

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 498**

51 Int. Cl.:
G01N 33/94 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07788437 .7**
96 Fecha de presentación: **15.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2052256**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.04.2009**

54 Título: **Utilización de péptidos tipo BNP para la estratificación del tratamiento con agentes estimuladores de la eritropoyesis**

30 Prioridad:
17.08.2006 US 465191

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.05.2012

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**AMANN ZALAN, Ildiko;
MOECKS, Joachim;
BURGER, Hans Ulrich;
ESCRIG, Cesar;
SCHERHAG, Armin;
DOUGHERTY, Frank y
HERRMANN, Zuzana**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 380 498 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

Utilización de péptidos tipo BNP para la estratificación del tratamiento con agentes estimuladores de la eritropoyesis

- 5 La presente invención se refiere al diagnóstico del riesgo de presentar una complicación vascular como consecuencia del tratamiento con agentes estimuladores de la eritropoyesis. La presente invención se refiere también a la optimización de la posología de los agentes estimuladores de la eritropoyesis (ESA) respecto al riesgo de presentar una complicación cardiovascular.
- 10 Un objetivo de la medicina moderna es proporcionar regímenes terapéuticos personalizados o individualizados. Estos son regímenes terapéuticos que toman en consideración las necesidades o riesgos del paciente individual, por ejemplo seleccionando una medicación concreta o una posología concreta de una medicación a medida de las necesidades del paciente individual.
- 15 Los agentes estimuladores de la eritropoyesis (ESA) se administran para tratar diferentes patologías, particularmente para tratar la anemia. La anemia es una patología frecuente, en la cual disminuye el número de eritrocitos (las células hemáticas que transportan el oxígeno). Cabe remarcar que la anemia es una co-morbilidad frecuente en el cáncer y las enfermedades renales (como ocurre por ejemplo en los pacientes con diabetes). Los pacientes anémicos experimentan frecuentemente complicaciones cardiovasculares. Estas complicaciones se producen probablemente porque la sangre de los pacientes anémicos solamente puede transportar una cantidad reducida de oxígeno, lo cual a su vez provoca que el corazón bombee la sangre con mayor rapidez para satisfacer la demanda de oxígeno del organismo. Ello puede provocar el crecimiento del ventrículo izquierdo y la hipertrofia del mismo. Por ello, los pacientes anémicos presentan frecuentemente complicaciones cardiovasculares.
- 20
- 25 Se ha evidenciado, que puede utilizarse el tratamiento con eritropoyetina (EPO) para tratar la anemia en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica provocando una mejoría significativa de la función cardíaca y los síntomas (van der Meer, P., Voors, A.A., Lipsic, E. y otros (2004). Erythropoietin in cardiovascular diseases ("La eritropoyetina en las enfermedades cardíacas"). *European Heart Journal*, vol. 25, pp. 285-291). El beneficio del tratamiento con EPO es muy probablemente debido a una aumento del número de eritrocitos, lo cual aumenta la concentración de hemoglobina en la sangre, permitiendo de este modo que la sangre transporte más oxígeno. Por consiguiente, se reduce la tensión sobre el corazón, lo que provoca la regresión de la hipertrofia ventricular izquierda y puede incluso prevenir su desarrollo.
- 30
- 35 Es conocido que un incremento del número de eritrocitos a niveles anómalos, tal como ocurre en el caso del uso indebido de EPO por los atletas, puede provocar complicaciones cardiovasculares (Dhar, R., Stout, C.W., Link, M.S., Homoud, M.K., y otros (2005). Cardiovascular toxicities of performance-enhancing substances in sports ("Toxicidad cardiovascular de las sustancias potenciadoras del rendimiento en el deporte") *Mayo Clinic Proc.*, vol. 80, pp. 1307-1315, erratas en *Mayo Clinic Proc.*, Enero 2006 vol. 81, p. 133). En contraste con este uso indebido de EPO, anteriormente se ha considerado segura la administración de ESA a la dosificación necesaria para corregir la anemia hasta niveles normales o casi normales de hemoglobina. Actualmente se considera que estas dosificaciones o niveles objetivo de hemoglobina son beneficiosas.
- 40
- 45 Sin embargo, aunque la medicación con EPO se ha convertido en un tratamiento de rutina efectivo de la anemia, muchos pacientes anémicos todavía fallecen de complicaciones cardiovasculares. Por otro lado, muchos pacientes con enfermedades cardiovasculares están anémicos.
- 50 Son conocidos los péptidos tipo BNP (por ejemplo el péptido natriurético cerebral (BNP) y/o su fragmento pro-péptido N-terminal (NT-proBNP)) y su utilización como marcadores bioquímicos o moleculares de ciertas complicaciones cardiovasculares. En la patente WO 02/089657, se ha sugerido la determinación del péptido natriurético cerebral (BNP) para el diagnóstico del infarto de miocardio. En la patente WO 02/083913 se ha sugerido la utilización de BNP para predecir la morbilidad o mortalidad a corto plazo de los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, infarto de miocardio con elevación del ST, o síndromes coronarios agudos sin elevación del ST. Sin embargo, dichos usos no abordan el problema de las complicaciones cardiovasculares en pacientes con anemia.
- 55
- 60 Por lo tanto, existe todavía la necesidad de abordar el problema de las complicaciones cardiovasculares en pacientes afectados de anemia y de mejorar el tratamiento de la anemia.
- El objetivo de la presente invención se consigue mediante un método para el diagnóstico del riesgo de un paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento, en particular del tratamiento futuro, con un agente estimulador de la eritropoyesis (ESA), que comprende las etapas de:
- a) determinar el nivel de un péptido tipo BNP o una variante del mismo en una muestra de un paciente,
 - b) diagnosticar dicho riesgo mediante la comparación de los niveles determinados del péptido tipo BNP o variante del mismo con al menos un nivel de referencia.
- 65

El método también puede comprender la etapa de obtener un líquido corporal o una muestra de tejido del paciente. Preferentemente el nivel se determina en un líquido corporal o muestra de tejido del paciente.

5 La presente invención da a conocer métodos y medios, particularmente marcadores, que permiten el diagnóstico del riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento con ESA. De forma más particular, se ha observado en el contexto de la presente invención que el nivel medido de un péptido tipo BNP es capaz de indicar el nivel de riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento con ESA. Por lo tanto, la invención da a conocer métodos y medios para identificar el riesgo de los
10 pacientes antes de recibir un tratamiento con ESA. Particularmente, la invención permite la identificación de los pacientes que presentan un riesgo cardiovascular aumentado si reciben una dosis de ESA suficiente para incrementar el nivel de hemoglobina a valores normales o casi normales. La presente invención puede ser utilizada de forma ventajosa para pacientes que no presentan una historia conocida de complicaciones cardiovasculares. Los métodos y medios son sencillos, rápidos, económicos y adecuados para ser utilizados por médicos generales y/o no cardiólogos. La presente invención también proporciona los usos correspondientes de cualquiera de los marcadores, medios y métodos, según la presente invención.
15

La invención también da a conocer métodos y medios que permiten optimizar la posología (definida por el nivel objetivo de hemoglobina, ver la definición de la posología más abajo) de los ESA respecto al riesgo cardiovascular. La invención da a conocer métodos y medios para determinar un nivel objetivo de hemoglobina (y por lo tanto una posología de ESA) que es farmacéuticamente efectiva y al mismo tiempo evita efectos secundarios no deseados, en particular complicaciones cardiovasculares. Por lo tanto, puede determinarse para cada individuo un nivel objetivo de hemoglobina o una posología de ESA más beneficiosos.
20

En el transcurso de la invención se han realizado diversos hallazgos: se ha observado que el tratamiento con ESA puede asociarse con complicaciones cardiovasculares a posologías o niveles de hemoglobina que previamente se consideraban terapéuticamente beneficiosos. Por lo tanto, existen complicaciones cardiovasculares que se producen como consecuencia del tratamiento con ESA. Esta observación fue inesperada, ya que el tratamiento con ESA en pacientes anémicos se ha considerado anteriormente que reducía las complicaciones cardiovasculares al reducir la tensión sobre el corazón.
25
30

Además, se ha observado en el transcurso de la invención que las complicaciones cardiovasculares como consecuencia del tratamiento con ESA se producen principalmente en una pequeño subgrupo de pacientes. Además, también se ha observado que puede identificarse este subgrupo de pacientes según los niveles de un péptido tipo BNP del paciente. Dichos pacientes puede considerarse como pacientes de riesgo. Por lo tanto, la presente invención no solamente llama la atención sobre los riesgos asociados con dosificaciones concretas de ESA sino que también proporciona directrices sobre qué pacientes presentan un riesgo concreto. Por consiguiente, la presente invención permite el tratamiento con dosis más altas de ESA (o niveles objetivo de hemoglobina más elevados) en pacientes normales a la vez que permite identificar los pacientes de riesgo. Dichos pacientes de riesgo pueden tratarse preferentemente con dosis inferiores de ESA (o niveles objetivo de hemoglobina más bajos) o sin ESA para reducir o evitar el riesgo de presentar una complicación cardiovascular. Sin embargo, dicha decisión queda al criterio del médico responsable que considerará la relación riesgo/beneficio para un paciente concreto en su decisión.
35
40

Dado que la presente invención permite el diagnóstico del riesgo antes del inicio del tratamiento con ESA, o antes de que se aumente la dosificación de ESA, puede optimizarse la posología de la medicación, particularmente aumentarse, para maximizar el beneficio terapéutico en cada paciente a la vez que se evitan las complicaciones cardiovasculares.
45

Por lo tanto, la presente invención permite una decisión cuidadosa e informada sobre si administrar un tratamiento con ESA, sobre la dosificación del mismo, y/o sobre la disposición de controles o tratamientos acompañantes adecuados.
50

La presente invención es particularmente ventajosa para los médicos generales, médicos especializados y clínicas, departamentos o salas de hospitalización especializadas, que frecuentemente carecen de acceso a exámenes cardiológicos extensivos realizados por cardiólogos. Son ejemplos los especialistas en diabetes, oncología y nefrología. Son otros ejemplos los departamentos o clínicas ambulatorias de oncología, nefrología o diabetes. La presente invención da a conocer medios y métodos para dichos no cardiólogos para el cribado sencillo y fiable de pacientes, para aquellos pacientes sometidos al riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento con ESA.
55
60

Los agentes estimulantes de la eritropoyesis se administran habitualmente en casos de patologías tratables aumentando el nivel de eritropoyesis, particularmente en el caso de anemias.

La eritropoyesis es conocida por los expertos en la técnica. En concreto, el término se refiere al desarrollo de eritrocitos (hematíes). Debido a su vida relativamente corta de 120 días, los eritrocitos se renuevan continuamente. Esta renovación o desarrollo se realiza mediante la proliferación y diferenciación de células madre. En la actualidad
65

se conocen diversas etapas de la eritropoyesis. Las etapas principales son la proliferación y diferenciación a partir de las células BFC-E (células formadoras rápidas de eritrocitos, o BCF-Es (o unidades formadoras rápidas, BFU-E)) a través de las células CFC-E (células formadoras de colonias de eritrocitos (o unidades formadoras de colonias, CFU-E)) a eritroblastos con núcleo, que a su vez se diferencian en eritrocitos. La interleuquina 3 (IL-3) promueve la supervivencia y proliferación de las células BFC-E.

Los eritroblastos se diferencian mediante la extrusión del núcleo convirtiéndose en eritrocitos inmaduros (o reticulocitos), los cuales a continuación abandonan la médula ósea y pasan al torrente circulatorio. En los siguientes uno o dos días, el reticulocito perderá su mitocondria y ribosomas convirtiéndose en un eritrocito maduro. Un ESA, según la presente invención, puede ejercer su influencia en cualquier etapa de este proceso, en particular en la etapa de diferenciación desde célula eritroide progenitora a eritroblasto. Esta etapa está controlada por la señalización a través del receptor Epo (EpoR). En concreto, un ESA, según la presente invención, estimula el EpoR, más concretamente uniéndose al EpoR. Un ESA, según la presente invención, también puede estimular la producción endógena de eritropoyetina, por ejemplo inhibiendo el factor inducible por hipoxia-proliferación hidroxilasa (HIF-PH).

El término "anemia" es conocido por los expertos en la técnica. En concreto, la anemia es una patología caracterizada por la ausencia de hematíes. La anemia puede definirse, por ejemplo, por el contenido de hemoglobina en la sangre. El nivel normal de hemoglobina (Hb) de los hombres es entre 14 y 18 g/dl (140 a 180 g/L); los niveles normales en las mujeres son entre 12 y 16 g/dl. Si el nivel de hemoglobina es inferior a estos valores, el paciente tiene anemia. El término anemia, según la presente invención, se refiere en particular a niveles de Hb inferiores a 14 g/dl, de forma más particular a niveles inferiores a 13 g/dl, 11 g/dl, 10 g/dl, 9 g/dl, 8 g/dl, 7,5 g/dl, 6,5 g/dl, 6 g/dl, 5,5 g/dl y de forma más particular a niveles inferiores a 5 g/dl en hombres, y a niveles de Hb inferiores a 12 g/dl, de forma más particular a niveles inferiores a 11 g/dl, 10 g/dl, 9 g/dl, 8 g/dl, 7,5 g/dl, 6,5 g/dl, 6 g/dl, 5,5 g/dl y de forma más particular a niveles inferiores a 5 g/dl en mujeres. Puede considerarse que una anemia moderada corresponde a un nivel de Hb entre 11,0 y 12,5 g/dl. Si el nivel de hemoglobina desciende por debajo de los 75 g/L (7,5 g/dl), el gasto cardíaco en reposo aumenta con un incremento de la frecuencia cardíaca y el volumen de eyección. El paciente puede presentar palpitaciones o pulso saltón. Pueden presentarse síntomas de fallo cardíaco si la reserva miocárdica del paciente está disminuida.

