son los productos de degradación proteolíticos que también están reconocidos mediante los métodos de diagnóstico o mediante ligandos dirigidos contra los correspondientes péptidos de longitud completa. También están comprendidos las variantes de polipéptidos con deleciones de aminoácidos, sustituciones, y/o adiciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de NT-proBNP humano ya que dichos polipéptidos poseen propiedades de NT-proBNP. Las propiedades de NT-proBNP referidas aquí son propiedades inmunológicas y/o biológicas. Preferiblemente, las variantes NT-proBNP poseen propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítopos) comparable con aquellas de NT-proBNP. Así, las variantes serán reconocibles mediante los métodos anteriormente mencionados o ligandos utilizados para la determinación de la cantidad de péptido natriurético. Las propiedades biológicas y/o inmunológicas de NT-proBNP pueden detectarse mediante el ensayo descrito en Karl et al. (Karl 1999, Scand J Clin Invest 230:177-181), Yeo et al. (Yeo 2003, Clinica Chimica Acta 338:107-115). Las variantes también incluyen los péptidos modificados postraducionalmente como los péptidos glicosilados. Además, una variante de acuerdo con la presente invención es también un péptido o polipéptido que ha sido modificado tras la recogida de la muestra, por ejemplo mediante unión covalente o no covalente de un marcaje, en particular un marcaje radioactivo o fluorescente, al péptido. Tal como ya se ha discutido anteriormente, una cantidad de referencia preferible que sirve como umbral puede derivarse de un LSN. El LSN para una población determinada de sujetos puede determinarse como se ha especificado en cualquier lugar de esta descripción. Un umbral preferible (es decir, una cantidad de referencia) para un péptido natriurético y, en particular para NT-proBNP, es al menos una vez, más preferiblemente de dos a cuatro veces el LSN. Preferiblemente, el LSN para NT-proBNP referida en este contexto es de 125 pg/ml. Las LSN para el resto de péptidos natriuréticos son conocidos en la materia y son, preferiblemente, 40 pg/ml para ANP, 100 pg/ml para BNP y 500 pmol/l para NT-proANP. Una cantidad de un péptido natriurético más grande que la cantidad de referencia es, más preferiblemente, indicador adicional para un sujeto que padece un fallo cardíaco.

El término "fallo cardíaco" tal como se usa aquí está relacionado con una función sistólica y/o diastólica deteriorada del corazón. Preferiblemente, el fallo cardíaco al que se hace referencia aquí también es un fallo cardíaco crónico. El fallo cardíaco puede clasificarse en un sistema de clasificación funcional de acuerdo con la asociación cardíaca de New York (NYHA). Los pacientes clasificados como NYHA de clase I ni presentan síntomas evidentes de enfermedad cardiovascular pero ya presentan evidencias objetivas de un deterioro funcional. La actividad física no está limitada, y la actividad física habitual no provoca fatiga excesiva, palpitaciones, o disnea (falta de aliento). Los pacientes clasificados como NYHA de clase II presentan una ligera limitación de la actividad física. Están cómodos mientras descansan, pero la actividad física habitual les provoca fatiga, palpitaciones, o disnea. Los pacientes clasificados como NYHA de clase III muestran una marcada limitación de actividad física. Están cómodos mientras descansan, pero la actividad física habitual les provoca fatiga, palpitaciones, o disnea. Los pacientes clasificados como NYHA de clase IV son incapaces de llevar a cabo cualquier actividad física con comodidad. Muestran síntomas de insuficiencia cardíaca mientras descansan. El fallo cardíaco, es decir, una función sistólica y/o diastólica deteriorada del corazón, puede determinarse también mediante, por ejemplo, ecocardiografía, angiografía, gammagrafía, o resonancia magnética. Este deterioro funcional puede venir acompañado por síntomas de fallo cardíaco tal como se ha resaltado anteriormente (NYHA de clase II-IV), aunque algunos pacientes pueden presentar sin síntomas significativos (NYHA I). Además, el fallo cardíaco también es evidente para una fracción de eyección ventricular izquierda reducida (LVEF). Más preferiblemente, el fallo cardíaco tal como se usa aquí viene acompañado por una fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) inferior al 60%, de 40% a 60% o inferior al 40%.

