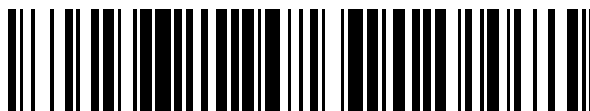


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 711**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07856143 .8**
- 96 Fecha de presentación: **20.12.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2111552**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.2009**

54 Título: **Diagnóstico y estratificación de riesgos mediante el nuevo marcador CT-proADM**

30 Prioridad:
20.12.2006 DE 102006060112

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.06.2012

73 Titular/es:
B.R.A.H.M.S. Gmbh
NEUENDORFSTRASSE 25
16761 HENNIGSDORF, DE

72 Inventor/es:
BERGMANN, Andreas y
STRUCK, Joachim

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 383 711 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

Diagnóstico y estratificación de riesgos mediante el nuevo marcador CT-proADM.

5 La invención se refiere a un nuevo marcador diagnóstico CT-proADM (fragmento C-terminal del preproADM, SEC ID nº 1) para el diagnóstico y/o la estratificación del riesgo de enfermedades. Además, se refiere a un procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación del riesgo de enfermedades, en particular de enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias, llevándose a cabo una determinación del marcador CT-proADM (SEC ID nº 1) o de dicho marcador contenido en
10 una combinación de marcadores (panel, cluster) en un paciente a examinar. Además, la invención se refiere a un dispositivo diagnóstico y a un kit para llevar a cabo el procedimiento.

El análisis de proadrenomedullin (proADM) y adrenomedullin en el diagnóstico se ha descrito en el estado de la técnica (EP 0622458 B1, Lewis LK, Smith MW, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG, Adrenomedullin (1-52) measured in human plasma by radioimmunoassay: plasma concentration, adsorption, and storage, Clin Chem 1998, 44:571-7; Ueda S, Nishio K, Minamino N, Kubo A, Akai Y, Kangawa K *et al.*, Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome, Am J Respir Crit Care Med 1999, 160:132-6; Kobayashi K, Kitamura K, Etoh T, Nagatomo Y, Takenaga M, Ishikawa T *et al.*, Increased plasma adrenomedullin levels in chronic congestive heart failure, Am Heart J 1996, 131:994-8; Kobayashi K, Kitamura K, Hirayama N, Date H, Kashiwagi T, Ikushinma I *et al.*, Increased plasma adrenomedullin in acute myocardial infarction, Am Heart J 1996, 131:676-80), en particular a fines del diagnóstico de sepsis (EP 1121600 B1). Fragmentos N-terminales de (pre)proadrenomedullin para el diagnóstico se han descrito también en el documento EP 0622458 B1, tal como PAMP (Hashida S, Kitamura K, Nagatomo Y, Shibata Y, Imamura T, Yamada K *et al.*, Development of an ultrasensitive enzyme immunoassay for human proadrenomedullin N-terminal 20 peptide and direct measurement of two molecular forms of PAMP in plasma from healthy subjects and patients with cardiovascular disease, Clin Biochem 2004; 37:14-21).
15
20
25

Además, otro fragmento de proadrenomedullin, el denominado mid-regional proadrenomodullin (MR-proADM), es conocido por el documento EP 1488209 B1 para fines diagnósticos (Struck J, Tao C, Morgenthaler NG, Bergmann A, Identification of an Adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients, Peptides 2004, 25:1369-72; Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A, Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay, Clin Chem 2005, 51:1823-9; Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Stolz D, Muller C, Bingisser R, Harbarth S *et al.*, Proadrenomedullin to predict severity and outcome in community-acquired pneumonia [ISRCTN 04176397], Crit. Care 2006, 10:R96; Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Muller B, Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study, Crit Care 2005, 9:R816-24).
30
35

Sin embargo, existe una alta demanda para formular un diagnóstico seguro para enfermedades, en particular enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias o realizar una estratificación (del riesgo), en particular con relación a decisiones clínicas adicionales y en particular la gravedad de enfermedades, en particular para las enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias.
40

El objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo marcador.
45

Otro objetivo de la presente invención radica en proporcionar un procedimiento mejorado para el diagnóstico y/o estratificación del riesgo de enfermedades, en particular enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias.

Dicho objetivo se consigue por un lado proporcionando un marcador diagnóstico CT-proADM (proadrenomedullin C-terminal, SEC ID nº 1) y por otro lado mediante un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* y/o la estratificación del riesgo de enfermedades, llevándose a cabo un análisis del marcador CT-proADM (SEC ID nº 1) o de un péptido parcial o fragmente del mismo o de dicho marcador contenido en una combinación de marcadores (panel, cluster) en un paciente a examinar (de aquí en adelante procedimiento según la invención).
50
55

El término "estratificación del riesgo" comprende, según la invención, encontrar pacientes enfermos con un peor pronóstico, con el fin de realizar un diagnóstico más intenso y una terapia/tratamiento (subsiguiente) de una enfermedad a fines de conseguir el transcurso más favorable posible de la enfermedad.