La anemia puede ser debida a causas diferentes, por ejemplo pérdidas excesivas de sangre (por ejemplo la anemia por sangrado agudo o crónico), por una eritropoyesis disminuida o inefectiva, o por hemólisis (anemia hemolítica, por ejemplo la anemia debida a la hiperactividad del sistema monocito-macrofágico, la anemia por hiperesplenismo o esplenomegalia, la anemia hemolítica inmune (incluyendo la anemia hemolítica autoinmune y la hemoglobinuria), la anemia por destrucción mecánica de los eritrocitos (por ejemplo la anemia hemolítica microangiopática, y la hemólisis secundaria a infecciones)).

La presente invención puede aplicarse en el contexto de cualquier tipo de anemia en el cual el tratamiento con ESA sea capaz de disminuir la gravedad de la anemia. En concreto, la presente invención puede aplicarse en el contexto de la anemia secundaria a enfermedades renales (particularmente la enfermedad renal crónica), la anemia secundaria al cáncer y la anemia secundaria a enfermedades crónicas (por ejemplo infecciosas o inflamatorias). La anemia secundaria al cáncer puede ser provocada por sangrados internos y/o por efectos secundarios del tratamiento con agentes citostáticos. La anemia también puede aparecer como efecto secundario del tratamiento contra el cáncer, particularmente como efecto secundario del tratamiento con fármacos citostáticos. La anemia es una complicación bien conocida de la insuficiencia renal, particularmente la nefropatía diabética.

Los agentes estimuladores de la eritropoyesis (ESA) son conocidos por los expertos en la técnica. El término ESA comprende cualquier tipo de agente capaz de estimular la eritropoyesis, particularmente in vivo, más particularmente en un paciente. El significado del término estimulación es conocido, preferentemente el término se refiere al incremento o inducción de la eritropoyesis. En el contexto de la presente invención, el término ESA se refiere a cualquier agente estimulante de la eritropoyesis que sea capaz de incrementar el nivel de hemoglobina como mínimo 0,5 g/dl, de forma más particular 1 g/dl, de forma más particular 1,5 g/dl. Preferentemente, el ESA es capaz de inducir dichos incrementos mediante una posología considerada habitualmente como razonablemente segura respecto a los efectos secundarios no cardiovasculares.

El mecanismo mediante el cual el ESA estimula la eritropoyesis no es particularmente importante en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, un ESA, según la presente invención, puede ser capaz de estimular la diferenciación de una célula madre pluripotente de la médula ósea en un eritroblasto y/o puede ser capaz de estimular la diferenciación de eritroblasto a eritrocito. Sin embargo, preferentemente el ESA actúa estimulando el EpoR o estimulando la vía a través de la cual actúa el EpoR.

Se incluyen como ejemplos de ESA, según la presente invención, "moléculas pequeñas" así como proteínas o péptidos.

Las "pequeñas moléculas" se entienden como moléculas que no son proteínas, péptidos, anticuerpos o ácidos nucleicos, y que presentan un peso molecular inferior a 5.000 Da, preferentemente inferior a 2.000 Da, más

preferentemente inferior a 1.000 Da y de forma más preferente inferior a 500 Da. Dichas moléculas pequeñas pueden identificarse en procedimientos o ensayos de cribado de alto rendimiento partiendo de bibliotecas. Dichos métodos son conocidos en la técnica. También pueden diseñarse o modificarse adicionalmente moléculas pequeñas adecuadas mediante métodos conocidos en la técnica como química combinatoria. Es un ejemplo de molécula pequeña FG-2216, un inhibidor del factor inducible por la hipoxia-prolil hidroxilasa (HIF-PH) (FibroGen Inc., con licencia a Astellas). FG-2216 es capaz de incrementar el nivel endógeno de eritropoyetina y por lo tanto de estimular la eritropoyesis. Otro ejemplo puede ser el análogo de EPO de bajo peso molecular PBI-1402 (ProMetic Biosciences).

Los ejemplos de ESA, según la presente invención, pueden incluir ESA naturales (tales como la eritropoyetina de la sangre o aislada en la orina, ver nº de acceso 133170 en Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) ("Herencia mendeliana humana en línea) en el sitio web del National Institutes of Health ("Instituto nacional de salud") <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> así como ESA producidos de forma recombinante, por ejemplo en cultivos celulares de células humanas o animales, particularmente utilizando técnicas recombinantes. El término "variantes" es comprendido por los expertos en la técnica y ha sido definido en otra parte de este documento.

Existen variantes conocidas de ESA, por ejemplo la eritropoyetina con diferentes formas de glicosilación, por ejemplo debido al modo de producción (por ejemplo el tipo de célula huésped utilizada para la producción recombinante de un ESA de base proteica o peptídico).

Son ESA preferentes, según la presente invención, la eritropoyetina y variantes de la misma. La Eritropoyetina es una glicoproteína de un peso molecular de 30-40 kDa (Lee-Huang, S. (1984) Cloning and expresión of human erythropoietin cDNA in Escherichia Coli. ("Clonación y expresión del ADNc de la eritropoyetina humana en Escherichia Coli. Proc. Nat. Acad. Sci, vol 81, pp. 2708-2712; Romanowsky, R.R., Sytkowski, A.J. (1994). The molecular structure of human erythropoietin ("La estructura molecular de la eritropoyetina humana"). Herat. Oncol. Clin. North Am. Vol 8 pp. 885-894, 1994). Las variantes de la eritropoyetina incluyen diferentes formas de glicosilación de la EPO y/o denominadas biosimilares. Como ejemplos de variantes se incluyen al epoetina alfa (Amgen), la epoetina beta (por ejemplo NeoRecormon™, (Roche)), la epoetina delta, la epoetina omega, la darbepoetina alfa (Amgen) y la Cera ((Continuous Erythropoietin Receptor Activator ("Activador continuo del receptor de la eritropoyetina") Hoffman-LaRoche)).

El nivel de eritropoyesis puede determinarse mediante cualquier método considerado apropiado por los expertos en la técnica. En pacientes, el nivel de eritropoyesis puede determinarse de forma conveniente, por ejemplo realizando un recuento del número de reticulocitos y/o eritrocitos o determinando el nivel total de hemoglobina. También puede determinarse el nivel de eritropoyesis determinando el hematocrito total, dado que éste viene determinado principalmente por el número de eritrocitos y puede determinarse fácilmente. Estos métodos de determinación del nivel de eritropoyesis son bien conocidos por los expertos en la técnica. Si se ha determinado el nivel de eritropoyesis, puede determinarse el nivel de estimulación por ejemplo comparando el nivel de eritropoyesis antes y durante el tratamiento con ESA.

El significado del término "tratamiento" es conocido por los expertos en la técnica. En el contexto de la presente invención, el término debe entenderse en un sentido amplio comprendiendo cualquier tipo de administración de un ESA a un paciente, por ejemplo mediante administración oral, inyección endovenosa, inyección subcutánea, o inyección intramuscular. Preferentemente, el término tratamiento hace referencia a la administración del fármaco correspondiente a largo plazo, por ejemplo una administración que provoca un aumento del número de eritrocitos durante al menos 2 meses, preferentemente al menos 3 meses, más preferentemente al menos 6 meses, más preferentemente al menos 12 meses, más preferentemente al menos 2 años, más preferentemente al menos 3 años. Puede observarse a partir de los ejemplos que la diferencia relativa en el riesgo puede mantenerse similar durante un largo período de tiempo, pero que el número total de complicaciones cardiovasculares puede aumentar continuamente a lo largo del tiempo de administración. Por lo tanto, en el contexto de una indicación clínica determinada, puede ser aceptable administrar un ESA durante un período corto de tiempo (por ejemplo hasta 1 semana, 4 semanas, 2 meses o 4 meses) en un paciente de riesgo identificado, según la invención, mientras que la decisión sobre la administración a largo plazo en dicho paciente de riesgo debería basarse preferentemente en una evaluación más cuidadosa del riesgo y el beneficio. En consecuencia, la presente invención también se refiere al diagnóstico del riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento a corto y/o largo plazo con un ESA.

La presente invención aprovecha ciertos marcadores bioquímicos o moleculares. Los términos "marcador bioquímico" y "marcador molecular" son conocidos por los expertos en la técnica. En concreto, los marcadores bioquímicos o moleculares son productos de la expresión génica que se expresan de forma diferente (es decir aumentan o disminuyen) en presencia o ausencia de una condición, enfermedad o complicación determinada. Habitualmente, un marcador molecular se define como un ácido nucleico (tal como por ejemplo ARNm), mientras que el marcador bioquímico es una proteína, polipéptido o péptido. El nivel de un marcador bioquímico o molecular adecuado puede indicar la presencia o ausencia de la condición, enfermedad o complicación y por lo tanto permite su diagnóstico.

La presente invención aprovecha en concreto los péptidos tipo BNP como marcadores bioquímicos. También se considera en el contexto de la presente invención la utilización de cualquier combinación de péptidos tipo BNP como marcadores bioquímicos.

5 Los péptidos tipo BNP comprenden el pre-proBNP, el proBNP, el NT-proBNP y el BNP.

El pre-propéptido (134 aminoácidos en el caso del pre-proBNP) comprende un péptido señal corto, que es escindido enzimáticamente dando lugar al pro-péptido (108 aminoácidos en el caso del proBNP). El propéptido se escinde adicionalmente 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).

Los péptidos tipo BNP preferentes según la presente invención son el proBNP, el NT-proBNP el BNP y las variantes de los mismos. BNP es la hormona activa y posee una vida media más corta que el NT-proBNP inactivo.

15 La fase preanalítica es más robusta en el caso del NT-proBNP permitiendo un transporte más fácil de la muestra a un laboratorio central (Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples (“Estabilidad a largo plazo de péptido natriurético tipo B (BNP) y el proBNP aminoterminal (NT-proBNP) endógenos en muestras de plasma congeladas”) Clin. Chem. Lab. Med. 2004; 42:942-4). Las muestras sanguíneas pueden almacenarse a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o transportarse sin pérdidas de recuperación. Por el contrario, el almacenamiento del BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C conlleva un pérdida de al menos el 20% (Mueller T, Gegenhuber A, y otros Clin. Chem. Lab. Med. 2004; 42:942-4, ver más arriba; Wu AH, Packer M, Smith A, Bijou R, Fink D, Mair J, Wallentin L, Johnston N, Feldcamp CS, Haverstick DM, Ahnadi CE, Grant A, Despres N, Bluestein B, Ghani F. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study (“Evaluación analítica y clínica del ensayo automatizado del péptido natriurético tipo B Bayer ADVIA Centaur en pacientes con insuficiencia cardiaca: un estudio multi-centros”) Clin. Chem. 2004; 50:867-73).

30 Tanto la determinación de la forma activa como la inactiva puede ser ventajosa, dependiendo del curso temporal de interés y del equipamiento analítico y las condiciones de almacenamiento disponibles. Los péptidos tipo BNP más preferentes, según la presente invención, son el NT-proBNP y las variantes del mismo.

En este contexto, el término “variantes” se refiere a péptidos sustancialmente similares a dichos péptidos. El término “sustancialmente similar” es bien conocido por los expertos en la técnica. En concreto, una variante puede ser una isoforma o alelo que muestra intercambios de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la isoforma del péptido más prevalente en la población humana. Preferentemente, dicho péptido sustancialmente similar posee una semejanza de secuencia con la isoforma más prevalente del péptido de al menos un 80%, preferentemente de al menos un 85%, más preferentemente de al menos un 90% y de forma más preferente de al menos un 95%. También son sustancialmente similares los productos de degradación, por ejemplo productos de degradación proteolítica, que siguen siendo reconocidos por el medio diagnóstico o por ligandos dirigidos contra el péptido completo correspondiente. El término “variantes” también pretende referirse a variantes de escisión.

El término “variante” también se refiere a péptidos con modificaciones post-traducción tales como péptidos glicosilados. Una “variante” también es un péptido que ha sido modificado tras la recogida de la muestra, por ejemplo mediante la unión covalente o no covalente al péptido de un marcador, particularmente un marcador radioactivo o fluorescente.

50 Son conocidos ejemplos de variantes concretas y de los métodos para su determinación (ver por ejemplo, Ala-Kopsala, M., Magga, J., Peuhkurinen, K. y otros (2004): Molecular heterogeneity has a major impact on the measurement of circulating N-terminal fragments of A-type and B-type natriuretic peptides (“La heterogeneidad molecular ejerce un impacto importante en la determinación de los fragmentos N-terminales circulantes de los péptidos natriuréticos tipo A y tipo B. Clinical Chemistry, vol 50(9), 1576-1588).

55 Otras realizaciones de la invención incluyen la determinación de diferentes marcadores en combinación, de forma simultánea o no simultánea. Un ejemplo es la determinación del NT-proBNP en combinación con BNP.