El término "Factor de diferenciación 15" o "GDF-15" está relacionado con un polipéptido que es un miembro de la superfamilia de citoquinas del factor de crecimiento transformante (TGF)- β . Los términos polipéptido, péptido y proteína se utilizan de forma intercambiable a lo largo de esta especificación. GDF-15 se clonó originariamente como citoquina inhibidora de macrófagos-1 y después también se identificó como factor de crecimiento transformante placentar - β , proteína placentar morfogenética de hueso, gen activado por fármacos antiinflamatorios no esteroideos-1, y factor derivado de la 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). Similar a otras citoquinas relacionadas con TGF- β , el GDF-15 se sintetiza como una proteína precursora inactiva, que experimenta una homodimerización unida a disulfuro. Tras la escisión proteolítica del propéptido N-terminal, el GDF-15 se secreta como una proteína dimérica de ~28 kDa (Bauskin 2000, Embo J 19:2212-2220). Las secuencias de aminoácido para GDF-15 se describen en WO99/06445, WO00/70051, WO2005/113585 Bottner 1999, Gene 237: 105-111, Bootcov loc. cit., Tan loc. cit., Baek 2001, Mol Pharmacol 59: 901-908, Hromas loc cit, Paralkar loc cit, Morrish 1996, Placenta 17:431-441 o Yokoyama-Kobayashi loc cit. GDF-15 tal como se usa aquí abarca también variantes de los polipéptidos GDF-15 específicos anteriormente mencionados. Dichas variantes poseen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales como los polipéptidos GDF-15 específicos. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos ensayos específicos referenciados en esta especificación, por ejemplo, mediante ensayos ELISA utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen de forma específica dichos polipéptidos GDF-15. Un ensayo preferible se describe en los ejemplos acompañantes. Además, debe entenderse que una variante como la referida de acuerdo con la presente invención tendrá una secuencia de

aminoácidos que difiere debido al menos a una sustitución, delección y/o adición de aminoácidos en la que la secuencia de aminoácidos de la variante es aún, preferiblemente, al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, o 99% idéntica con 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 en la materia. Preferiblemente, el grado de identidad debe determinarse mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en el que el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (por ejemplo, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para un alineamiento óptimo. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las que los residuos de aminoácido idénticos aparecen en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede conducirse por el algoritmo local de homología de Smith y Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda por similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988), mediante mejoras computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA, y TFASTA en el paquete de programas Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para comparar, se emplean preferiblemente GAP y BESTFIT para determinar su alineamiento óptimo y, así, el grado de identidad. Preferiblemente, se utilizan por defecto los valores de 5,00 para el valor del hueco y 0,30 para el valor de la longitud del hueco. Las variantes referidas anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otra especie de homólogos específicos, parálogos, u ortólogos. Además, las variantes referidas aquí incluye fragmentos de los polipéptidos GDF-15 específicos o los tipos de variantes anteriormente mencionadas en tanto que estos fragmentos poseen las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales tal como se ha referido anteriormente. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de los polipéptidos GDF-15. Otras variantes incluidas son las que difieren debido a modificaciones postraduccionales como la fosforilación o miristilación.

El término "muestra" se refiere a una muestra de un fluido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido u órgano. Las muestras de fluido corporal pueden obtenerse mediante técnicas bien conocidas e incluye, preferiblemente, muestras de sangre, plasma, suero, u orina, más preferiblemente, muestras de sangre, plasma o suero. Las muestras de tejido u órganos pueden obtenerse a partir de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, una biopsia. Las células separadas pueden obtenerse a partir de fluidos corporales o tejidos u órganos mediante técnicas de separación como centrifugación o clasificación de células. Preferiblemente, las muestras de células, tejido u órgano se obtienen a partir de estas células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos referidos aquí.