Por tanto, mediante el procedimiento según la invención, puede realizarse de forma particularmente ventajosa un diagnóstico y/o estratificación del riesgo seguro. El procedimiento según la invención permite decisiones clínicas que producen un diagnóstico más rápido. Las decisiones clínicas de este tipo comprenden también el tratamiento posterior por medio de medicamentos para el tratamiento o terapia de enfermedades.
60

Por tanto, la invención se refiere también a un procedimiento para la estratificación del riesgo de pacientes, en particular para la estratificación de pacientes para decisiones clínicas, preferentemente en la medicina de cuidados intensivos crítica con relación al tiempo o la medicina de urgencias y para la hospitalización de pacientes.

5 En otra forma de realización preferida del procedimiento según la invención, el diagnóstico y/o estratificación del riesgo se lleva a cabo por el pronóstico, la detección precoz y la detección por diagnóstico diferencial, la evaluación del grado de severidad y de la evaluación del transcurso de enfermedades en paralelo a la terapia.

10 En otra forma de realización del procedimiento según la invención, se extrae fluido corporal o tejido corporal del paciente a examinar, preferentemente sangre, opcionalmente sangre entera, suero o plasma disponible y el diagnóstico se lleva a cabo *in vitro/ex vivo*, es decir, fuera del cuerpo humano o animal. El diagnóstico y/o estratificación del riesgo puede realizarse mediante el análisis del marcador CT-proADM (SEC ID nº 1) y a base de su cantidad presente en por lo menos un paciente de muestra.

15 Para los fines de la presente invención, por “enfermedades” se entienden enfermedades del ser humano o del animal, en particular mamífero. Las enfermedades de este tipo, en particular las enfermedades humanas, se han descrito en Pschyrembel, de Gruyter, Berlín 2004.

20 Sin embargo, de forma particularmente ventajosa para los fines de la presente invención, pueden diagnosticarse y/o estratificarse enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias.

25 El término “enfermedades cardiovasculares” comprende, según la invención, todas las enfermedades del corazón y de la circulación sanguínea, en particular las indicaciones tales como hipertensión, enfermedades cardíacas coronarias, en particular el síndrome coronario agudo, el infarto de miocardio (agudo), angina pectoris.

30 El término “síndrome coronaria agudo” comprende fases diferentes de la enfermedad cardíaca coronaria que conllevan un alto riesgo de muerte. Esto concierne en particular a la medicina de urgencias con relación a un infarto de miocardio agudo y/o angina pectoris así como a una muerte cardíaca repentina. Además del infarto de miocardio agudo, que está definido según los criterios de la OMS (WHO (1979): Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease, Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature, Circulation 59 (3): 607-609) como un evento de dolor de pecho agudo, que dura más de 20 minutos, asociado a elevaciones del segmento ST y/o a un aumento de enzimas miocárdicas, se acuñó el término de angina pectoris inestable (AP), que puede consultarse según la invención en “akutes Koronarsyndrom” (síndrome coronario agudo) (Hamm CW: Leitlinien: Akutes Kononarsyndrom (ACS) - Teil 1: ACS ohne persistierende ST-Hebung, Z Kardiologie (2004) 93:72-90).

35 Para los fines de la presente invención, por “insuficiencia cardíaca” se entiende una incapacidad aguda o crónica del corazón de suministrar una cantidad suficiente de sangre y a consecuencia una cantidad suficiente de oxígeno al tejido, para asegurar el metabolismo del tejido en fase de reposo o bajo esfuerzo. Clínicamente, existe una insuficiencia cardíaca si síntomas típicos (disnea, cansancio, retención de líquido) están presentes, cuyas causas se basan en un desorden funcional en el sentido de un desorden funcional sistólico o diastólico. Según la invención, la insuficiencia cardíaca crónica (CHF) también está comprendida (Kardiologie compact, editado por Christian Mewis, Reimer Riessen y Ioakim Spyridopoulos, 2ª Edición no modificada, Thieme 2006). Las causas de una insuficiencia cardíaca pueden ser: un defecto cardíaco valvular (por ejemplo como consecuencia tardía de fiebre reumática), miocarditis (inflamación del músculo cardíaco), arritmias cardíacas, infarto cardíaco, además de tensión sanguínea demasiado alta y/o arteriosclerosis (calcificación) de los vasos cardíacos coronarios (enfermedad cardíaca coronaria). La invención también comprende la enfermedad cardíaca hipertensiva con insuficiencia cardíaca (congestiva), la enfermedad cardíaca y renal con insuficiencia cardíaca (congestiva), insuficiencia cardíaca del ventrículo derecho primaria, insuficiencia cardíaca del ventrículo derecho secundaria, insuficiencia cardíaca del ventrículo izquierdo asintomática (NYHA estadio I), insuficiencia cardíaca del ventrículo izquierdo sintomática a un esfuerzo más elevado (NYHA estadio II), insuficiencia cardíaca del ventrículo izquierdo a un esfuerzo más ligero (NYHA estadio III), insuficiencia cardíaca del ventrículo izquierdo sintomática en reposo (NYHA estadio IV) y shock cardiogénico.