Diagnóstico, según la presente invención, incluye detectar, monitorizar, confirmar, subclasificar y predecir la enfermedad, alteración, complicación o riesgo de interés. Detectar se refiere a percibirse de la presencia de una enfermedad, alteración, complicación o riesgo. Monitorizar se refiere a hacer un seguimiento de una enfermedad, alteración, complicación o riesgo ya diagnosticado, por ejemplo analizar la progresión de la enfermedad o la influencia de un tratamiento concreto sobre la progresión de una enfermedad o alteración. Confirmación se refiere a fortalecer o sustentar un diagnóstico ya realizado utilizando otros indicadores o marcadores. Subclasificar se refiere a definir adicionalmente un diagnóstico según diferentes subclases de la enfermedad, alteración, complicación o riesgo diagnosticado, por ejemplo definir según formas leves y graves de la enfermedad. Predecir se refiere a realizar un pronóstico sobre una enfermedad, alteración, complicación o riesgo antes de que sean evidentes o se alteren de forma significativa otros síntomas o marcadores.

5 Tal como comprenderán los expertos en la técnica, no se pretende que dicho diagnóstico sea correcto en el 100% de los individuos a diagnosticar. El término, sin embargo, requiere que una parte significativa de los individuos pueda ser diagnosticado de la enfermedad, alteración, complicación o riesgo en cuestión. Los expertos en la técnica pueden determinar si dicha parte es estadísticamente significativa sin mayores complicaciones utilizando diferentes herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinando los intervalos de confianza, determinando el valor p, la prueba de la T de Student, la prueba de la U de Mann-Whitney etc., Los detalles están disponibles de Dowdy y Wearden, Statistics for Research ("Estadística para investigación"), John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes son de al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99%. Los valores p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

10 Las complicaciones cardiovasculares, según la presente invención, comprenden cualquier disfunción que afecte al sistema cardiovascular, particularmente cualquier complicación asociada con la formación de placas o trombos.

15 Las complicaciones asociadas con la formación de placas o trombos en el sistema cardiovascular son bien conocidas. Una placa o un trombo pueden provocar un estrechamiento u oclusión de un vaso sanguíneo reduciendo de este modo el flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno. Frecuentemente, las complicaciones clínicamente relevantes están provocadas por la rotura de una placa o por un trombo que es transportado por el torrente circulatorio hasta que queda atascado en un vaso sanguíneo, tal como por ejemplo una arteria coronaria o pulmonar.

20 Las complicaciones cardiovasculares pueden ser cardíacas o no cardíacas.

25 Las complicaciones no cardíacas pueden producirse en la periferia (enfermedad vascular periférica), como por ejemplo la trombosis venosa profunda, y puede provocar, por ejemplo, gangrena, microangiopatía o embolismo pulmonar. Un ejemplo es la enfermedad vascular periférica que provoca necrosis y posible amputación. Otros ejemplos de complicaciones no cardíacas asociadas con la formación de placas o trombos incluyen aquellas complicaciones que afectan el cerebro, por ejemplo el accidente isquémico transitorio (AIT, un evento isquémico en el cerebro) o el accidente vascular cerebral (ictus). Como ejemplos adicionales de complicaciones cardiovasculares no cardíacas se incluyen la hipertensión y la hipotensión.

30 En el sistema cardíaco (corazón y arterias coronarias), las complicaciones asociadas con la formación de placas y trombos incluyen la angina estable (SAP), y los síndromes coronarios agudos (ACS). La angina se caracteriza por la presencia de isquemia miocárdica, es decir suministro insuficiente de oxígeno; particularmente bajo condiciones de incremento de la demanda de oxígeno, por ejemplo en caso de ejercicio físico. Los pacientes con ACS pueden presentar angina inestable (UAP) o puede haber presentado ya un infarto de miocardio (MI). El infarto de miocardio se caracteriza por eventos necróticos (es decir destrucción tisular debida a la falta de suministro de oxígeno) más o menos grandes. Según el aspecto del electrocardiograma, el MI puede ser un MI con elevación del segmento ST o un MI sin elevación del segmento ST. Cuando se produce un MI, éste puede seguirse de disfunción ventricular izquierda (LVD). Los pacientes con LVD presentan insuficiencia cardíaca congestiva (CHF) con una tasa de mortalidad de aproximadamente el 15%. Sin embargo, la insuficiencia cardíaca también puede ser aguda (insuficiencia cardíaca aguda, AHF).

35 Una complicación cardíaca, según la presente invención, también puede ser una arritmia, bradicardia y taquicardia.

40 Una complicación cardíaca puede ser sistólica o diastólica (es decir afectando primariamente la fase de eyección (sistólica) o la fase de llenado (diastólica) del ventrículo afecto).

45 En el contexto de la presente invención, "complicación cardiovascular" se refiere particularmente a enfermedad coronaria, SAP, ACS, UAP, MI (incluyendo MI con elevación del segmento ST y MI sin elevación del segmento ST), LVD, CHF, muerte cardiovascular, AIT o accidente vascular cerebral. De forma más particular "complicación cardiovascular" se refiere a ACS, UAP, MI (incluyendo MI con elevación del segmento ST y MI sin elevación del segmento ST), LVD, CHF, muerte cardiovascular, AIT o accidente vascular cerebral.

50 Las complicaciones cardiovasculares pueden provocar síntomas, que se han clasificado dentro de un sistema de clasificación funcional según la Asociación del corazón de Nueva York (NYHA). Los pacientes de Clase I no presentan síntomas obvios de enfermedad cardiovascular. No presentan limitación a la actividad física, y una actividad física normal no provoca fatiga, palpitaciones, o disnea (dificultad de respiración) desproporcionados. Los pacientes de clase II presentan una limitación ligera de la actividad física. Están confortables en reposo pero la actividad física normal provoca fatiga, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase III muestran una limitación marcada de la actividad física. Están confortables en reposo pero una actividad física inferior a la normal provoca fatiga, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase IV son incapaces de realizar la más mínima actividad física sin molestias. Muestran síntomas de insuficiencia cardíaca en reposo. Si realizan la más mínima actividad física las molestias aumentan.

55 Por lo tanto, los pacientes con complicaciones cardiovasculares pueden dividirse en individuos sin síntomas clínicos y con síntomas (por ejemplo disnea).

5 Otra característica de las enfermedades cardiovasculares puede ser la “fracción de eyección del ventrículo izquierdo” (LVEF), también conocida como “fracción de eyección”. Las personas con un corazón sano presentan una LVEF no alterada, que generalmente se describe como superior al 50%. La mayoría de personas con enfermedad cardíaca sistólica sintomática presentan generalmente una LVEF del 40% o menos.

10 En el caso de la enfermedad cardíaca diastólica, la LVEF puede ser normal (reflejando una diástole normal) mientras que el llenado es insuficiente. La enfermedad cardíaca diastólica puede caracterizarse, sin embargo, por un incremento del grosor de la pared ventricular.

15 Según la presente invención, una complicación cardiovascular puede provocar síntomas, particularmente síntomas clase II-IV de la NYHA, más particularmente síntomas clase III-IV de la NYHA.

Según la presente invención, una complicación cardiovascular puede asociarse un una LVEF del 40% o menos.

20 Según la presente invención, una complicación cardiovascular puede estar “compensada” o “descompensada”. Compensada significa que pueden satisfacerse todavía las necesidades de oxígeno habituales del organismo, mientras que descompensada significa que ya no pueden satisfacerse las necesidades de oxígeno habituales del organismo.

Según la presente invención, “presentar una complicación cardiovascular” incluye también el deterioro de una complicación cardiovascular pre-existente.

25 Según la presente invención, el término paciente se refiere a un individuo sano, un individuo aparentemente sano, o particularmente, un individuo que padece una enfermedad. Particularmente, el paciente padece o está siendo tratado de anemia, por ejemplo, debida a un cáncer o una enfermedad renal (particularmente, la enfermedad renal crónica, por ejemplo secundaria a una nefropatía diabética). Por lo tanto, el paciente también puede ser un paciente afecto de cáncer, enfermedad renal o diabetes. Incluso de forma más particular, en el momento de la detección o diagnóstico, el paciente no presenta ninguna enfermedad cardiovascular conocida y/o no tiene o tiene síntomas menores (NHYA clase I o II) de complicación cardiovascular, y/o no está siendo tratado de una complicación cardiovascular.

30 Particularmente, el paciente es un candidato a recibir tratamiento con un ESA. Más particularmente, en el momento de la detección o diagnóstico, el paciente no ha recibido tratamiento con un ESA, más particularmente con eritropoyetina o una variante de la misma, desde hace al menos un mes, particularmente al menos 2 meses, más particularmente al menos 6 meses, más particularmente desde hace al menos 1 año. Incluso de forma más particular, en el momento de la detección o diagnóstico, el paciente no ha recibido nunca tratamiento con un ESA.

35 Es conocido por los expertos en la técnica, bajo qué circunstancias puede considerarse que una complicación cardiovascular puede haberse producido “como consecuencia” de un tratamiento con un ESA. En los estudios clínicos, la comparación de los grupos de pacientes tratados con ESA con los grupos de pacientes no tratados con ESA puede revelar si los paciente en tratamiento con ESA presentan complicaciones cardiovasculares como consecuencia del tratamiento con un ESA: Si los pacientes tratados con un ESA presentan complicaciones cardiovasculares con mayor frecuencia, ello indica que el incremento en el número de complicaciones cardiovasculares se produce como consecuencia de dicho tratamiento con ESA en concreto. Igualmente, puede compararse que diferentes posologías de un tratamiento con ESA provocan un incremento en el número de complicaciones cardiovasculares. En la sección de ejemplos se aportan ejemplos de este tipo de análisis.

40 El término “como consecuencia” de un tratamiento con un ESA no debe interpretarse como prueba de que los ESA provocan de forma general complicaciones cardiovasculares. De hecho, tal como se ha expuesto anteriormente, se considera habitualmente que el tratamiento con un ESA puede reducir el riesgo de complicaciones cardiovasculares debido a la disminución de la tensión sobre el corazón. En la actualidad se desconocen los mecanismos biológicos responsables de la observación de que los ESA (particularmente a altas dosis o con niveles objetivo de hemoglobina elevados, respectivamente) pueden incrementar el riesgo de complicaciones cardiovasculares en algunos pacientes.

45 Sin embargo, tal como se ha mencionado previamente, se ha observado en el contexto de la presente invención que los marcadores descritos en la presente especificación son adecuados para detectar los pacientes con riesgo de presentar complicaciones cardiovasculares si se administra un ESA a dichos pacientes, particularmente a altas dosis (o con niveles objetivo de hemoglobina elevados).

50 Según la presente invención, el diagnóstico se realiza preferentemente utilizando un medio diagnóstico. Un medio diagnóstico es cualquier medio que permite la determinación del nivel, cantidad o concentración de una sustancia de interés, particularmente un péptido o polipéptido de interés, más particularmente un péptido tipo BNP.

55 Los métodos u medios diagnósticos que pueden utilizarse para determinar los niveles de los péptidos correspondientes son conocidos por los expertos en la técnica. Estos métodos incluyen métodos basados en ELISA en placas de microtitulación, inmunoensayos completamente automatizados o robóticos (disponibles por ejemplos

en los analizadores Elecsys™ o Cobas™), CBA (un ensayo de unión de cobalto enzimático, disponible por ejemplo en los analizadores Roche-Hitachi™) y ensayos de aglutinación en látex (disponibles por ejemplo en los analizadores Roche-Hitachi™). Los métodos y medios también incluyen dispositivos para punto de atención, tales como el Cardiac Reader™ (disponible de Roche Diagnostics).

5 Los dispositivos para punto de atención se entienden generalmente como dispositivos capaces de realizar determinaciones a la cabecera del enfermo. Un ejemplo es el Cardiac Reader™ (disponible de Roche Diagnostics), en combinación por ejemplo con tiras reactivas para NT-proBNP (disponibles como "Cardiac proBNP" de Roche Diagnostics). Esta prueba puede utilizar dos anticuerpos (preferentemente monoclonales) dirigidos contra el péptido de interés (por ejemplo un péptido tipo BNP). Los anticuerpos pueden ser idénticos a los anticuerpos utilizados, por ejemplo, en los ensayos Elecsys™ o Cobas™. Por ejemplo, el primer anticuerpo se marca con biotina y el segundo anticuerpo se marca con partículas de oro. La prueba puede iniciarse añadiendo una pequeña cantidad (por ejemplo 150 µl) de una muestra de sangre sobre la tira reactiva (por ejemplo, en un pocillo de muestra de la tira reactiva). Los eritrocitos de la muestra pueden separarse del plasma antes o después de añadir la muestra a la tira reactiva, por ejemplo si la muestra fluye a través de un filtro de fibra adecuada (por ejemplo, un filtro de fibra de vidrio). Dicho medio de separación (por ejemplo, filtro de fibra) es preferentemente parte de la tira reactiva. Los anticuerpos (preferentemente, ya presentes en la tira reactiva) se disuelven en el plasma restante. Los anticuerpos son capaces de unirse al péptido o polipéptido de interés, formando un complejo tipo sándwich de tres capas. Los anticuerpos (unidos o no unidos) fluyen a través de la tira hacia la zona de detección. La zona de detección comprende medios para detectar el complejo unido, por ejemplo puede comprender estreptavidina. En esta zona se inmoviliza el complejo y se visualiza el complejo inmovilizado como una línea de color púrpura gracias al anticuerpo marcado con oro. Preferentemente, a continuación el anticuerpo marcado con oro restante puede desplazarse a lo largo de la tira reactiva siendo capturado en una zona que comprende un péptido o polipéptido sintético que comprende el epítipo del péptido tipo BNP a detectar, que se visualiza como una línea púrpura separada. La presencia de esta segunda línea sirve como control pues indica que el flujo de la muestra ha funcionado correctamente y que el anticuerpo está intacto, la tira reactiva puede comprender un marcador que indique qué péptido o polipéptido de interés puede detectarse con la tira. También puede comprender un código de barras u otro tipo de código legible por un dispositivo para la determinación óptica de la cantidad de marcador detectable en la zona de detección. Dicho código de barras puede incluir información que indique qué péptido o polipéptido de interés puede detectarse con la tira. El código de barras también puede incluir información específica de lote sobre la tira reactiva.