Determinar la cantidad de péptidos o polipéptidos referidos en esta especificación está relacionado con la medición de cantidad o concentración, preferiblemente de forma semicuantitativa o cuantitativa. La medición puede realizarse directa o indirectamente. La medición directa está relacionada con la medición de la cantidad o concentración del péptido o polipéptido basado en una señal que se obtiene del péptido o polipéptido en sí y la intensidad del cual se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presente en la muestra. Dicha señal- a veces referida aquí como intensidad de señal – puede obtenerse, por ejemplo, mediante la medición de un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta incluye la medición de una señal obtenida a partir de un componente secundario (es decir, un componente que no es el péptido o polipéptido en sí) o un sistema de lecturas biológicas, por ejemplo, respuestas celulares medibles, ligandos, marcajes, o productos de reacción enzimática.

De acuerdo con la presente invención, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido puede lograrse mediante todos los métodos conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos de inmunoensayo y métodos que pueden utilizar moléculas marcadas en varios formatos de ensayo como ensayo en sándwich, de competición, u otros formatos de ensayo. Dichos ensayos desarrollan una señal que es indicativa de la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la fuerza de la señal puede, preferiblemente, correlacionarse directamente o indirectamente (por ejemplo, reverso- proporcional) a la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Otros métodos adecuados comprenden medir una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido como su masa molecular exacta o espectro de RMN. Dichos métodos comprenden, preferiblemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos de análisis como espectrómetros de masa, analizadores de RMN, o dispositivos de cromatografía. Además, los métodos incluyen métodos basados en microplacas de ELISA, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (disponibles por ejemplo en los analizadores Elecsys™), CBA (un ensayo enzimático de unión a cobalto, disponible por ejemplo en analizadores de Roche-Hitachi™), y ensayos de aglutinación de látex (disponible por ejemplo en analizadores de Roche-Hitachi™).

Preferiblemente, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula capaz de provocar una respuesta celular cuya intensidad es indicativa de la cantidad de péptido o polipéptido con dicho péptido o polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular. Para medir las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade, preferiblemente, a un cultivo celular

y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la medición de la expresión de un gen marcador o la secreción de una sustancia, por ejemplo, un péptido, polipéptido, o una molécula pequeña. La expresión o sustancia generará una intensidad de señal que se correlaciona con la cantidad de péptido o polipéptido.

5 También preferiblemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende el paso de medir una intensidad de señal específica obtenible a partir de un péptido o polipéptido en la muestra. tal como se ha descrito anteriormente, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada en una m/z variable específica para el péptido o polipéptido observado en el espectro de masas o un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