40 Para los fines de la presente invención, por el término “infecciones de los pulmones y de las vías respiratorias” se entienden en particular las infecciones causadas por bacterias, virus, hongos o parásitos, por ejemplo indicaciones tales como la infección de las vías respiratorias profundas (LRTI: infecciones de las vías respiratorias inferiores), bronquitis, neumonía, sarcoidosis, bronquiectasias, edema pulmonar no cardiogénico.

60 Según la invención, se prefieren además la infección de las vías respiratorias profundas (LRTI: infecciones de las vías respiratorias inferiores), bronquitis, bronquitis pútrida, neumonía. Se prefiere en particular la neumonía, en particular la neumonía asociada a la comunidad (CAP: community associated pneumonia), la infección de las vías respiratorias profundas (LRTI: infecciones de las vías respiratorias inferiores).

Para los fines de la presente invención, por “neumonía” (inflamación pulmonar) se entiende una inflamación aguda o crónica del tejido pulmonar y su infección causada por bacterias, virus u hongos, raramente también por causas tóxicas por inhalación de sustancias tóxicas o por causas inmunológicas. Para los clínicos, la neumonía es una constelación de síntomas distintos (fiebre o hipotermia, escalofríos, tos, dolor de tórax pleurítico, producción de esputo elevada, frecuencia respiratoria elevada, atenuación del sonido de percusión, respiración bronquial, sonidos crepitantes cerca de la oreja, roce pleural) en combinación con por lo menos un infiltrado reconocible en la imagen de radiografía del tórax (Harrisons Innere Medizin, editado por Manfred Dietel, Norbert Suttrop y Martin Zeitz, ABW Wissenschaftsverlag 2005).

Para los fines de la presente invención, por el término “enfermedades de inflamación de los pulmones y de las vías respiratorias” o “enfermedades inflamatorias de los pulmones y de las vías respiratorias” se entienden las indicaciones tales como enfermedades pulmonares intersticiales y fibrosis pulmonar, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), en particular las exacerbaciones infecciosas EPOC, asma bronquial, en particular exacerbaciones infecciosas en el asma bronquial, carcinoma bronquial.

Según la invención, EPOC denomina un grupo de enfermedades crónicas que están caracterizadas por tos, esputo elevado y disnea bajo esfuerzo. En primer lugar, pueden citarse la bronquitis crónica-obstructiva y el enfisema pulmonar. Ambos cuadros clínicos están caracterizados porque está obstruida en particular la espiración. Una denominación coloquial para el síndrome principal del EPOC es además la “tos de fumador”. La invención resulta ser particularmente ventajosa para las exacerbaciones agudas.

Para los fines de la presente invención, por “CT-proADM” se entiende una proteína humana libre o un polipéptido constituido por 33 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos – SEC ID nº 1:

SLPEAGPGRTLVSSKPAHQAGAPPPSGSAPHFL – o un fragmento con la secuencia de aminoácidos de 153-185 (la posición 153 es Ser, la posición 185 es Leu) de SEC ID nº 2 (Figura 1) de preproadrenomedullin (Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T, Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin, Biochem Biophys Res Commun 1993, 194:720-725). Fragmentos de este tipo pueden ser por ejemplo las secuencias de aminoácidos 1-15 de SEC ID nº 1 ó 153-167 de preproadrenomedullin (Figura 1) ó 19-33 de SEC ID nº 1 ó 171-185 de preproadrenomedullin (Figura 1) (ver los ejemplos). Debido a su efecto vasoconstrictor, CT-proADM se denomina también como adrenotensin (Gumusel B, Chang JK, Hyman A, Lipton H, Adrenotensin: An ADM gene product with the opposite effects of ADM, Life Sci 1995, 57: PL87-90).

Además, el “CT-proADM” según la invención puede presentar modificaciones, tales como glicosilación, lip(o)idación o formación de derivados.

En otra forma de realización, la determinación de “CT-proADM” (SEC ID nº 1) puede realizarse adicionalmente con otros marcadores, estando contenido el “CT-proADM” en una combinación de marcadores (panel, cluster), preferentemente con los que ya indican una enfermedad. Sin embargo, se prefieren los marcadores que por su parte indican las indicaciones/enfermedades preferidas según la invención y pueden provocar un efecto sinérgico.

Por tanto, la invención se refiere a una forma de realización del procedimiento según la invención en el que la determinación se realiza adicionalmente con por lo menos un marcador adicional seleccionado entre el grupo constituido por marcadores inflamatorios, marcadores cardiovasculares, marcadores neurohormonales o marcadores isquémicos en un paciente a examinar.