El Cardiac Reader comprende una cámara (por ejemplo un dispositivo de carga acoplada, CCD) que registra ópticamente la zona de detección de la tira reactiva. Las líneas de señal y control pueden identificarse mediante un algoritmo de reconocimiento de patrones. La intensidad del marcador en la línea de señal es típicamente proporcional a la cantidad de péptido o polipéptido de interés. La señal óptica puede convertirse en concentración mediante una curva de calibración específica de lote que puede almacenarse en un chip de codificación. La coincidencia entre el código de calibración y el lote puede comprobarse mediante un código de barras en la tira reactiva.

Además, los expertos en la técnica están familiarizados con diferentes métodos de determinación del nivel de un péptido o polipéptido. El término "nivel" se refiere a la cantidad o concentración de un péptido o polipéptido en un paciente o una muestra de un paciente.

El término "determinar", según la presente invención, se refiere a determinar la cantidad o concentración, preferentemente de manera semicuantitativa o cuantitativa, del ácido nucleico, péptido, polipéptido u otra sustancia de interés. La determinación puede realizarse de forma directa o indirecta. La determinación indirecta incluye la determinación de respuestas celulares, ligandos unidos, marcadores o productos de reacciones enzimáticas. Preferentemente, la determinación se realiza in vitro.

En el contexto de la presente invención, cantidad también se refiere a concentración. Es evidente, que a partir de la cantidad total de una sustancia de interés en una muestra de un tamaño conocido, puede calcularse la concentración de la sustancia y viceversa.

La determinación puede realizarse según cualquier método conocido en la técnica. A continuación se describen los métodos preferentes.

En una realización preferente, el método de determinación del nivel de un péptido o polipéptido de interés, particularmente un péptido tipo BNP, comprende las etapas de (a) poner en contacto una célula capaz de una respuesta celular frente al péptido o polipéptido con el péptido o polipéptido durante un período adecuado de tiempo, (b) determinar la respuesta celular.

En otra realización preferente, el método de determinación del nivel de un péptido o polipéptido de interés, particularmente un péptido tipo BNP, comprende las etapas de (a) poner en contacto un péptido o polipéptido con un sustrato adecuado durante un período adecuado de tiempo, (b) determinar la cantidad de producto.

En otra realización preferente, el método de determinación del nivel de un péptido o polipéptido de interés, particularmente un péptido tipo BNP, comprende las etapas de (a) poner en contacto un péptido o polipéptido con un ligando de unión específica, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, (c) determinar la cantidad de ligando unido.

5 Preferentemente, el péptido o polipéptido está contenido en una muestra, particularmente un fluido corporal o muestra de tejido, y se determina la cantidad de péptido o polipéptido en la muestra.

10 Los péptidos o polipéptidos (proteínas) pueden determinarse en muestras de tejido, células o fluidos corporales, es decir preferentemente in vitro. Preferentemente, el péptido o polipéptido de interés se determina en una muestra de fluido corporal.

15 Según la presente invención, una muestra de tejido se refiere a cualquier tipo de tejido obtenido a partir de un organismo humano o animal muerto o vivo. Las muestras de tejido pueden obtenerse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante biopsia o curetaje.

20 Los fluidos corporales, según la presente invención, pueden incluir sangre (incluyendo derivados de la misma, por ejemplo suero sanguíneo o plasma sanguíneo), linfa, líquido cefalorraquídeo, saliva y orina. Particularmente, los fluidos corporales incluyen sangre (incluyendo derivados de la misma, por ejemplo suero sanguíneo o plasma sanguíneo) y orina. Las muestras de fluidos corporales pueden obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica.

25 Para los médicos generales, realizar un diagnóstico cardiológico ya no requiere de herramientas diagnósticas caras. De forma ventajosa, la utilización de muestras de orina evita la realización de etapas invasivas en el individuo. De forma sorprendente, se ha hallado en estudios que sustentan la presente invención que la cantidad de péptidos tipo BNP, particularmente NT-proBNP en orina posee un valor y fiabilidad para el diagnóstico similares a la cantidad en sangre. En general, sería esperable hallar en orina valores meramente insignificantes de péptidos tipo BNP dado que se considera que el aclaramiento principal de los péptidos tipo BNP se produce en el riñón mediante filtrado glomerular. Por lo tanto, no sería esperable que en (i) se hallaran en ningún caso cantidades suficientes de péptidos tipo BNP, particularmente NT-proBNP, en orina. Preferentemente, las determinaciones en orina se realizan en pacientes sin complicaciones renales mayores, más preferentemente en pacientes con un filtrado glomerular normal o casi normal.

35 El término "orina", según la presente invención, comprende la orina total o fracciones de a misma. Las fracciones son fracciones de orina que contienen péptidos o polipéptidos. Las muestras de orina pueden obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica. Las muestras pueden someterse a diversos pre-tratamientos conocidos antes de aplicar el método de la presente invención (es decir, muestras de orina procesadas).

40 Los métodos para obtener muestras de células incluyen la preparación directa de células individuales o de pequeños grupos celulares, disociar el tejido (por ejemplo, utilizando tripsina), y separar las células a partir de fluidos corporales, por ejemplo mediante filtración o centrifugación. Las células, según la presente invención, comprenden también plaquetas y otras células sin núcleo, por ejemplo eritrocitos.

45 En caso necesario, pueden procesarse las muestras de forma adicional. Particularmente, pueden purificarse a partir de la muestra ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos, según métodos conocidos en la técnica, incluyendo filtración, centrifugación o métodos de extracción tales como la extracción con cloroformo/fenol.

50 Para la determinación de respuestas celulares, la muestra o la muestra procesada se añade a un cultivo celular y se determina una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión de un gen informador o la secreción de una sustancia, por ejemplo un péptido, polipéptido o una molécula pequeña.

55 Otros métodos preferentes para la determinación pueden incluir la determinación de la cantidad de un ligando que se une de forma específica al péptido o polipéptido de interés. La unión, según la presente invención, incluye tanto la unión covalente como la no covalente.

60 Un ligando, según la presente invención, puede ser cualquier péptido, polipéptido, ácido nucleico u otra sustancia que se una al péptido o polipéptido de interés. Es bien conocido que los péptidos o polipéptidos, si se obtienen o purifican a partir de células animales o humanas, pueden modificarse, por ejemplo mediante glicosilación. Un ligando adecuado, según la presente invención, puede unirse al péptido o polipéptido también a través de dichos sitios.

65 Preferentemente, el ligando debería unirse específicamente al péptido o polipéptido a determinar. Según la presente invención, el término "unión específica" significa que el ligando no debería unirse sustancialmente a (tener "reacción cruzada" con) otros péptidos, polipéptidos o sustancias presentes en la muestra investigada. Preferentemente, la proteína o isoforma unida de forma específica debe unirse con una afinidad al menos 3 veces superior, más preferentemente al menos 10 veces superior e incluso más preferentemente al menos 50 veces superior en

comparación a la unión a cualquier otro péptido o polipéptido relevante. En este contexto, dichos otros péptidos o polipéptidos relevantes pueden ser cualquier péptido o polipéptido homólogo o estructuralmente relacionado.

5 La unión no específica puede ser tolerable, particularmente si el péptido o polipéptido investigado sigue siendo distinguible y determinable de forma inequívoca, por ejemplo según su tamaño en un Western Blot, o según su abundancia relativamente superior en la muestra.

10 La unión del ligando puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferentemente, el método es semi-cuantitativo o cuantitativo. A continuación se describen los métodos adecuados.

En primer lugar, la unión de un ligando puede determinarse directamente, por ejemplo mediante RMN o resonancia de plasmones superficiales.

15 En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede determinarse un producto de la reacción enzimática (por ejemplo, puede determinarse la cantidad de una proteasa determinando la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo en un Western Blot).

20 Para la determinación de productos de reacciones enzimáticas, preferentemente la cantidad de sustrato es saturante. También puede marcarse el sustrato con un marcador detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un período de tiempo adecuado. Un período de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca una cantidad detectable, preferentemente medible de producto. En lugar de determinar la cantidad de producto, puede determinarse el tiempo necesario para la aparición de una cantidad determinada (por ejemplo detectable) de producto.

25 En tercer lugar, el ligando puede acoplarse de forma covalente o no covalente a un marcador que permita la detección y medición del ligando.

30 El marcado puede realizarse mediante métodos directos o indirectos. El marcado directo supone el acoplamiento directo del marcador (de forma covalente o no covalente) al ligando. El marcado indirecto supone la unión (de forma covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho segundo ligando puede acoplarse con un marcador adecuado y/o ser la diana (receptor) de un ligando terciario que se une al segundo ligando. La utilización de ligandos secundarios, terciarios e incluso de otros ligando adicionales se utiliza habitualmente para incrementar la señal. Como ligandos secundarios u otros adicionales adecuados pueden incluirse anticuerpos, anticuerpos secundarios, y el bien conocido sistema estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.).

35 El ligando o sustrato también puede "etiquetarse" con una o más etiquetas tal como se conoce en la técnica. Dichas etiquetas pueden ser luego dianas para otros ligandos adicionales. Las etiquetas adecuadas incluyen la biotina, la digoxigenina, His-Tag, Glutathion-S transferasa, FLAG, GFP, myc-tag, hemaglutinina del virus influenza A (HA), proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta se encuentra preferentemente en extremo N terminal y/o C terminal.

40 Son marcadores adecuados cualquier marcador detectable mediante un método de detección adecuado. Los marcadores típicos incluyen las partículas de oro, las perlas de látex, el éster acridina, el luminol, el rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radioactivos, marcadores magnéticos (por ejemplo, "perlas magnéticas", incluyendo marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcadores fluorescentes.

45 Los marcadores enzimáticamente activos incluyen, por ejemplo la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la beta-Galactosidasa, la luciferasa y derivados de los mismos. Los sustratos adecuados para la detección incluyen la di-amino-bencidina (DAB), el 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, el NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro azul de tetrazolio y el 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato, disponibles como solución madre preparada por Roche Diagnostics), el CDP-Star™ (Amersham Biosciences) y el ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación adecuada enzima-sustrato puede dar lugar a un producto de reacción con color, a fluorescencia o a quimioluminiscencia, que puede ser medida según métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, utilizando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). Para la medición de reacciones enzimáticas, se aplican de forma análoga los criterios expuestos más arriba.

50 Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP, YFP, RFP y derivados de las mismas), Cy3, Cy5, Texas Red, fluoresceína y los colorantes Alexa (por ejemplo Alexa 568) y los puntos cuánticos. Los marcadores fluorescentes pueden obtenerse, por ejemplo de Molecular Probes (Oregón).

55 Los marcadores radioactivos típicos incluyen el S³⁵, el I¹²⁵, el P³², el P³³ y similares. Los marcadores radioactivos pueden detectarse mediante cualquier método conocido y adecuado, por ejemplo una película sensible a la luz o un generador de imágenes de fósforo.

65

Según la presente invención, entre los métodos de determinación adecuados también se incluyen la precipitación (particularmente la inmunoprecipitación), la electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia generada por energía eléctrica), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), ensayos inmuno-enzimáticos tipo sándwich, inmunoensayos tipo sándwich por electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroinmunoensayo de disociación potenciada por lantánidos (DELFA), ensayo de proximidad por centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría potenciada por látex, ensayos inmunológicos en fase sólida, y espectrometría de masas tales como SELDI-TOF, MALDI-TOF, o espectrometría de masas por electroforesis capilar (CE-MS). Pueden utilizarse otros métodos conocidos en la técnica (tales como la electroforesis en gel, la electroforesis en gel 2D, la electroforesis en gel de poli(acrilamida) SDS (SDS-PAGE), transferencia Western) solos o en combinación con el marcaje u otros métodos, tal como se han descrito más arriba.

Como ligandos preferentes se incluyen los anticuerpos, los ácidos nucleicos, los péptidos o polipéptidos, y los aptámeros, por ejemplo los aptámeros de ácidos nucleicos o péptidos (por ejemplo Spiegelmers o anticinalinas). Los métodos para obtener dichos ligandos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también ofrecen suministradores comerciales. Los expertos en la técnica están familiarizados con los métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias dentro de los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. A continuación, puede evaluarse la capacidad de unión de dichos derivados según procedimientos de cribado conocidos en la técnica, por ejemplo mediante expresión en fagos.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente invención incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, así como variantes o fragmentos de los mismos, tales como Fv, Fab y F(ab)₂ capaces de unirse al antígeno o hapteno, El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos de cadena única.