10 Determinar la cantidad de un péptido o polipéptido, preferiblemente, puede comprender los pasos de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una intensidad de señal. La unión de acuerdo a la presente invención incluye tanto uniones covalentes como no covalentes. Un ligando de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier compuesto, por ejemplo, un péptido, polipéptido, ácido nucleico, o molécula pequeña, que se une al péptido o polipéptido aquí descrito. Los ligandos preferibles incluyen anticuerpos, ácido nucleicos, péptidos o polipéptidos como los receptores o parejas de unión del péptido o polipéptido y fragmentos del mismo que comprenden los dominios de unión a los péptidos, y los aptámeros, por ejemplo, aptámeros de ácido nucleico o peptídicos. Los métodos para preparar tales ligandos son bien conocidos en la materia. Proveedores comerciales también ofrecen, por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados. El experto en la materia está familiarizado con los métodos para desarrollar derivados de tales ligandos con una afinidad o especificidad elevada. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones al azar en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Con estos derivados pueden realizarse, a continuación, ensayos de unión de acuerdo con los procedimientos de cribado conocidos en la materia, por ejemplo, presentación en fagos. Los anticuerpos, como se denominan aquí, incluyen tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales, así como los fragmentos de los mismos, como los fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unirse al antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos híbridos humanizados en los que se combinan secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donador no humano que muestra una especificidad antigénica deseada con las secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donador normalmente incluyen al menos los residuos de aminoácido de unión al antígeno del donador pero pueden comprender también otros residuos de aminoácido estructuralmente y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donador. Tales híbridos pueden obtenerse mediante diferentes métodos bien conocidos en la materia. Preferiblemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido. Unión específica de acuerdo con la presente invención significa que el ligando o agente no deben unirse sustancialmente ("reaccionar de forma cruzada") con otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra a analizar. Preferiblemente, el péptido o polipéptido unido específicamente debe estar unido con una afinidad al menos 3 veces superior, más preferiblemente al menos 10 veces superior y aún más preferiblemente al menos 50 veces superior que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si ésta sigue siendo distinguible y medible de forma inequívoca, por ejemplo, de acuerdo con su tamaño en un Western Blot, o por su abundancia relativamente elevada en la muestra. La unión del ligando puede medirse mediante cualquier método conocido en la materia. Preferiblemente, dicho método es semicuantitativo o cuantitativo. Los métodos adecuados se describen a continuación.

45 En primer lugar, la unión de un ligando puede medirse directamente, por ejemplo, mediante RMN o resonancia del plasmón en superficie.

50 En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse el producto de una reacción enzimática (por ejemplo, puede medirse la cantidad de una proteasa midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo, en un Western Blot). Alternativamente, el ligando puede mostrar propiedades enzimáticas en sí mismo y el complejo "ligando/ péptido o polipéptido" o el ligando que está unido al péptido o polipéptido, respectivamente, puede ponerse en contacto con un sustrato adecuado que permita la detección mediante la generación de una intensidad de señal. Para la medida de los productos de una reacción enzimática, preferiblemente, la cantidad de sustrato es a saturación. El sustrato también puede marcarse con una marca detectable previamente a la reacción. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca una cantidad de producto detectable, y preferiblemente medible. En lugar de medir la cantidad de producto, puede medirse el tiempo necesario para que aparezca una cantidad de producto dada (por ejemplo, una cantidad detectable).

60 En tercer lugar, el ligando puede acoplarse de forma covalente o no covalente a una marca que permite la detección y medida del ligando. El marcaje puede realizarse mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo involucra el acoplamiento de la marca directamente (de forma covalente o no covalente) al ligando. El marcaje indirecto involucra la unión (de forma covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse de forma específica al primer ligando. Dicho ligando secundario puede estar acoplado con una marca adecuada y/o ser la diana (receptor) de un ligando terciario unido al ligando secundario. La utilización de ligandos secundarios, terciarios o incluso de órdenes superiores a menudo se utiliza para aumentar la