Según la invención, el marcador inflamatorio puede haberse seleccionado entre por lo menos un marcador del grupo constituido por proteínas C-reativas (CRP), citocinas, tal como por ejemplo TNF-alfa, interleucinas, tal como por ejemplo IL-6, procalcitonina (1-116, 3-116) y moléculas de adhesión, tales como VCAM o ICAM y el marcador cardiovascular puede haberse seleccionado entre por lo menos un marcador del grupo constituido por creatina cinasa, mieloperoxidasa, coceptina, mioglobina, proteína natriurética, en particular ANP (o ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o una secuencia parcial de cada uno, troponina cardíaca, CRP. Además, por este término se entienden también (pro)hormonas reguladoras de la circulación, en particular tales como el péptido liberador de pro-gastrina (proGRP), pro-endotelina (proEnd), pro-leptina, pro-neuropéptido Y, pro-somatostatina, pro-neuropéptido YY, pro-opiomelanocortina, coceptina o una secuencia parcial de cada uno.

El marcador isquémico puede haberse seleccionado entre por lo menos un marcador del grupo constituido por troponina I y T, CK-MB. Adicionalmente, el marcador neurohormonal puede ser por lo menos una proteína natriurética, en particular ANP (o ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o una secuencia parcial de cada uno.

Se prefieren en particular las combinaciones de marcadores de CT-proADM con una prohormona, en particular proBNP, NT-proBNP.

En otra forma de realización de la invención, el procedimiento según la invención puede llevarse a cabo mediante determinaciones paralelas o simultáneas de los marcadores (por ejemplo placas de multitítulo con 96 y más pozos, llevándose a cabo las determinaciones en por lo menos un paciente de muestra.

5 Además, el procedimiento según la invención y sus determinaciones pueden llevarse a cabo en un analizador automático, en particular por medio de un Kryptor (<http://www.kryptor.net/>).

10 En otra forma de realización, el procedimiento según la invención y sus determinaciones pueden llevarse a cabo por medio de una prueba rápida (por ejemplo prueba de flujo lateral), o bien en una determinación de parámetro individual o de parámetros múltiples.

15 Además, la invención se refiere a la utilización de CT-proADM (SEC ID nº 1) para el diagnóstico *in vitro* y/o la estratificación del riesgo de enfermedades, en particular de enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la utilización de CT-proADM (SEC ID nº 1) para el diagnóstico cardíaco *in vivo*.

20 Además, la invención se refiere a la utilización de CT-proADM (SEC ID nº 1) o CT-proADM contenido en una combinación de marcadores (panel, cluster) para el diagnóstico *in vitro* y/o estratificación del riesgo de enfermedades, en particular de enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias, así como teniendo en cuenta en particular las formas de realización citadas anteriormente. La combinación de marcadores puede contener, si se desea, otro marcador adecuado.

25 Otro objetivo es proporcionar un dispositivo diagnóstico adecuado o la utilización de un dispositivo de este tipo para llevar a cabo el procedimiento según la invención.

30 Para los fines de la presente invención, por un dispositivo diagnóstico de este tipo se entiende en particular una matriz o ensayo (por ejemplo ensayo inmunológico, ELISA, etc.), en el sentido más amplio un dispositivo para llevar a cabo el procedimiento según la invención.

35 La invención se refiere además a un kit o a la utilización de un kit de este tipo para el diagnóstico *in vitro* y/o estratificación del riesgo de enfermedades, en particular de enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias, llevándose a cabo una determinación de CT-proADM (SEC ID nº 1) o CT-proADM contenido en una combinación de marcadores (panel, cluster) en un paciente a examinar, teniendo en cuenta en particular las formas de realización citadas anteriormente. Los reactivos de detección de este tipo comprenden por ejemplo anticuerpos, etc.

40 Por tanto, la invención se refiere también a anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales para la detección de CT-proADM, que unen CT-proADM individualmente, uno independientemente de los otros, preferentemente a los sitios de unión 1-15 ó 19-33 de SEQ ID. No. 1 o a un sitio de unión de los dos o a ambos sitios de unión.

45 Los siguientes ejemplos y figuras sirven para ilustrar la invención con mayor detalle, pero sin limitar la invención a dichos ejemplos y figuras.

Ejemplos:

50 Ensayo inmunológico

Síntesis de péptidos

55 Derivadas de la secuencia de aminoácidos conocida de preproADM, dos áreas fueron seleccionadas (pos. 153-167, 171-185). Las áreas, cada una suplementada por un radical de cisteína N-terminal, se sintetizaron por vía química según métodos estándares como péptidos solubles, se purificaron, se controlaron con relación a su calidad mediante espectrometría de masas y Reversed Phase HPLC y se liofilizaron en partes alícuotas (empresa JPT, Berlín, Alemania). Las secuencias de aminoácidos de los péptidos eran las siguientes:

60 PSK16 CSLPEAGPGRTLVSSEK pos. 153-167
PHL16 CHGAPAPPSGSAPHFL pos. 171-185

Además, se sintetizó un péptido que cubre el área de las posiciones 153-185 de preproADM (PSL33 SLPEAGPGRTLVSSEKPAHGAPAPPSGSAPHFL).