En otra realización preferente, el ligando, preferentemente seleccionado del grupo formado por ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos o aptámeros se encuentra en una matriz.

Dicha matriz contiene al menos un ligando adicional, que puede dirigirse contra un péptido, polipéptido o ácido nucleico de interés. En el contexto de la presente invención, dicho ligando adicional también puede dirigirse contra un péptido, polipéptido o ácido nucleico sin un interés particular. Preferentemente, en el contexto de la presente invención la matriz contiene ligandos para al menos tres, preferentemente al menos cinco, más preferentemente al menos ocho péptidos o polipéptidos.

Según la presente invención, el término "matriz" se refiere a un soporte en fase sólida o tipo gel sobre el cual se unen o enlazan al menos dos compuestos en una disposición uni, bi o tridimensional. Dichas matrices (incluyendo "chips génicos", "chips de proteínas", matrices de anticuerpos y similares) son generalmente conocidos por los expertos en la técnica y típicamente se generan en portas de vidrio para microscopía, portas especialmente recubiertos tales como portas recubiertos con policlones, nitrocelulosa o biotina, cubres, y membranas tales como, por ejemplo, membranas a base de nitrocelulosa o nylon.

La matriz puede incluir un ligando unido o al menos dos células expresando cada una de ellas al menos un ligando.

En otra realización preferente, el ligando, seleccionado preferentemente del grupo formado por ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, se encuentra sobre un soporte sólido, preferentemente una matriz. Según la presente invención, el término "matriz" (incluyendo "chips génicos", "chips de proteínas" matrices de anticuerpos y similares) se refiere a un soporte en fase sólida o tipo gel sobre el cual se unen o enlazan al menos dos compuestos en una disposición uni, bi o tridimensional. Los soportes o matrices sólidas que comprenden un ligando o agente de unión de un péptido tipo BNP son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, materiales en columna, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas de metal coloidal, chips y superficies de sílice o vidrio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. disponibles comercialmente. El ligando o agente puede unirse a diferentes soportes. Como ejemplos de soportes bien conocidos se incluyen el vidrio, el poliestireno, el cloruro de polivinilo, el polipropileno, el polietileno, el policarbonato, el dextrano, el nylon, las amilosas, las celulosas naturales y modificadas, las poli(acrilamidas), las agarosas y la magnetita. Para los objetivos de la presente invención, la naturaleza del soporte puede ser soluble o insoluble. Los métodos para fijar/inmovilizar dicho ligando o agente son bien conocidos e incluyen, sin carácter limitante, interacciones iónicas, hidrofóbicas, covalentes y similares.

También se contempla la utilización de "matrices en suspensión" como matrices, según la presente invención (Nolan JP, Sklar LA (2002). Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm ("Tecnología de matrices en suspensión: evolución del paradigma de la matriz plana". Trends Biotechnol. 20(1):9-12). En dichas matrices en suspensión, el soporte, por ejemplo las microesferas o microperlas, se encuentran en suspensión. La matriz está formada por diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que transportan ligandos diferentes.

La invención se refiere además a un método para producir matrices, tal como se han definido más arriba, en las que al menos un ligando se une al material de soporte además de a otros ligandos.

Los métodos para la producción de dichas matrices, por ejemplo basados en la química de fase sólida y grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (US 5.744.305). Dichas matrices también pueden ponerse en contacto con sustancias o bibliotecas de sustancias y evaluar su capacidad de interacción, por ejemplo de unirse o cambiar de conformación. Por lo tanto, las matrices que comprenden un péptido o polipéptido, tal como se ha definido anteriormente, pueden utilizarse para la identificación de ligandos que se unen específicamente a dichos péptidos o polipéptidos.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a la utilización de medios diagnósticos capaces de medir, preferentemente in vitro, el nivel de un péptido tipo BNP, particularmente NT-proBNP, de un paciente para el diagnóstico del riesgo del paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento futuro con un ESA.

La invención también se refiere a la utilización de un kit que comprende un medio capaz de determinar, preferentemente in vitro, los niveles de un paciente de un péptido tipo BNP, preferentemente NT-proBNP, para el diagnóstico del riesgo del paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento futuro con un ESA.

También se da a conocer un kit que comprende un medio o agente para la determinación de un péptido tipo BNP. Dicho medio o agente puede ser cualquier medio o agente conocido por los expertos en la técnica. En la presente especificación se han expuesto ejemplos de dichos medios o agentes así como de métodos para su utilización. Por ejemplo, un agente adecuado puede ser cualquier ligando o anticuerpo capaz de unirse específicamente a un péptido tipo BNP. El kit también comprende cualquier otro componente considerado adecuado en el contexto de la determinación del nivel o niveles de los marcadores biológicos correspondientes, tales como tampones, filtros, etc. adecuados.

Opcionalmente, el kit puede comprender adicionalmente un manual de usuario para interpretar los resultados de cualquier determinación o determinaciones referentes al diagnóstico del riesgo de un paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento con ESA, particularmente un tratamiento futuro con ESA. Particularmente, dicho manual puede incluir información sobre qué nivel medido se corresponde con qué grado de riesgo. Ello se describe en otros apartados de la presente especificación. Adicionalmente, dicho manual de usuario puede proporcionar instrucciones sobre la utilización correcta de los componentes del kit para determinar el nivel o niveles del marcador o marcadores biológicos correspondientes.

La invención también se refiere a la utilización de dicho kit para el diagnóstico del riesgo de un paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento, particularmente un tratamiento futuro con un ESA. La presente invención también se refiere a la utilización de dicho kit en cualquiera de los métodos, según la presente invención, para el diagnóstico del riesgo de un paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento ESA, particularmente un tratamiento futuro con un ESA.

Además, se describe un dispositivo para el diagnóstico del riesgo de un paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento, particularmente un tratamiento futuro con un ESA que comprende

- a) Medios para determinar la cantidad de un péptido tipo BNO en una muestra de un paciente; y
- b) Medios para diagnosticar dicho riesgo comparando el nivel determinado con al menos un nivel de referencia.

El dispositivo arriba descrito como tal no es parte de la presente invención.

La presente invención también se refiere a la utilización de dicho dispositivo para el diagnóstico del riesgo de un paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento futuro con un ESA.

El término "dispositivo" tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un sistema de medios que comprende al menos los medios previamente mencionados unidos operativamente entre sí para permitir el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca. Los medios preferentes para la determinación del nivel de un péptido tipo BNP y para el diagnóstico del riesgo se dan a conocer en otros apartados de la presente especificación en relación con el método de la presente invención. Cómo unir los medios de forma operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplican medios para la determinación automática del nivel del péptido tipo BNP, los datos obtenidos por dicho medio de funcionamiento automático pueden ser procesados, por ejemplo, por un programa informático para diagnosticar el riesgo. Preferentemente, los medios están comprendidos, en ese caso, por un solo dispositivo. Dicho dispositivo puede incluir consecuentemente una unidad analizadora para la determinación del nivel del péptido tipo BNP en una muestra aplicada y una unidad informática para el procesamiento de los datos resultantes para el diagnóstico. De forma alternativa, cuando se utilizan medios como tiras reactivas para determinar el nivel del péptido tipo BNP, los medios para el diagnóstico pueden comprender tiras de control o tablas que asignan el nivel medido a un nivel que se sabe que se acompaña de insuficiencia cardíaca o a un nivel que se sabe que indica que el individuo está sano, tal como se ha discutido anteriormente. Las tiras

reactivas están, preferentemente, acopladas a un ligando o agente que se une específicamente al péptido tipo BNP. La tira o dispositivo comprende, preferentemente, medios para la detección del péptido tipo BNP que se une a dicho ligando o agente. Los medios preferentes de detección se dan a conocer en relación con las realizaciones que hacen referencia al método de la invención en párrafos anteriores. En tal caso, los medios están conectados de forma operativa de manera que el usuario del sistema reúne el resultado de la determinación de la cantidad y el valor diagnóstico del mismo, según las instrucciones e interpretaciones que se dan en el manual. Los medios pueden presentarse como dispositivos separados en este tipo de realización y, preferentemente, se empaquetan en forma conjunta en un kit. Los expertos en la técnica apreciarán cómo conectar los medios sin más explicaciones. Los dispositivos preferentes son aquellos que pueden aplicarse sin el conocimiento particular de un clínico especializado, por ejemplo, tiras reactivas o dispositivos electrónicos que solamente necesitan que se cargue la muestra. Los resultados pueden darse como una salida de un parámetro diagnóstico o como datos no procesados que requieren la interpretación del clínico. Como dispositivos preferentes adicionales se incluyen las unidades/dispositivos analizadores (por ejemplo biosensores, matrices, soportes sólidos acoplados a ligandos o agentes que reconocen específicamente el BNP, dispositivos de resonancia de plasmones superficiales, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masas etc.) o las unidades/dispositivos mencionados anteriormente, de acuerdo con el método de la presente invención.

El método según la presente invención comprende la etapa de diagnosticar el riesgo de un paciente comparando el nivel medido de un péptido tipo BNP con al menos un nivel de referencia, por ejemplo, los niveles conocidos asociados con diferentes grados de riesgo del paciente.

Según la presente invención, el término "riesgo" se refiere a la probabilidad de que se produzca un incidente concreto, más concretamente una complicación cardiovascular. Por ejemplo, puede ser un riesgo que un incidente determinado vaya a producirse con una probabilidad de al menos el 2%, 5%, 10%, 15% o 20% en un paciente determinado en un período de tiempo concreto, por ejemplo 500, 750, 1.000 ó 1.250 días. Los estudios clínicos pueden aportar datos que indiquen dichos riesgos. El riesgo concreto puede derivarse, por ejemplo, de una curva de Kaplan-Meier adecuada del tiempo hasta un incidente determinado, ver, por ejemplo, el ejemplo 3, así como los riesgos concretos y las razones de riesgo mencionados en el mismo.

Aunque el riesgo puede expresarse en valores absolutos, puede frecuentemente ser más útil expresarlo en términos relativos, por ejemplo en términos de un riesgo relativo aumentado o muy aumentado hasta un riesgo determinado en particular. Los técnicos en la materia están muy familiarizados con estos términos relativos. Por ejemplo, existe un riesgo promedio determinado de experimentar una complicación cardiovascular en la población en general. No obstante, puede ser más relevante conocer si un paciente específico tiene un riesgo adicional de experimentar una complicación cardiovascular, de manera que el riesgo total de este paciente "aumenta". De manera ventajosa, la presente invención permite también el diagnóstico de ese riesgo relativo.

El riesgo relativo puede expresarse en términos de razones de riesgo, El término "razón de riesgo" es conocido por los expertos en la técnica. Puede expresar la relación del riesgo entre dos subgrupos, por ejemplo, la razón de riesgo entre un grupo tratado con altas dosis y un grupo tratado con dosis bajas. Otro ejemplo es la razón de riesgo entre un grupo tratado con dosis altas versus un grupo tratado con dosis bajas con niveles bajos de péptido tipo BNP versus niveles elevados de péptido tipo BNP. La diferencia entre razones de riesgo es conocida como la interacción que se extrae de modelos de interacción, por ejemplo grupos de dosis con ciertos niveles de BNP. Los términos interacción y modelo de interacción son conocidos por los expertos en la técnica.

Particularmente, la presente invención permite identificar los pacientes con un riesgo aumentado de presentar una complicación cardiovascular si se tratan con dosis elevadas de un ESA (es decir, dirigidas a un nivel objetivo de hemoglobina elevado).

Por ejemplo, el riesgo puede estar aumentado o muy aumentado. El riesgo también puede no estar aumentado. Los expertos en la técnica están familiarizados con el significado de estos términos. Por ejemplo, si un paciente en concreto presenta un riesgo superior que el paciente medio, entonces el experto en la técnica habitualmente designará dicho riesgo como "aumentado". Preferentemente, el término "riesgo aumentado" se entiende como indicador de que el paciente no debería ser tratado con dosis altas de un ESA. Preferentemente, un paciente que presenta un riesgo aumentado debería ser monitorizado con cuidados adicionales respecto al desarrollo de cualquier complicación cardiovascular. Los expertos en la técnica comprenderán que la decisión final sobre el tratamiento será del facultativo responsable que considerará los factores relevantes adicionales, tales como la edad del paciente, la historia familiar de complicaciones cardiovasculares, la disponibilidad de posibilidades de monitorización, etc.

En el contexto de la presente invención, un riesgo aumentado de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de la administración de un ESA se refiere particularmente a un riesgo aumentado al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 3,5 veces o 4 veces en comparación con el riesgo del paciente medio, preferentemente de un paciente medio de la misma edad y sexo, más preferentemente de la misma edad, sexo y patología que provoca los síntomas tratables con medicación ESA (por ejemplo, diabetes o cáncer. Otras patologías que provocan síntomas tratables con medicación ESA ya se han mencionado en otros apartados de la presente especificación).

Los expertos en la técnica son capaces de determinar niveles conocidos de péptidos tipo BNP asociados con diferentes grados de riesgo de experimentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento con medicación ESA.

5 Según la presente invención, cuanto más elevado es el nivel medido de un péptido tipo BNP, mayor es el riesgo de presentar una complicación cardiovascular.