señal. Los ligandos secundarios y de órdenes superiores adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios, y el sistema bien conocido de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también puede estar "marcado" con uno o más marcajes, como se los conoce en la materia. Dichos marcajes también pueden ser la diana de ligandos de orden superior. Los marcajes adecuados incluyen la biotina, digoxigenina, colas de His, Glutación-S-Transferasa, FLAG, GFP, colas myc, hemaglutinina (HA) del virus de la influenza A, proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, el marcaje está preferiblemente en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Las marcas adecuadas son cualquier marcaje detectable mediante un método de detección apropiado. Los marcajes típicos incluyen las partículas de oro, cuentas de látex, éster de acridano, luminol, rutenio, marcajes enzimáticamente activos, marcajes radioactivos, marcajes magnéticos ("por ejemplo, cuentas magnéticas", lo que incluye los marcajes paramagnéticos y superparamagnéticos), y los marcajes fluorescentes. Los marcajes enzimáticamente activos incluyen por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de las mismas. Los sustratos adecuados para la detección incluyen la diaminobencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro-azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato, disponible como una solución lista para su uso en Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences) o ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación adecuada entre enzima y sustrato puede resultar en un producto de reacción coloreado, fluorescente o quimioluminiscente, que puede medirse de acuerdo con los métodos conocidos en la materia (por ejemplo, utilizando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuada). Como para la medida de la reacción enzimática, se aplican de forma análoga los criterios que se han proporcionado anteriormente. Los marcajes fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (como la GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo Texas, fluoresceína, y los colorantes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Otros marcajes fluorescentes están disponibles por ejemplo, de Molecular Probes (Oregon). También se contempla la utilización de puntos cuánticos como marcajes fluorescentes. Los marcajes radioactivos típicos incluyen el ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P y similares. Un marcaje radioactivo puede detectarse mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo, una película sensible a la luz o un analizador PhosphorImager. Los métodos de medida adecuados de acuerdo con la presente invención también incluyen la precipitación (en particular la inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia generada electrónicamente), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo inmunosorbente acoplado a enzima), ensayos inmunes enzimáticos en sándwich, inmunoensayos en sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroinmunoensayo de disociación mejorado con lantánidos (DELFI), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría potenciada con látex o ensayos inmunes en fase sólida. Pueden utilizarse otros métodos conocidos en la materia (como la electroforesis en gel, electroforesis en gel 2D, electroforesis en gel de poli(acrilamida) con SDS (SDS-PAGE), transferencia Western y espectrometría de masas), solos o en combinación con el marcaje u otros métodos de detección como los descritos anteriormente.

La cantidad de un péptido o polipéptido puede determinarse también preferiblemente, como sigue: (a) poner en contacto con un soporte sólido que comprende un ligando del péptido o polipéptido como se ha especificado anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) medir la cantidad de péptido o polipéptido que se une al soporte. El ligando, preferiblemente escogido de entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, preferiblemente está presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para fabricar soportes sólidos son bien conocidos en la materia e incluyen, entre otros, materiales en columnas disponibles a nivel comercial, cuentas de poliestireno, cuentas de látex, cuentas magnéticas, partículas metálicas coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicona, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, Duracyte, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede estar unido a muchos transportadores diferentes. Ejemplos de transportadores bien conocidos incluyen el vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextran, nilón, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas), agarosas y magnetita. La naturaleza del transportador puede ser tanto soluble como insoluble para los propósitos de la invención. Los métodos adecuados para fijar/ inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, pero no se limitan a las interacciones iónicas, hidrofóbicas, covalentes y similares. También se contempla la utilización de "chips en suspensión" como chips de acuerdo con la presente invención (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12). En estos chips en suspensión, el transportador que es, por ejemplo, una microcuenta o microesfera, está presente en suspensión. El chip consiste en diferentes microcuentas o microesferas, posiblemente marcadas, que son portadoras de diferentes ligandos. Los métodos de producción de tales chips, por ejemplo los que se basan en la química en base sólida y los grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (US 5.744.305).

El término "cantidad" tal como se usa aquí incluye la cantidad absoluta de un polipéptido o péptido, la cantidad o concentración relativa de dicho polipéptido o péptido así como cualquier valor o parámetro que se correlacione con ésta o pueda derivarse de ésta. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de señal derivados de todas las características físicas o químicas específicas de dicho péptidos obtenidos mediante mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en un espectro de masas o espectro de RMN. Además, se incluyen todos los valores o parámetros que se obtienen mediante mediciones indirectas, que se especifican en otro lugar en esta descripción, por ejemplo, niveles de respuesta determinados a partir de sistemas de lectura biológicos en respuesta a los péptidos o intensidades de señal obtenidas de ligandos unidos de forma específica. Debe entenderse que los valores que correlacionan con las cantidades o parámetros anteriormente mencionados también pueden obtenerse mediante todas las operaciones matemáticas estándar.