65

Conjugación e inmunización

Los péptidos PSK16 y PHL16 se conjugaron con la proteína portadora KLH (keyhole limpet hemocyanin) por medio de MBS (m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) (ver las instrucciones de trabajo "NHS-Maleimide Crosslinkers" empresa PIERCE, Rockford, IL, EE.UU.). Dichos conjugados se utilizaron para inmunizar ovejas según el siguiente esquema: Inicialmente, cada oveja recibió 100 µg de conjugado (cantidad de peso, relativo al contenido en péptido del conjugado) y, a continuación, 50 µg de conjugado cada 4 semanas (cantidad de peso, relativo al contenido en péptido del conjugado). Comenzando con el cuarto mes después de iniciar la inmunización, se extrajeron 700 ml de sangre de cada oveja y a partir de la misma, se obtuvo antisuero por centrifugación. Las conjugaciones, inmunizaciones y la obtención de antisueros fueron realizadas por la empresa MicroPharm, Carmarthenshire, R.U.

Purificación de los anticuerpos

En un procedimiento de una etapa, a partir de los antisueros que se habían obtenido, comenzando con el cuarto mes después de la inmunización, se prepararon los anticuerpos específicos para los péptidos.

A tal fin, en primer lugar se acoplaron los péptidos PSK16 y PHL16 al gel SulfoLink (ver instrucciones de trabajo "SulfoLink Kit", empresa PIERCE, Rockford, IL, EE.UU.). Para el acoplamiento, se utilizaron 5 mg de cada péptido por 5 ml de gel.

La purificación por afinidad de los anticuerpos específicos para péptidos obtenidos de los antisueros de oveja contra los péptidos se realizó de la siguiente manera:

En primer lugar, las columnas de péptidos se lavaron tres veces alternamente con 10 ml de tampón de elución (ácido cítrico 50 mM, pH 2,2) y de tampón de unión (fosfato sódico 100 mM, Tween al 1%, pH 6,8) cada uno. 100 ml de los antisueros se filtraron con un filtro de 0,2 µm, y al filtrado se adicionó el material de la columna. A tal fin, el gel se eliminó cuantitativamente de la columna, lavándolo con 10 ml de un tampón de unión. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante la noche sacudiendo la mezcla. Las preparaciones se trasladaron cuantitativamente a columnas vacías (NAP 25, Pharmacia, vaciadas). Los eluados se descartaron. A continuación, las columnas se lavaron con 250 ml de un tampón de unión hasta quedar libre de proteína (contenido en proteína del eluado de lavado < 0,02 A280 nm). A las columnas lavadas, se aplicó un tampón de elución, y se recogieron fracciones de 1 ml cada una. De cada fracción, se determinó el contenido en proteína por medio del método BCA (ver las instrucciones de trabajo empresa PIERCE, Rockford, IL, EE.UU.). Las fracciones con concentraciones de proteína de > 0,8 mg/ml se reunieron. Después de analizar las proteínas por medio del método BCA, se obtuvieron rendimientos de 34 mg para el anticuerpo anti-PSK16 y de 48 mg para el anticuerpo anti-PHL16.

Marcación

A 500 µl del anticuerpo anti-PSK16 purificado (ver arriba), se les cambió el tampón pasando el anticuerpo en 1 ml de un tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 8,0) por columnas de filtración en gel NAP-5 (Pharmacia) según las instrucciones de trabajo. La concentración de proteína de la solución de anticuerpo se ajustó en 1,5 mg/ml con un tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 8,0).

Para la marcación por quimioluminiscencia, el anticuerpo se sometió al siguiente tratamiento posterior: A 67 µl de la solución de anticuerpo, se adicionaron 10 µl de NHS-éster de acridinio MA70 (1 mg/ml; empresa HOECHST Behring), y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se adicionaron 423 µl de glicina 1 M, y la incubación se continuó durante 10 minutos más. A continuación, la preparación de marcación se pasó por una columna de filtración en gel NAP-5 (Pharmacia) en 1 ml de eluyente A (fosfato potásico 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) según las instrucciones de trabajo, liberándola de los componentes de bajo peso molecular. Para eliminar los últimos restos del marcador no unido al anticuerpo, se realizó una HPLC de filtración en gel (columna: Waters Protein Pak SW300). La muestra se aplicó y se cromatografió con el eluyente A a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Con un fotómetro de flujo, se midieron las longitudes de onda de 280 nm y 368 nm. La relación de absorción de 360nm/280 nm como medida del grado de marcación del anticuerpo era de 0,10 +/- 0,01 en el pico. Las fracciones que contenían el anticuerpo monomérico (tiempo de retención 8-10 min) fueron recogidas y reunidas en 3 ml de fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM, albúmina de suero bovino al 5%, azida sódica al 0,1%, pH 7,4.