10 Preferentemente, el riesgo se determina comparando el nivel medido del péptido tipo BNP con un nivel de referencia. El término "nivel de referencia" es conocido por los expertos en la técnica. Particularmente, un nivel de referencia puede asociarse con un riesgo en concreto o puede distinguir entre diferentes niveles de riesgo. Debe apreciarse que el nivel de referencia también puede seleccionarse según el nivel deseado de sensibilidad y especificidad del diagnóstico. Una sensibilidad más elevada significa que se identifica una fracción mayor de todos los pacientes que presentan un diagnóstico determinado y/o que menos pacientes que presentan un diagnóstico determinado se diagnostican erróneamente como que no tienen la enfermedad, complicación o enfermedad diagnosticada. Un nivel más elevado de especificidad significa que una fracción mayor de pacientes identificados como portadores de un diagnóstico determinado presentan de hecho la enfermedad, complicación o riesgo diagnosticado. Cuando más alta es la sensibilidad deseada de un diagnóstico concreto, menor es la especificidad de su diagnóstico y viceversa. Por lo tanto, el nivel de referencia puede seleccionarse por los expertos en la técnica según la sensibilidad y especificidad deseadas.

20 En el contexto de esta descripción, es evidente que un nivel de referencia no puede ser solamente un valor aislado, si no que debe incluir un rango de valores.

25 De forma más particular, los niveles de referencia pueden derivarse de los niveles de péptidos tipo BNP determinados, por ejemplo, en estudio clínicos tales como los que se presentan en los ejemplos.

30 Más adelante se aportan ejemplos de niveles de referencia, a saber, se aportan niveles plasmáticos de NT-proBNP que se ha hallado durante la invención que están asociados con, o distinguen los grados indicados de riesgo de experimentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento con medicación ESA.

Es evidente que los niveles aportados más adelante solamente pueden servir como una primera clasificación del riesgo de un paciente. Por ejemplo, el riesgo también puede depender de la capacidad de bombeo disponible del paciente en concreto.

35 Según la presente invención, por ejemplo, un nivel plasmático inferior a 500 pg/ml, más particularmente inferior a 400 pg/ml, y de forma más particular inferior a 300 pg/ml de NT-proBNP se asocia a una ausencia de incremento de riesgo de experimentar una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento con un ESA.

40 Según la presente invención, por ejemplo, un nivel plasmático igual o superior a 300 pg/ml, más particularmente igual o superior a 400 pg/ml, y de forma más particular igual o superior a 500 pg/ml de NT-proBNP se asocia a un incremento del riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento con un ESA.

45 Según la presente invención, por ejemplo, un nivel plasmático igual o superior a 1000 pg/ml de NT-proBNP puede indicar un riesgo muy aumentado a partir del cual debería reconsiderarse si el paciente debe ser tratado con un ESA en ningún caso.

50 Es evidente que los niveles expuestos pueden superponerse, dependiendo de la sensibilidad y especificidad seleccionadas. Por lo tanto, según la presente invención, por ejemplo un nivel plasmático entre 300 y 500 pg/ml, más particularmente entre 350 y 450 pg/ml, más particularmente entre 380 y 420 pg/ml, particularmente de 400 pg/ml de NT-proBNP es capaz de distinguir entre la ausencia de incremento de riesgo y el incremento de riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento con medicación ESA. Si el nivel hallado es superior a este nivel discriminante, este nivel hallado indica un incremento del riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento con un ESA. Este nivel discriminante también puede denominarse "punto de corte" o "umbral de decisión".

Una vez se ha diagnosticado el riesgo de un paciente, ello puede tener consecuencias para el tratamiento subsiguiente tal como se describe más adelante. Los grados de riesgo mencionados más adelante se refieren en concreto a los grados de riesgo asociados con los niveles de NT-proBNP descritos en los párrafos anteriores.

60 Si un método según la presente invención indica la ausencia de un incremento del riesgo, puede continuarse el tratamiento tal como estaba planificado, por ejemplo puede administrarse una dosis alta de ESA (o en consecuencia puede tener como objetivo un nivel de hemoglobina más elevado de ESA). El tratamiento con ESA puede acompañarse de la monitorización de los niveles de NT-proBNP a intervalos bastante espaciados, por ejemplo, cada 4 semanas, 2 meses o 3 meses.

El nivel de referencia puede adaptarse a grupos de pacientes particulares. Por ejemplo, el nivel de referencia para la determinación en muestras sanguíneas puede aumentarse un 10-30%, más preferentemente un 15-25%, más preferentemente un 20% para pacientes afectados de enfermedad renal.

5 Si un método, según la presente invención, indica un aumento del riesgo, entonces debe adaptarse el tratamiento. Preferentemente, el tratamiento se acompañará de determinación adicional de los péptidos tipo BNP de la invención y por métodos diagnósticos adicionales tales como el electrocardiograma, el ecocardiograma u otros métodos adecuados conocidos por el cardiólogo experto. Puede reducirse la dosis de medicación ESA o puede no administrarse la medicación ESA. Por lo tanto, la presente invención también da a conocer un método para
10 tratamiento de los pacientes que reciben o van a recibir un tratamiento con medicación ESA.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención también permite la optimización de la dosis del tratamiento con un ESA, particularmente respecto al riesgo cardiovascular del paciente. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para determinar la dosis a administrar a un paciente durante un
15 tratamiento, preferentemente un tratamiento futuro, con un ESA, particularmente respecto al riesgo del paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de dicho tratamiento con un ESA, que comprende las etapas de (a) determinar, preferentemente in vitro, el nivel de un péptido tipo BNP del paciente, (b) determinar la dosis a administrar al paciente comparando el nivel determinado del péptido tipo BNP con al menos un nivel de referencia que distingue las diferentes dosis a administrar.

Si se selecciona una dosis de tratamiento con un ESA, es en general deseable seleccionar la dosis lo más alta posible que consiga un tratamiento eficiente de la anemia, pero que no provoque efectos indeseables. Sin embargo, si el médico responsable no es consciente del riesgo de un efecto secundario no deseado particular, tal como una complicación cardiovascular, puede seleccionar accidentalmente una dosis demasiado elevada que pueda dar lugar
20 a una complicación cardiovascular. Por el contrario, si el facultativo no puede determinar un riesgo determinado, puede ser que seleccione una dosis demasiado baja para alcanzar el beneficio terapéutico óptimo, particularmente un tratamiento eficiente de la anemia.

Preferentemente, la dosis debe ser lo suficientemente elevada como para tratar la anemia, para disminuir la tensión sobre el corazón. Preferentemente, la dosis debe ser lo suficientemente baja como para evitar las complicaciones cardiovasculares derivadas del tratamiento con un ESA.

De forma ventajosa, la presente invención da a conocer (1) información sobre que existe riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento con un ESA e (2) información referente a la optimización de la dosis del ESA (particularmente de acuerdo con el nivel objetivo de hemoglobina) a efectos de
35 minimizar el riesgo de complicaciones cardiovasculares.

La invención también da a conocer (3) información sobre si puede iniciarse el tratamiento con un ESA en casos de anemia relativamente leve, es decir, en un paciente con niveles relativamente elevados de Hb (por ejemplo, entre 11,0 y 12,5 g/dl) ("tratamiento precoz") o mejor solamente en casos de una anemia ligeramente más importante (por ejemplo, por debajo de 10,5 g/dl, o entre 9,5 y 10,5 g/dl de Hb) ("tratamiento tardío").

De forma más particular, si el nivel del péptido tipo BNP indica un incremento del riesgo de presentar una complicación cardiovascular (tal como se ha descrito en otros apartados de la presente invención), ello indica que el paciente no debe ser tratado con una dosis elevada de un ESA y/o indica que el paciente solamente debe ser tratado con una dosis baja de ESA y/o indica que el tratamiento no debe iniciarse de forma precoz. También puede indicar que el paciente no debe ser tratado con ESA. También puede indicar que el paciente debe ser tratado de forma adicional tal como se describe en el caso de incremento del riesgo, preferentemente el paciente debe ser monitorizado de forma adicional tal como se ha descrito en la presente invención.

En el contexto de la presente invención, los términos "dosis baja" y "dosis alta" de un ESA se entienden preferentemente como las dosis necesarias para aumentar el nivel de hemoglobina hasta un nivel objetivo determinado. Por lo tanto, el término "dosis baja" y "dosis alta" también pueden entenderse las correspondientes a una corrección "parcial" versus una corrección "completa" de la anemia. Una dosis baja se refiere preferentemente a una dosis de ESA no superior a la necesaria para alcanzar un nivel de Hb de 13 g/dl, más preferentemente una dosis no superior a la necesaria para alcanzar un nivel de Hb de 12 g/dl. Como ejemplos de dosis bajas pueden incluirse dosis de ESA dirigidos a alcanzar un nivel objetivo de Hb de 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5 ó 13 g/dl. Una dosis alta de ESA se refiere a una dosis suficiente para alcanzar un nivel de Hb de al menos 14 g/dl, más preferentemente un nivel de 14,5 g/dl. Como ejemplos de dosis bajas pueden incluirse dosis de ESA dirigidos a alcanzar un nivel objetivo de Hb de 14 g/dl, 14,5 g/dl, 15 g/dl.

De forma alternativa, el término "dosis baja" y "dosis alta" puede entenderse como la dosis capaz de incrementar el nivel de Hb menos de 2 g/dl, particularmente menos de 1,5 g/dl, 1 g/dl ó 0,5 g/dl (dosis bajas) o de al menos 2 g/dl, 2,5 g/dl ó 3 g/dl (dosis altas).

65

Por ejemplo, una dosis alta puede corresponder a una dosis suficiente para mantener un nivel objetivo de hemoglobina entre 13 y 15 g/dl en un paciente con un nivel de hemoglobina antes del inicio del tratamiento con un ESA entre 11,0 y 12,5 g/dl. En otro ejemplo, una dosis baja puede corresponder a una dosis suficiente para mantener un objetivo de hemoglobina entre 10,5 y 11,5 g/dl en un paciente con un nivel inferior a 10,5 g/dl, preferentemente con un nivel entre 9,5 y 10,5 g/dl, antes del inicio del tratamiento con un ESA.

La presente invención da a conocer medios y métodos que hacen referencia al diagnóstico de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento con ESA. En concreto, las enseñanzas de la presente invención se refieren a dosis de ESA que previamente se consideraba que no estaban asociadas con riesgo de presentar una complicación cardiovascular, por ejemplo una dosis que no es superior a la necesaria para alcanzar una concentración de hemoglobina de al menos 17, 18, 19 ó 20 g/dl. Por lo tanto, las enseñanzas de la presente invención se refieren a dosis que ya no provocan hiperviscosidad sanguínea o cualquier otro evento adverso conocido en el contexto del dopaje sanguíneo de los atletas.

Se apreciará que los valores anteriores de dosis "altas" o "bajas" no se refieren a las dosis necesarias en individuos sanos (en los que no serán necesarios los ESA en ningún caso para alcanzar dichos niveles), sino a las dosis administradas a pacientes afectados de anemia. En concreto, los niveles se refieren a pacientes que presentan un nivel de Hb (antes de iniciar el tratamiento con un ESA) inferior a 12 g/dl, particularmente menos de 10 g/dl, más particularmente menos de 9 g/dl, y de forma más particular menos de 8 g/dl en hombres o un nivel de Hb (antes de iniciar el tratamiento con un ESA) inferior a 11 g/dl, particularmente menos de 10 g/dl, más particularmente menos de 9 g/dl, y de forma más particular menos de 8 g/dl en mujeres.

Los expertos en la técnica están familiarizados con los métodos para determinar las dosis de ESA para alcanzar un nivel determinado u objetivo de Hb. Por ejemplo, en un paciente anémico (que presenta, por ejemplo, un nivel de Hb entre 9,5 y 12,5) el tratamiento debe iniciarse con una dosis correspondiente a 2.000 unidades internacionales de NeoRecormon™, administrado por vía subcutánea una vez a la semana. El nivel de Hb de dicho paciente se determinará por ejemplo tras una semana o tras un mes y la dosis se adaptará adicionalmente hasta que se halle un régimen terapéutico que alcance un valor objetivo determinado. Puede haber adaptaciones adicionales y monitorizaciones de las dosis, por ejemplo, dependiendo de la progresión de la enfermedad. Se apreciará que los niveles de Hb alcanzados pueden fluctuar hasta un cierto nivel, por ejemplo, dependiendo de la frecuencia de administración del ESA o de la progresión de la enfermedad.

Cualquiera de las realizaciones o características preferentes mencionadas en esta descripción obviamente son aplicables consecuentemente al aspecto de determinar la dosis de medicamento ESA.

La presente invención también se refiere a la monitorización del riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento, particularmente de un tratamiento futuro con un ESA. Además, la presente invención también se refiere a la monitorización adicional del riesgo una vez se ha diagnosticado dicho riesgo. Más particularmente, la monitorización se refiere a la monitorización de un paciente en el cual en el momento de dicha primera determinación o diagnóstico del riesgo cualquier tratamiento previo con un ESA, más particularmente eritropoyetina o una variante de la misma, se ha producido al menos un mes, particularmente al menos 2 meses, más particularmente 6 meses y más particularmente al menos 1 año antes del momento de la determinación o diagnóstico. Incluso de forma más particular, en el momento de la primera determinación o diagnóstico, el paciente no ha recibido tratamiento previo alguno con un ESA. La presente invención también se refiere a la monitorización de la situación cardiovascular actual de dichos pacientes.