El término "comparar", tal como se usa aquí, incluye la comparación de la cantidad de péptido o polipéptido comprendido en la muestra a analizar con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada en otro punto de esta descripción. Debe entenderse que comparar, tal como se usa aquí, se refiere a una comparación de los parámetros o valores correspondientes, por ejemplo, una cantidad absoluta se compara con una cantidad absoluta de referencia, mientras una concentración se compara con una concentración de referencia, o una intensidad de señal obtenida a partir de una muestra de ensayo se compara con el mismo tipo de intensidad de señal de una muestra de referencia. La comparación a la que se refiere el paso (b) del método de la presente invención puede realizarse de forma manual o asistida por computador. Para una comparación asistida por computador, el valor de la cantidad determinada puede compararse con los valores correspondientes a las referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos de un programa informático. El programa informático puede además evaluar el resultado de la comparación, es decir, puede proporcionar de forma automática la evaluación deseada en un formato de salida de datos adecuado. En base a la comparación de la cantidad determinada en el paso a) y la cantidad de referencia, es posible evaluar si un sujeto, efectivamente, sufre de fallo cardíaco. Por lo tanto, la cantidad de referencia debe escogerse de forma que una diferencia o una similitud en las cantidades comparadas permita la identificación de aquellos sujetos que pertenecen al grupo de sujetos que sufren de fallo cardíaco.

De acuerdo con esto, el término "cantidades de referencia", tal como se usa aquí, se refiere a las cantidades de polipéptidos que permiten la identificación de un sujeto que sufre de fallo cardíaco de entre los que muestran fibrilación auricular. De acuerdo con esto, la referencia puede derivarse a partir de (i) un sujeto que muestra fibrilación auricular del que se conoce que sufre de fallo cardíaco o (ii) un sujeto que muestra fibrilación auricular del que se conoce que no sufre de fallo cardíaco. Además, las cantidades de referencia, preferiblemente, definen umbrales. Las cantidades de referencia adecuadas o cantidades umbral pueden determinarse mediante el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que se analiza de forma conjunta, es decir simultáneamente o a continuación, de la muestra de ensayo. Una cantidad de referencia preferible que sirve como umbral debe derivarse del límite superior de normalidad (LSN), es decir, el límite superior de la cantidad que se encuentra fisiológicamente en una población de sujetos (por ejemplo, pacientes que participan en un ensayo clínico). El LSN para una población dada de sujetos puede determinarse mediante varias técnicas bien conocidas. Una técnica adecuada puede ser la determinación de la mediana en la población de la cantidad de péptido o polipéptido a determinar en el método de la presente invención. El LSN de GDF-15 se encuentra en el rango de 500 a 650 pg/ml, más preferiblemente, dentro del rango de 550 a 650 pg/ml y, aún más preferiblemente, 570 pg/ml.

En principio, se ha encontrado que las cantidades aumentadas de GDF-15 en una muestra de un sujeto que presenta fibrilación auricular son indicativas de fallo cardíaco. La determinación de GDF-15 como biomarcador para fallo cardíaco reforzará, de esta manera, el diagnóstico de fallo cardíaco basado en NT-proBNP u otro péptido natriurético, en particular, bajo circunstancias en las que un diagnóstico basado en estos últimos péptidos se ha convertido en un resultado de falsos positivos o negativos. Basándose en estos hechos y el método de la presente invención, el fallo cardíaco oculto (es decir, el fallo cardíaco que permanece irreconocible debido a que los actuales estándares de diagnóstico aplicados son lo han pasado por alto, como en el caso de la fibrilación auricular) pueden tratarse de forma más eficiente. El método de la presente invención, de forma ventajosa, permite un diagnóstico intensivo más fiable, rápido y barato y puede ponerse en práctica incluso en ensayos portátiles, como en tiras reactivas. Por lo tanto, el método es particularmente adecuado para el diagnóstico de pacientes en urgencias. Gracias a los hallazgos de la presente invención, una terapia adecuada para un sujeto puede seleccionarse de forma fiable, por ejemplo, una terapia para el fallo cardíaco. Los efectos adversos graves provocados por el tratamiento erróneo de pacientes puede evitarse.