Acoplamiento

Probetas de poliestireno de 5 ml irradiadas (empresa Greiner) se recubrieron con anticuerpos anti-PHL16 purificados de la siguiente manera: El anticuerpo se diluyó en Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8 a una concentración de 6,6 µg/ml. 300 µl de esta solución se pipetaron en cada probeta. Las probetas se incubaron a 22°C durante 20 horas. A continuación, la solución se aspiró. Entonces cada probeta se llenó con 4,2 ml de fosfato sódico 10 mM, Karion FP al 2%, albúmina de suero bovino al 0,3%, pH 6.5. Tras 20 horas, la solución se aspiró. Finalmente, las probetas se secaron en un secador al vacío.

Realización y evaluación del ensayo inmunológico

Como material estándar sirvió el péptido PSL33, que se disolvió en serie en un suero de caballo normal (empresa SIGMA). A los estándares así preparados, se les atribuyeron las concentraciones según el péptido pesado.

5 El ensayo inmunológico en sándwich se preparó de la siguiente manera: En las probetas respectivos recubiertas con anticuerpo, se pipetaron 50 µl de los estándares o muestras así como 200 µl de un tampón para ensayos (fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM, suero de albúmina bovino al 5%, IgG de oveja no específica al 0,1%, azida sódica al 0,1%, pH 7,4) que contenía 1 millón de RLU (relative light units) del anticuerpo marcado con MA70. La mezcla se
10 incubó a 22°C durante 2 horas sacudiéndola. A continuación, se lavó 4 veces con 1 ml de solución de lavado (Tween 20 al 0,1%) por probeta cada vez, se dejó drenar y se midió la quimioluminiscencia ligada a la probeta en un luminómetro (empresa BERTHOLD, LB952T; reactivos básicos BRAHMS AG). Utilizando el software MultiCalc (Spline Fit), se leyeron las concentraciones de CT-proADM de las muestras en la curva estándar.

15 El analito que puede medirse mediante el ensayo descrito se denomina proadrenomedullin C-terminal (CT-proADM).

Valor clínico

Intervalo normal

20 Las concentraciones de CT-proADM se determinaron en muestras de personas de control sanos (n=200). El valor medio era de 77,6 pmol/L, el valor mínimo medido de 46,6, el valor máximo de 136,2 pmol/L, los porcentajes del 95% eran de 58,6 y 113,8 pmol/L, respectivamente.

25 Insuficiencia cardíaca/gravedad

Se midieron las concentraciones de CT-proADM en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica o aguda descompensada. Las concentraciones de CT-proADM se asociaron a la gravedad de la insuficiencia cardíaca: Los valores medios de las concentraciones de CT-proADM en las cuatro categorías de gravedad NYHA I-IV eran de: 85,
30 107, 140,4 y 242,7 pmol/L, respectivamente (ver la Fig. 2).

Insuficiencia cardíaca crónica/diagnóstico

35 De un colectivo de 316 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica así como de 200 controles sanos, se determinaron los valores de CT-proADM. El análisis de los "Receiver Operator Characteristics" dio un AUC (área bajo la curva) de 0,79. A un valor límite (cut-off) de 122 pmol/L, la sensibilidad era de un 39,7% a una especificidad de un 98%. A un valor límite (cut-off) de 113 pmol/L, la sensibilidad era de un 46,3% a una especificidad de un 95%.

Insuficiencia cardíaca crónica/pronóstico

40 De un colectivo de 316 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, se determinaron los valores de CT-proADM. Los pacientes fueron observados durante un espacio medio de 360 días. Durante dicho espacio, murieron 42 pacientes, y sobrevivieron 274. Por medio de un análisis de los "Receiver Operator Characteristics", se determinó el mejor valor límite (cut-off) (definido como el mayor producto de la sensibilidad multiplicada por la especificidad) para
45 el pronóstico de la mortalidad: 119,7 pmol/L. A este valor límite (cut-off), la sensibilidad del pronóstico era de un 73,2%, la especificidad era de un 62,2%. A un valor límite (cut-off) de 119,7 pmol/L, la relación de probabilidad (Likelihood Ratio) de morir era de 1,9.

	< 119,7 pmol/L	> 119,7 pmol/L
Sobrevivientes	172	103
Muertos	11	30

50 Insuficiencia cardíaca aguda/diagnóstico

De un colectivo de 125 pacientes con disnea aguda, se determinaron los valores de CT-proADM. De los 125 pacientes, 69 pacientes presentaban insuficiencia cardíaca. El análisis de los "Receiver Operator Characteristics" para el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardíaca dio un AUC (área bajo la curva) de 0,75. A un valor límite (cut-off) de 410 pmol/L, la sensibilidad era de un 12,4% a una especificidad de un 98%. A un valor límite (cut-off) de
55 315 pmol/L, la sensibilidad era de un 18,3% a una especificidad de un 95%.