El término "monitorización" es conocido por los expertos en la técnica y se ha definido previamente en esta especificación. Más particularmente, la monitorización puede llevarse a cabo diagnosticando el riesgo del paciente a intervalos regulares, por ejemplo a intervalos de aproximadamente 2 horas, 10 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses o 1 año. En este contexto, el término "aproximadamente" se entiende por los expertos en la técnica. Por lo tanto, el intervalo real también puede desviarse del intervalo deseado dependiendo de circunstancias prácticas tales como la planificación de las citas adecuadas, etc. Particularmente, el intervalo puede desviarse, por ejemplo, hasta un 100%, preferentemente hasta un 50%, más preferentemente hasta un 25%, más preferentemente hasta un 10%. La monitorización también puede llevarse a cabo acompañando el tratamiento con un ESA o no acompañando el tratamiento con un ESA. La monitorización también permite adaptar de forma adicional la dosis de tratamiento con ESA.

Cualquiera de las realizaciones o características preferentes mencionadas en esta descripción obviamente son aplicables consecuentemente al aspecto de la monitorización.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para decidir sobre el tratamiento de un paciente en tratamiento con un ESA y/o para decidir sobre la dosis de un tratamiento planificado con ESA, que comprende las etapas de (a) determinar, preferentemente in vitro, el nivel de un péptido tipo BNP, (b) diagnosticar el riesgo de que el paciente presente una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento con un ESA comparando el nivel medido del péptido tipo BNP con niveles conocidos asociados con diferentes grados de riesgo de los pacientes, (c) opcionalmente indicar una exploración del paciente por parte de un cardiólogo, (d) recomendar el

inicio del tratamiento o abstenerse del mismo, teniendo en cuenta, opcionalmente, el resultado de la exploración por parte del cardiólogo. Preferentemente, se recomienda la exploración por parte del cardiólogo y/o la abstención del tratamiento si el método indica la presencia de un aumento del riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de la medicación con un ESA. Es evidente que el método puede adaptarse según todas las realizaciones o aspectos preferentes de la presente invención mencionados en esta especificación.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención y no pretenden limitar en modo alguno su alcance.

Finalmente, la presente invención también abarca la utilización de los dispositivos descritos en la misma más arriba o el péptido tipo BNP o variantes del mismo para el diagnóstico del riesgo de que un paciente presente una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento futuro con un ESA.

Descripción de las figuras:

Figura 1: Curvas de Kaplan-Meier y razones de riesgo (HR, razones de riesgo) para la variable de resultado cardiovascular primaria.

Figura 2: Curvas de Kaplan-Meier y razones de riesgo (HR, razones de riesgo) para eventos adversos cardíacos (complicaciones cardíacas).

Figura 3: Curvas de Kaplan-Meier y razones de riesgo (HR, razones de riesgo) para eventos adversos (AE) cardiovasculares (complicaciones cardiovasculares).

Figura 4: Representación gráfica de las razones de riesgo (HR, razones de riesgo) estimadas para eventos adversos cardiovasculares (CVAE) y la variable de resultado cardiovascular primaria (P Endp) incluyendo los intervalos de confianza del 95%.

Ejemplo 1

Determinación de NT-proBNP:

NT-proBNP se determinó mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (inmunoensayo tipo sándwich Elecsys proBNP; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un Elecsys 2010. El ensayo funciona según el principio del inmunoensayo de electroquimioluminiscencia tipo sándwich. En una primera etapa, se incuban el anticuerpo de captura marcado con biotina IgG (1-21), el anticuerpo de señal marcado con rutenio F(ab')₂ (39-50) y 20 microlitros de muestra a 37°C durante 9 minutos. A continuación, se añaden micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina y se incuban la muestra durante 9 minutos más. Tras esta segunda incubación, se transfiere la mezcla de incubación a la celda de medición del sistema donde las perlas son capturadas magnéticamente sobre la superficie de un electrodo. El marcador no unido se elimina mediante el lavado de la celda de medición con tampón.

En la última etapa, se aplica voltaje al electrodo en presencia de un tampón que contiene tri-propilamina y se registra la señal electroquimioluminiscente resultante con un fotomultiplicador. Todos los reactivos y muestras se manejan de manera completamente automatizada por el instrumento Elecsys®. Los resultados se determinan mediante una curva de calibración específica del instrumento generada por una calibración de 2 puntos y una curva maestra proporcionada a través del código de barras del reactivo. La prueba se realiza según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2:

Obtención de las muestras:

Se recoge la sangre para el análisis de péptidos tipo BNP en tubos EDTA con 5.000 U de aprotinina (Trasylo1, Beyer, Alemania) y tubos de heparina-litio (para determinaciones de química clínica), según proceda. Las muestras de sangre y orina se centrifugan inmediatamente durante 10 minutos a 3.400 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se almacenan a -80°C hasta su análisis.

Ejemplo 3

Objetivo:

El estudio CREATE es un estudio abierto, aleatorizado, de grupos paralelos, multicéntrico diseñado para investigar el efecto de la corrección precoz de la anemia con epoetina beta sobre la reducción del riesgo cardiovascular en pacientes con anemia renal crónica que no se hallan bajo tratamiento sustitutivo renal. El objetivo primario del estudio era investigar el efecto del tratamiento precoz con epoetina beta para alcanzar una hemoglobina (Hb) objetivo entre 13 y 15 g/dl sobre la morbilidad cardiovascular y comparar estos efectos con los conseguidos con el tratamiento con epoetina beta para mantener un nivel de Hb objetivo entre 10,5 y 11,5 g/dl.

Método

La variable de resultado principal era una variable de resultado combinada de todos los eventos cardiovasculares especificados por protocolo (tiempo hasta el primer evento): angina que conlleva hospitalización durante al menos 24 horas o prolongación de una hospitalización, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio fatal o no fatal, accidente vascular cerebral fatal o no fatal, muerte súbita, accidente vascular cerebral transitorio (TIA), enfermedad vascular periférica (amputación, necrosis), arritmias cardíacas que conlleven hospitalización durante al menos 24 horas o prolongación de una hospitalización.

Variables secundarias:

- mortalidad cardiovascular, mortalidad total, insuficiencia cardíaca crónica (clasificación NHYA), intervenciones cardiovasculares: tiempo hasta el primer evento y frecuencia de los episodios
- ingresos hospitalarios y duración de las hospitalizaciones por causas cardiovasculares
- índice de masa ventricular izquierda, volumen ventricular izquierdo, fracción de eyección ventricular izquierda, acortamiento miocárdico fraccional
- calidad de vida (cuestionario SF-36)

En el sub-estudio NT-proBNP se realizaron determinaciones de laboratorio adicionales al inicio, y a los 6, 12, 24, 36 y 48 meses en un subgrupo de pacientes del estudio CREATE. Las determinaciones realizadas fueron NT-proBNP y otras determinaciones de laboratorio.

Se siguió la aparición de eventos adversos de toda la cohorte del estudio, incluyendo los eventos adversos cardiovasculares (CV). Todos los eventos CV fueron clasificados por profesionales del equipo de seguridad de fármacos de Roche según las categorías MedDRA (Diccionario Médico para Actividades Regulatoras). Los eventos cardíacos comprenden eventos específicos como angina, arritmias, insuficiencia cardíaca aguda y crónica, infarto de miocardio, bradicardia y taquicardia. Los eventos cardiovasculares contienen además eventos relacionados con el sistema vascular como la hipertensión, la hipotensión, la enfermedad vascular periférica o la trombosis venosa profunda. Es característico de los registros de eventos adversos que se incluyan también como eventos cardiovasculares alteraciones no específicas tales como palpitaciones o enrojecimiento.

Análisis:

En un primer análisis preliminar se estratificaron los niveles de NT-proBNP de 266 pacientes de la población del estudio CREATE en los 2 grupos de tratamiento ("Hb alta" = valor objetivo de Hb 13-15 g/dl y "Hb baja" = valor objetivo de Hb 10,5-11,5 g/dl). Además, los grupos se dividieron según la mediana preliminar de NT-proBNP de toda la cohorte (> y < 400 pg/ml). Se realizó la curva de Kaplan-Meier del tiempo hasta el primer evento cardíaco tal como define la variable de resultado primaria del estudio (por ejemplo, fracción de la población que no ha presentado este evento en concreto) figura 1. Se calcularon las razones de riesgo (es decir, el factor por el cual el riesgo correspondiente aumenta o disminuye) y se consideraron significativos valores p <0,05. De igual modo, se generaron las curvas de Kaplan-Meier para el primer evento adverso cardíaco y cardiovascular (figuras 2 y 3).

Resultados preliminares:

En la tabla siguiente se muestra una visión general de las tasas de incidencia (ignorando el momento de los eventos) de los 2 grupos de tratamiento:

	Evento adverso CV		Variable de resultado primaria CV	
	NT-proBNP <400	NT-proBNP ≥400	NT-proBNP <400	NT-proBNP ≥400
Hb baja	47%	49%	11%	21%
Hb alta	40%	68%	11%	35%

En el grupo de pacientes con niveles basales de NT-proBNP inferiores a 400 pg/ml no se observaron diferencias en la incidencia en cuanto a *variable de riesgo CV* o *eventos adversos cardiovasculares* entre los 2 grupos de tratamiento, mientras que aquellos con valores basales superiores a 400 pg/ml mostraron incidencias superiores en particular en el grupo "Hb alta". Un análisis más pormenorizado mediante métodos "tiempo hasta el evento" demostraron un incremento del riesgo significativamente estadístico de presentar la *variable de resultado cardiovascular primaria* en el grupo "Hb alta" (> de 3,7 veces) y una tendencia potente en el grupo "Hb baja" cercana a la significación estadística (figura 1).

Los pacientes con valores superiores a 400 pg/ml en comparación con aquellos con valores inferiores a 400 pg/ml presentaron de forma estadísticamente significativa más *eventos cardíacos* en ambos grupos de estrategia terapéutica con una razón de riesgo mayor en el grupo "Hb alta" (figura 2). En el caso de los *eventos adversos cardiovasculares* el riesgo fue significativamente superior en el grupo tratado con la estrategia del valor objetivo alto

que en la estrategia de valor objetivo bajo (grupo de pacientes con valores basales >400 pg/ml) (figura 3). Los resultados del análisis del riesgo de la *variable de riesgo primaria* y los *eventos adversos cardiovasculares* se resumen en el diagrama de bosque (forest plot), que muestra las tasas de riesgo estimadas con los intervalos de confianza.

5

Conclusión:

Los resultados preliminares indican que el NT-proBNP puede identificar una población de pacientes (niveles basales inferiores a 400 pg/ml) dentro de la población del estudio CREATE que puede ser tratada de forma segura con epoetina beta con la estrategia de Hb objetivo baja y alta. En pacientes con niveles de NT-proBNP basales superiores a 400 pg/ml el marcador identifica un grupo de pacientes con mayor riesgo de eventos cardíacos y cardiovasculares. El punto de corte de 400 pg/ml es una opción preliminar y existe la posibilidad de otras opciones dependiendo de la situación de decisión clínica. Está indicado un análisis de riesgo y beneficio cuidadoso particularmente para la estrategia de Hb alta, incluyendo una estrecha monitorización del estado CV en esta estrategia terapéutica.

10

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el diagnóstico del riesgo de un paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento futuro con un agente estimulador de la eritropoyesis (ESA), que comprende las etapas de
 - a) determinar el nivel de un péptido tipo BNP en una muestra del paciente,
 - b) diagnosticar dicho riesgo comparando el nivel medido del péptido tipo BNP o de una variante del mismo respecto al menos un nivel de referencia.
- 10 2. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa a) y/o la etapa b) se realizan antes de iniciar el tratamiento con el ESA y/o cuando el paciente no ha recibido todavía el tratamiento con un ESA.
- 15 3. Método, según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el péptido tipo BNP es BNP o NT-proBNP.
4. Método, según la reivindicación 3, en el que el péptido tipo BNP es NT-proBNP.
- 20 5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el nivel de referencia corresponde a un nivel plasmático de NT-proBNP entre 300 y 500 pg/ml.
6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que un nivel medido superior al nivel de referencia anterior indica un incremento del riesgo.
- 25 7. Método, según la reivindicación 6, en el que el incremento del riesgo se refiere a un incremento de al menos 1,5 veces en comparación con el riesgo de un paciente medio, preferentemente de un paciente medio de la misma edad, sexo y enfermedad que provoca la anemia.
- 30 8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que el incremento del riesgo indica que el paciente no debería ser tratado con un ESA a dosis altas, correspondiendo las dosis altas de ESA a una dosis suficiente para alcanzar una concentración de hemoglobina en sangre de al menos 14 g/dl.
- 35 9. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el ESA se selecciona del grupo formado por (a) eritropoyetina aislada de la orina, (b) epoetina beta, (c) epoetina delta, (e) epoetina omega, (f) darbepoetina alfa y (g) Cera.
- 40 10. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la complicación cardiovascular en una enfermedad cardíaca coronaria, un síndrome coronario agudo, un infarto de miocardio, una disfunción ventricular izquierda, una insuficiencia cardíaca congestiva o una trombosis.
- 45 11. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el nivel del péptido tipo BNP se determina utilizando un ligando de unión específica, preferentemente un anticuerpo o un aptámero.
12. Utilización de un medio diagnóstico para diagnosticar el riesgo de un paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento futuro con un ESA mediante la determinación in vitro del nivel de un péptido tipo BNP del paciente, particularmente NT-proBNP.
- 50 13. Utilización de un kit para el diagnóstico del riesgo de un paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento futuro con un ESA mediante la determinación in vitro del nivel de un péptido tipo BNP del paciente, particularmente NT-proBNP, comprendiendo dicho kit medios capaces de determinar in vitro el nivel de un péptido tipo BNP del paciente, particularmente NT-proBNP.
- 55 14. Utilización de un dispositivo para el diagnóstico del riesgo de un paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia de un tratamiento futuro con un ESA mediante la determinación in vitro del nivel de un péptido tipo BNP del paciente, particularmente NT-proBNP, comprendiendo dicho dispositivo
 - (a) medios para determinar la cantidad de un péptido tipo BNP en una muestra del paciente; y
 - (b) medios para diagnosticar dicho riesgo comparando el nivel medido con un nivel de referencia.
- 60 15. Método para decidir sobre el tratamiento futuro con un ESA en un paciente, particularmente con una dosis alta de un ESA, que comprende las etapas de
 - (a) determinar, in vitro, el nivel de un péptido tipo BNP,
 - (b) diagnosticar el riesgo del paciente de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento planificado comparando el nivel medido del péptido tipo BNP o una variante del mismo con al menos un nivel de referencia,
 - (c) opcionalmente, iniciar una exploración del paciente por un cardiólogo,
- 65

(d) recomendar abstenerse del tratamiento con ESA o recomendar solamente tratamiento con una dosis baja de ESA si el método indica un incremento del riesgo de presentar una complicación cardiovascular como consecuencia del tratamiento con un ESA.