La presente solicitud, además, está relacionada con un dispositivo para el diagnóstico del fallo cardíaco en un sujeto que presenta fibrilación auricular y que comprende

a) medios para determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra de un sujeto que presenta fibrilación auricular; y
b) medios para comparar la cantidad determinada por medio de a) con una cantidad de referencia adecuada que permite el diagnóstico del fallo cardíaco.

El término "dispositivo" tal como se usa aquí está relacionado con un sistema de medios que comprende al menos los medios anteriormente mencionados unidos de forma operativa entre ellos para permitir el diagnóstico. Los medios preferibles para determinar la cantidad de GDF-15, preferiblemente, en combinación con un péptido natriurético, y medios para llevar a cabo la comparación se han descrito anteriormente en conexión con el método de la invención. La forma en que se unen los medios de forma operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplican los medios para determinar de forma automática de los péptidos, los datos obtenidos por dichos medios que operan de forma automática pueden procesarse mediante, por ejemplo, un programa de ordenador para poder obtener los resultados. Preferiblemente, los medios están comprendidos por un dispositivo único en dicho caso. Dicho dispositivo puede por lo tanto incluir una unidad de análisis para la medición de la cantidad de péptidos o polipéptidos en una muestra dada y una unidad computacional para procesar los datos resultantes para la evaluación. De forma alternativa, cuando se usan medios como tiras reactivas para determinar la cantidad de péptidos o polipéptidos, los medios para la comparación pueden comprender tiras de control o tablas asignando la cantidad determinada a una cantidad de referencia. Las tiras reactivas están, preferiblemente,

acopladas a un ligando que se une de forma específica a los péptidos o polipéptidos referidos aquí. La tira o dispositivo, preferiblemente, comprende los medios para la detección de la unión de dicho péptidos o polipéptidos a dicho ligando. Los medios preferibles para la detección se describen junto a las realizaciones relacionadas con el método de la invención anterior. En dicho caso, los medios están unidos de forma operativa para que el usuario del sistema obtenga a la vez el resultado de la determinación de la cantidad y el diagnóstico o valor pronóstico del mismo debido a las instrucciones e interpretaciones dadas en un manual. Los medios pueden aparecer como dispositivos separados en forma de una realización y están, preferiblemente, empaquetados juntos en un equipo. El experto en la materia sabrá como unir los medios sin más preámbulos. Los dispositivos preferibles son aquellos que pueden aplicarse sin el conocimiento particular de un médico especializado, por ejemplo, tiras reactivas o dispositivos electrónicos que tan solo necesitan cargarse con una muestra. Los resultados pueden proporcionarse como datos crudos que necesitan interpretación por el médico. Preferiblemente, la salida del dispositivo son datos crudos, procesados, es decir, evaluados, cuya interpretación no necesita de un médico. Otros dispositivos preferibles comprenden las unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo, biosensores, chips, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen de forma específica el péptido natriurético, Dispositivos de resonancia de plasmón en superficie, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masa, etc.) o unidades/dispositivos de evaluación referidas anteriormente de acuerdo con el método de la invención.

Finalmente, la presente solicitud está relacionada con un equipo adaptado para llevar a cabo el método de la presente invención en el que dicho equipo comprende instrucciones para llevar a cabo dicho método y

a) medios para determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra de un sujeto que presenta fibrilación auricular; y
b) medios para comparar la cantidad determinada por medio de a) con una cantidad de referencia adecuada que permite el diagnóstico del fallo cardiaco.