Insuficiencia cardíaca aguda/pronóstico

60 De un colectivo de 69 pacientes con insuficiencia aguda descompensada, se determinaron los valores de CT-proADM. Los pacientes fueron observados durante un espacio de 360 días. Durante dicho espacio, murieron 21 pacientes, y sobrevivieron 48. Por medio de un análisis de los "Receiver Operator Characteristics", se determinó el mejor valor límite (cut-off) (definido como el mayor producto de la sensibilidad multiplicada por la especificidad) para

el pronóstico de la mortalidad: 192 pmol/L. A este valor límite (cut-off), la sensibilidad del pronóstico era de un 66,6%, la especificidad era de un 75%. A un valor límite (cut-off) de 192 pmol/L, la relación de probabilidad (Likelihood Ratio) de morir era de 2,5.

	< 192 pmol/L	> 192 pmol/L
Sobrevivientes	36	12
Muertos	7	14

5

Infarto del miocardio/pronóstico

De 287 pacientes con infarto cardíaco agudo, se tomaron muestras tres días después de ocurrir el infarto cardíaco, y se midió el CT-proADM. Los pacientes fueron observados durante un espacio de 360 días. Durante dicho espacio, 220 pacientes no presentaban evento adverso alguno, 67 murieron o se rehospitalizaron debido a una insuficiencia cardíaca. Por medio de un análisis de los "Receiver Operator Characteristics", se determinó el mejor valor límite (cut-off) (definido como el mayor producto de la sensibilidad multiplicada por la especificidad) para el pronóstico de la mortalidad o rehospitalización debido a una insuficiencia cardíaca: 161,9 pmol/L. A este valor límite (cut-off), la sensibilidad del pronóstico era de un 67,2%, la especificidad era de un 79,1%. A un valor límite (cut-off) de 161,9 pmol/L, la relación de la probabilidad (Likelihood Ratio) de un evento adverso era de 3,2.

10

15

	< 161,9 pmol/L	> 161,9 pmol/L
Ningún evento adverso	174	46
Muertos/insuficiencia cardíaca	22	45

Neumonía/gravedad y pronóstico

De 142 pacientes con neumonía adquirida de forma ambulatoria, se tomaron muestras en el momento de ser hospitalizados, y se midió el CT-proADM. Los pacientes fueron observados durante un espacio de 70 días. Durante dicho espacio, 10 pacientes murieron. El CT-proADM aumentó con el PSI (Pneumonia Severity Index), lo cual es un índice de la gravedad de la enfermedad (Fig. 3), y, con un promedio de 135 pmol/L, estaban aumentadas frente a los controles sanos (77 pmol/L). Para el pronóstico de la mortalidad, el análisis de los "Receiver Operator Characteristics" dio un AUC (área bajo la curva) de 0,89. Por medio de un análisis de los "Receiver Operator Characteristics", se determinó el mejor valor límite (cut-off) (definido como el mayor producto de la sensibilidad multiplicada por la especificidad) para el pronóstico de la mortalidad: 194,5 pmol/L. A este valor límite (cut-off), la sensibilidad del pronóstico era de un 100%, la especificidad era de un 81,2%. A un valor límite (cut-off) de 194,5 pmol/L, la relación de la probabilidad (Likelihood Ratio) de morir era de 5,5.

20

25

30

	< 194,5 pmol/L	> 194,5 pmol/L
Ningún evento adverso	108	24
Muertos	0	10

EPOC exacerbado

De 53 pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica e infección simultánea de las vías respiratorias inferiores, se midió el CT-proADM. Con un promedio de 106 pmol/L, los valores de dichos pacientes estaban aumentados frente a los controles sanos (77 pmol/L), pero eran más bajos que los de los pacientes con neumonía (ver arriba, 135 pmol/L).

35

LISTADO DE SECUENCIAS

40

<110> Brahms Aktiengesellschaft

<120> Diagnóstico y estratificación de riesgos mediante el nuevo marcador CT-proADM

45

<130> 06/15 BRAHMS 32WO

<140> 10 2006 060 112.2

<141> 2006-12-20

50

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

55

<211> 33

<212> PRT

ES 2 383 711 T3

<213> Humano

<400> 1

Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro
1 5 10 15

Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe
20 25 30

5 Leu

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

<213> Humano

10 <400> 2

Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe
1 5 10 15

Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys
20 25 30

Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met
35 40 45

Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala
50 55 60

Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg
85 90 95

Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe
100 105 110

Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr
115 120 125

Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln
130 135 140

Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly
145 150 155 160

Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro
165 170 175

Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu
180 185

15 <210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Humano

20 <400> 3

ES 2 383 711 T3

Cys Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys
1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Humano