Fig. 1

Gráfico de Kaplan-Meier del tiempo hasta un evento cardíaco — Pacientes con NT-proBNP </> = 400

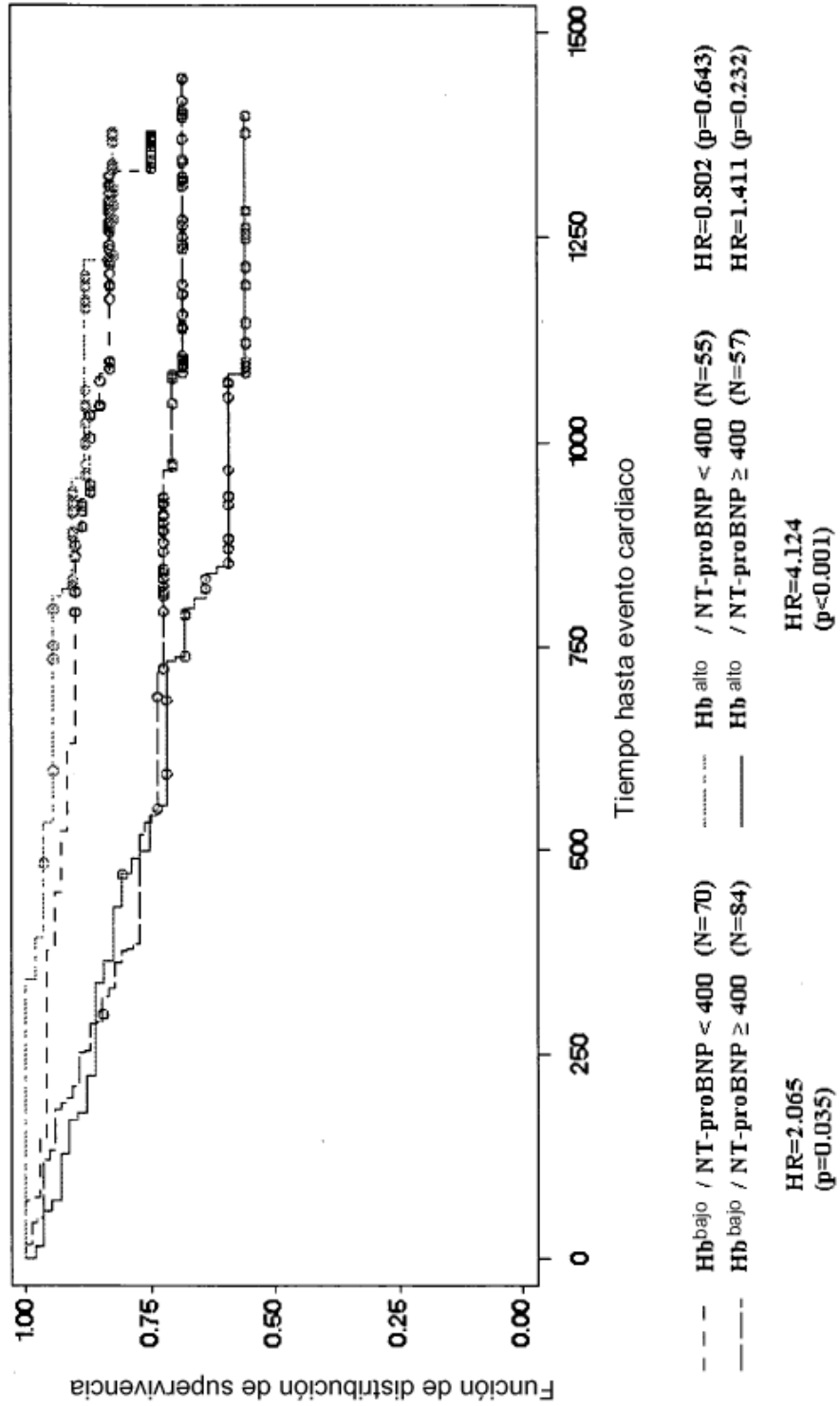


Fig. 2

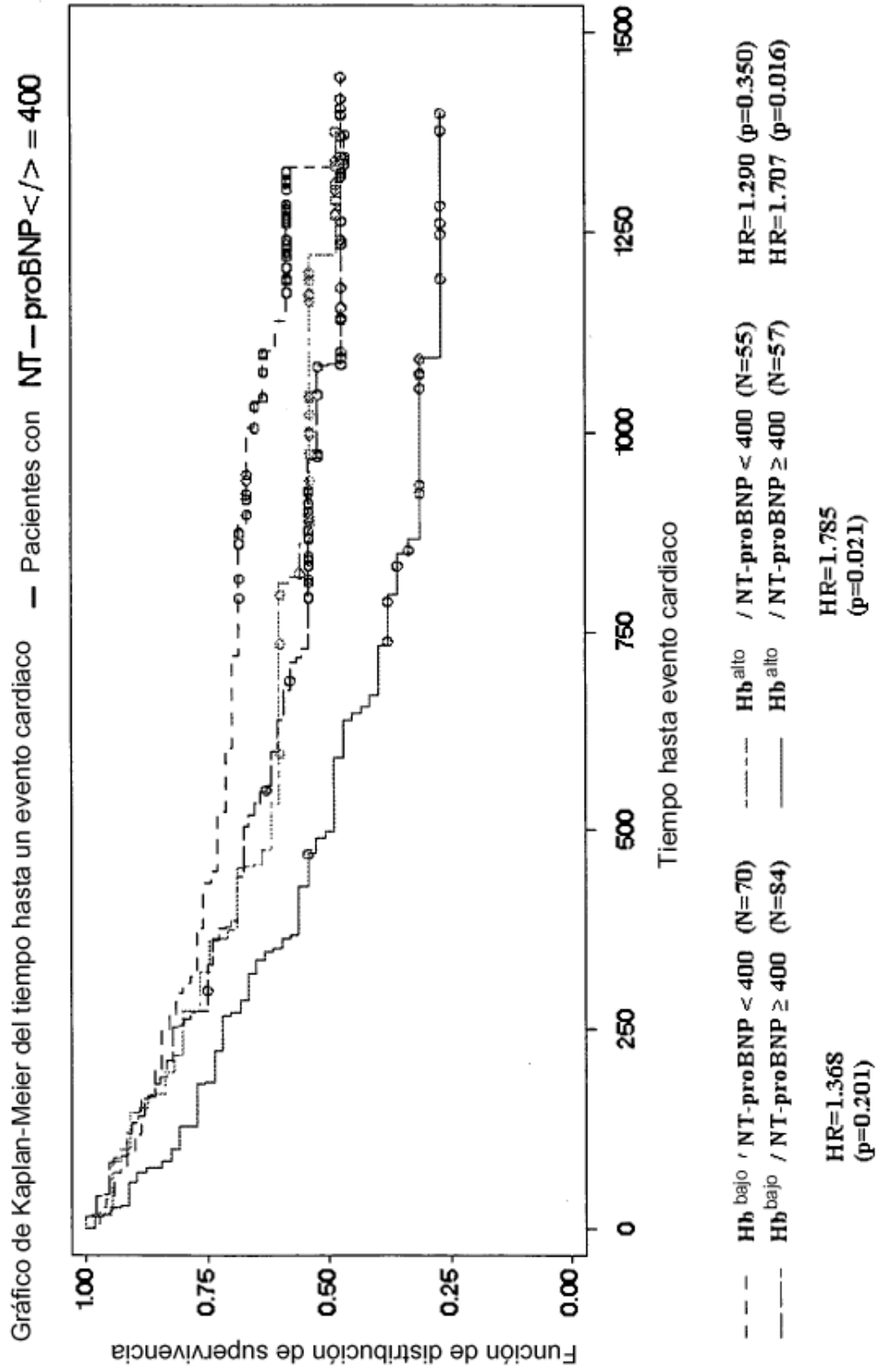


Fig. 3

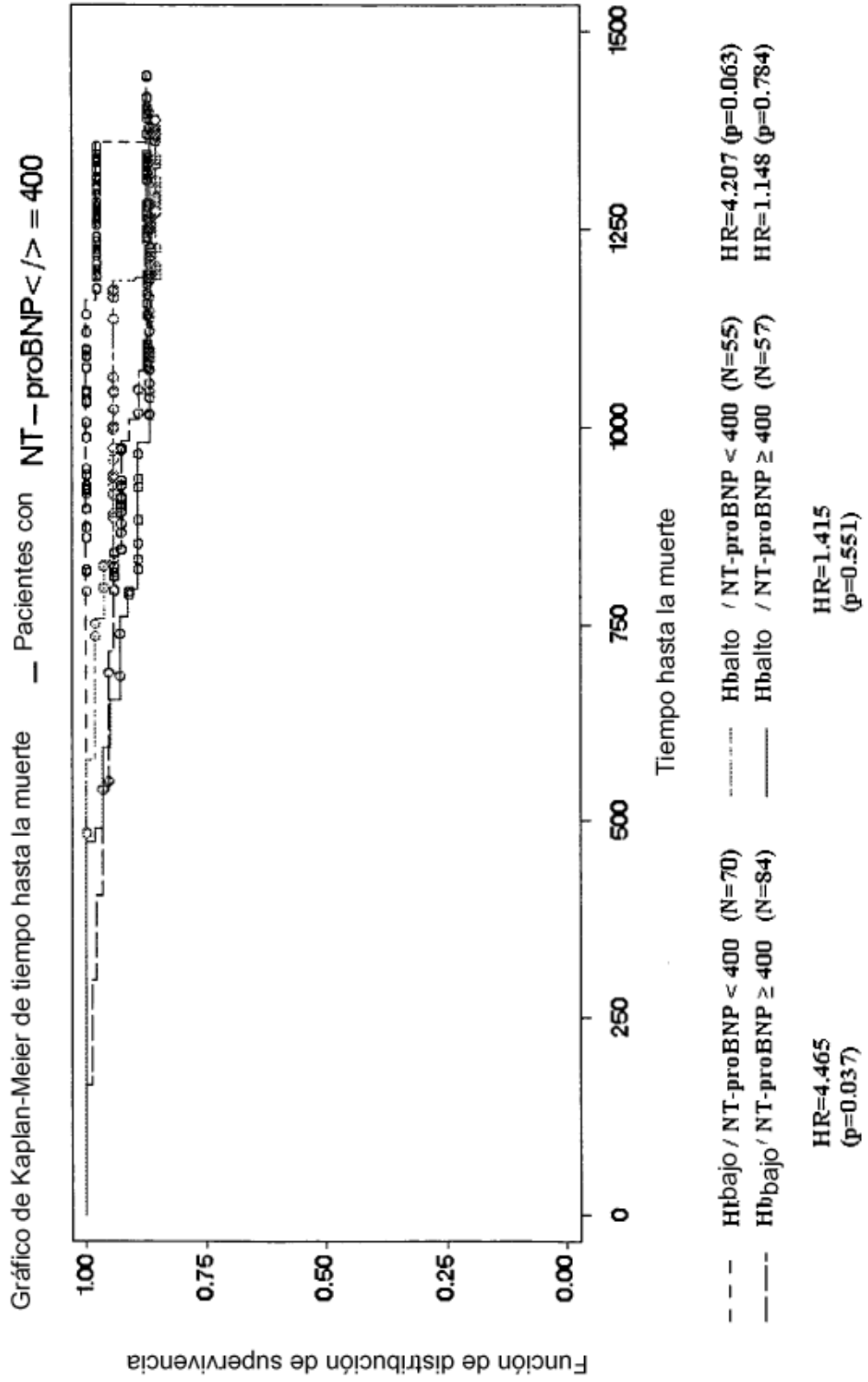


Fig. 4