El término "equipo" tal como se usa aquí se refiere a una colección de los medios mencionados anteriormente, preferiblemente, proporcionados de forma separada o dentro de un contenedor único. El contenedor, también preferiblemente, comprende instrucciones para llevar a cabo el método de la presente invención. De acuerdo con esto, un equipo adaptado para llevar a cabo el método de la presente invención comprende todos los componentes necesarios para practicar dicho método en un formato listo para usar, por ejemplo, en una forma premezclada con concentraciones ajustadas de los componentes utilizados para la determinación y/o comparación.

Los siguientes Ejemplos ilustrarán únicamente la invención. No deberán entenderse, en ningún momento, como limitantes al alcance de la invención.

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

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

Los niveles de NT-proBNP se determinaron con un inmunoensayo en un Elecsys 2010 con un límite de detección de 20 pg/ml.

Ejemplo2: Los niveles de NT-proBNP pero no los niveles de GDF-15 están influenciados por la fibrilación auricular

Un total de 273 pacientes con ritmo sinusal cuando se examinaron mediante electrocardiografía se analizaron los cambios en los niveles de GDF-15 y NTproBNP. El mismo análisis se realizó para un total de 17 pacientes que presentan fibrilación auricular. Además, se determinó la fracción de eyección ventricular izquierda.

Los niveles de plasma de GDF-15 y NT-proBNP se determinaron como se describe en el Ejemplo anterior.

Los resultados del estudio se muestran en la siguiente tabla:

(

LVEF [%]	GDF-15 [pg/ml]		NT-proBNP [pg/ml]	
	Ritmo sinusal (n=273)	Fibrilación auricular (n=17)	Ritmo sinusal (n=273)	Fibrilación auricular (n=17)
>60%				
Mediana	609,53	620,84	127,85	1061,0
40-60%	(n=31)	(n=7)	(n=31)	(n=7)
Mediana	642,61	1054,64	384,0	1018,00

5 Como es evidente en la tabla, el GDF-15 está significativamente aumentado en pacientes con un LVEF por debajo de 60% (es decir, entre 40 y 60%) en comparación con aquellos que tienen un LVEF casi fisiológico de 60% o más. No obstante el NT-proBNP no es capaz de discriminar entre estos pacientes. Debe notarse que los pacientes con una LVEF entre 40 y 60% es más probable que se diagnostiquen como falsos positivos basándose en NT-proBNP debido a que no son evidentes otros síntomas y signos clínicos de fallo cardíaco o lo son de forma suave.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar el fallo cardíaco acompañado por una fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) inferior al 60% en un sujeto que muestra fibrilación auricular, y dicho método que comprende
- (a) determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra de dicho sujeto; y
- 10 (b) comparar la cantidad de GDF-15 determinada en el paso a) con una cantidad de referencia de GDF-15 mediante lo cual se va a diagnosticar el fallo cardíaco acompañado de una fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) inferior al 60%.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha cantidad de referencia es la cantidad de GDF-15 determinada en una muestra de un sujeto del que se conoce que sufre de fallo cardíaco.
3. El método de la reivindicación 2, en el que una cantidad de GDF-15 determinada en el paso a) que es idéntica o superior respecto a la cantidad de referencia y que es indicativa de fallo cardíaco.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha cantidad de referencia es la cantidad de GDF-15 determinada en una muestra de un sujeto que muestra fibrilación auricular y que no sufre de fallo cardíaco.
5. El método de la reivindicación 1, en el que una cantidad de referencia de GDF-15 es el límite superior de la normalidad (LSN).
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho LSN de GDF-15 está entre 500 y 650 pg/ml.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 4 a 6, en el que si se determina una cantidad de GDF-15 en el paso a) superior a la cantidad de referencia es indicativa de fallo cardíaco.
- 30 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, en el que dicho sujeto es un humano.
9. La utilización *in vitro* de un anticuerpo que se une a GDF-15 para el diagnóstico del fallo cardíaco acompañado de una fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) inferior al 60% en un sujeto que muestra fibrilación auricular.