<400> 4

Cys His Gly Ala Pro Ala Pro Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu
1 5 10 15

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el diagnóstico *in vitro* y/o la estratificación del riesgo de enfermedades, caracterizado porque se determina el fragmento C-terminal de proadrenomedullin (CT-proADM) (SEC ID nº 1) de un paciente que va a ser examinado.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se lleva a cabo el diagnóstico *in vitro* y/o la estratificación del riesgo de enfermedades, en particular de enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque las enfermedades cardiovasculares comprenden hipertensión, enfermedades cardíacas coronarias, en particular el síndrome coronario agudo, el infarto de miocardio (agudo), la angina pectoris.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado porque la insuficiencia cardíaca comprende insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad cardíaca hipertensiva con insuficiencia cardíaca (congestiva), enfermedad cardíaca y renal con insuficiencia cardíaca (congestiva), insuficiencia cardíaca primaria del ventrículo derecho, insuficiencia cardíaca secundaria del ventrículo derecho, insuficiencia cardíaca del ventrículo izquierdo asintomática (NYHA estadio I), insuficiencia cardíaca del ventrículo izquierdo sintomática en caso de un esfuerzo más elevado (NYHA estadio II), insuficiencia cardíaca del ventrículo izquierdo sintomática en caso de un esfuerzo más ligero (NYHA estadio III), insuficiencia cardíaca del ventrículo izquierdo sintomática en reposo (NYHA estadio IV), shock cardiogénico, miocarditis, arritmias cardíacas y/o hipertensión.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque las infecciones y/o las inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias comprenden
- 30 a.) infecciones causadas por bacterias, virus, hongos o parásitos, la infección de las vías respiratorias profundas (LRTI: infecciones de las vías respiratorias inferiores), bronquitis, neumonía, sarcoidosis, bronquiectasias, edema pulmonar no cardíaco y/o
- 35 b.) enfermedades pulmonares intersticiales y fibrosis pulmonar, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), en particular las exacerbaciones infecciosas EPOC, asma bronquial, en particular exacerbaciones infecciosas en el asma bronquial, carcinoma bronquial.
- 40 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se realiza asimismo una determinación de por lo menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo constituido por marcadores inflamatorios, es decir, por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo constituido por proteínas C-reactivas (CRP), citocinas, tales como por ejemplo TNF-alfa, interleucinas, tales como por ejemplo IL-6, procalcitonina (1-116, 3-116) y moléculas de adhesión, tales como VCAM o ICAM, marcadores cardiovasculares, es decir, por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo constituido por creatina cinasa, mieloperoxidasa,
- 45 copeptina, mioglobina, proteína natriurética, en particular ANP (o ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o, en cada caso, una secuencia parcial de los mismos, troponina cardíaca, CRP así como (pro)hormonas reguladoras de la circulación, tales como el péptido liberador de pro-gastrina (proGRP), pro-endotelina-1, pro-leptina, pro-neuropéptido Y, pro-somatostatina, pro-neuropéptido YY, pro-opiomelanocortina, copeptina o, en cada caso, una secuencia parcial de los mismos, marcadores isquémicos, es decir, por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo constituido por troponina I y T, CK-MB, o marcadores neurohormonales, es decir, por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo constituido por proteínas natriuréticas, en particular ANP (o ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o una secuencia parcial de los mismos, en un paciente que va a ser examinado.
- 50 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se llevan a cabo determinaciones paralelas o simultáneas de los marcadores.
- 55 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las determinaciones se llevan a cabo en por lo menos un paciente de muestra.
- 60 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las determinaciones se llevan a cabo por medio de un ensayo rápido, en particular en determinaciones de parámetro individual o parámetros múltiples.
- 65 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el diagnóstico para la estratificación de pacientes se realiza para la toma de decisiones clínicas, en particular para el tratamiento ulterior mediante medicamentos destinados al tratamiento o a la terapia de enfermedades, en particular, en medicina de cuidados intensivos o medicina de urgencias y para la hospitalización de pacientes.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el diagnóstico y/o la estratificación del riesgo se lleva a cabo para el pronóstico, para la detección precoz y la detección por diagnóstico diferencial, para la evaluación de la gravedad y del transcurso de enfermedades en paralelo a la terapia, en

particular de enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias.

5 12. Utilización de CT-proADM (SEC ID nº 1) para el diagnóstico *in vitro* y/o estratificación del riesgo de enfermedades, en particular de enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias.

10 13. Utilización de CT-proADM (SEC ID nº 1) para el diagnóstico cardíaco *in vitro*.

14. Utilización de CT-proADM (SEC ID nº 1) o CT-proADM contenido en una combinación de marcadores para el diagnóstico *in vitro* y/o la estratificación del riesgo de enfermedades, en particular de enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, infecciones y/o inflamaciones de los pulmones y de las vías respiratorias, conteniendo dicha combinación de marcadores unos marcadores adicionales según la reivindicación 6.