

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 055**

51 Int. Cl.:
G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10191423 .2**
- 96 Fecha de presentación: **08.05.2008**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2306203**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2011**

54 Título: **Diagnóstico y estratificación de riesgo mediante NT-proET-1**

30 Prioridad:
08.05.2007 DE 102007021443

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.10.2012

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:
Isern Jara, Jorge

ES 2 388 055 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 riesgo mediante NT-proET-1.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones, en el que se realiza una determinación del fragmento libre N-terminal pro-endotelina (NT-proET-1; AS 18-52 del preproET, según la figura 1) o de fragmentos del mismo.

Para poder aplicar una terapia adecuada se requiere un diagnóstico precoz y la diferenciación de las enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones nada más entrar en urgencias en combinación con la necesidad de tomar decisiones clínicas.

10 Según el estado de la técnica, se ha descrito la ET-1 madura (21 AS) para el diagnóstico junto con la proteína precursora Big-ET 1 (38AS, véase la figura 1) (Rossi GP, Seccia TM, Albertin G, Pessina AC. "Measurement of endothelin: clinical and research use" [Medición de la endotelina: uso clínico e investigación]. Ann Clin Biochem 2000; 37(Pt 5); 608-26.2; Aubin P, Le Brun G, Moldovan F, Villette JM, Creminon C, Dumas J, y otros. "Sandwich-type enzyme immunoassay for big endothelin-I in plasma: concentrations in healthy human subjects unaffected by sex or posture" [Inmunoensayo enzimático tipo sándwich para endotelina-I grande en plasma: concentraciones en sujetos humanos sanos independientemente de su sexo o posición]. Clin Chem 1997; 43; 64-70). Además, se conoce que por los documentos WO 00/22439 o EP 1121600 B1 de la solicitante se han dado a conocer las prohormonas de endotelina para el diagnóstico de la sepsis.

20 Asimismo se han descrito por el documento EP 1564558 B1 los fragmentos C-terminales pro-endotelina (CTproET-1) con las secuencias de aminoácidos 93-212 ó 168-212 de la prepro-endotelina (figura 1, SEQ ID nº 1) para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares para la determinación indirecta del contenido en endotelina-1 o en endotelina-1 grande.

25 Pero en los procedimientos de diagnóstico conocidos con utilización de los marcadores conocidos hasta el momento sigue siendo un inconveniente que no se consigue de forma suficiente la detección precoz y completa de pacientes de riesgo y, por lo tanto, no se realiza de un modo suficiente una estratificación de riesgo. Uno de los objetivos de la presente invención consiste, por lo tanto, en desarrollar un procedimiento para la estratificación de riesgo de las enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones que haga posible una detección mejorada de pacientes de riesgo.

Además, resulta un inconveniente que, según el estado de la técnica, no se consigue casi nunca una sensibilidad y/o especificidad suficiente de los marcadores.

30 Struck y otros (2005), Peptides, Vol. 26, páginas 2482-2486 dan a conocer la medición de un péptido precursor de la endotelina-1 en plasma, pero no establecen ninguna relación entre el péptido como marcador y el diagnóstico o la estratificación de las enfermedades pulmonares o las enfermedades de las vías respiratorias.

35 Otro objetivo consiste, por lo tanto, en proporcionar un procedimiento para la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones en el que, como mínimo, un marcador o una combinación de marcadores presenta una sensibilidad y especificidad suficientes en un diagnóstico in vitro.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer un procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones.

40 El problema se resuelve mediante un procedimiento para el diagnóstico y la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones en el que se realiza una determinación de la pro-endotelina N-terminal (abreviado: "NT-proET-1") o fragmentos y péptidos parciales de la misma (en adelante, el procedimiento según la invención).

Sorprendentemente, las NT-proET-1 o los fragmentos y péptidos parciales de la misma presentan una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones (véase los ejemplos y las figuras).

45 En el marco de la presente invención, con "enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones" se entenderán especialmente "infecciones de los pulmones y de las vías respiratorias" y, concretamente, aquellas infecciones que son causadas por bacterias, virus, hongos o parásitos, por ejemplo indicaciones tales como la infección de las vías respiratorias inferiores (LRTI: Lower respiratory tract infections), bronquitis, neumonía, sarcoidosis, bronquiectasias, edema pulmonar no cardíaco.

50 Según la invención, son preferentes además la infección de las vías respiratorias inferiores (LRTI: Lower respiratory tract infections), la bronquitis, la bronquitis pútrida, la neumonía. Muy preferente resulta la neumonía, especialmente la neumonía adquirida en la comunidad (CAP: community associated pneumonie), la infección de las vías respiratorias inferiores (LRTI: Lower respiratory tract infections).

En el marco de la presente invención, con neumonía se entenderá una enfermedad aguda o crónica del tejido

- 5 pulmonar y cuya infección es causada por bacterias, virus u hongos, parásitos, rara vez también de forma tóxica por inhalación de sustancias tóxicas o de forma inmunológica. Para el médico clínico la neumonía es una constelación de distintos síntomas (fiebre o hipotermia, escalofríos, tos, dolores de pecho pleuríticos, producción incrementada de esputo, frecuencia respiratoria aumentada, atenuación de sonidos en la auscultación, respiración bronquial, estertores agudos, fricción pleural) en combinación con, como mínimo, un infiltrado reconocible en la radiografía del torax (Harrisons Innere Medizin [Harrison Medicina Interna] editado por Manfred Dietel, Norbert Suttrop y Martin Zeitz, editorial: ABW Wissenschaftsverlag 2005).
- 10 En el marco de la presente invención, con “enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones” se entenderá especialmente “enfermedades crónicas de los pulmones y de las vías respiratorias” y, concretamente, indicaciones tales como la enfermedad pulmonar intersticial y fibrosis pulmonares, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), especialmente exacerbaciones infecciosas de las EPOC, asma bronquial, en especial exacerbaciones infecciosas del asma bronquial, carcinoma bronquial. Muy preferentes son las EPOC, en especial las exacerbaciones infecciosas de las EPOC.
- 15 Las EPOC designan, de acuerdo con la invención, a un grupo de enfermedades crónicas que se caracterizan por la tos, la expectoración aumentada y la disnea de esfuerzo. En primer lugar hay que nombrar la bronquitis crónica-obstructiva y el enfisema pulmonar. Ambos cuadros clínicos están caracterizados por el hecho de que, sobre todo, la expiración está dificultada. Una denominación coloquial para el síntoma principal de la EPOC es “tos de fumador”. La invención resulta muy ventajosa en exacerbaciones agudas.
- 20 Todas las indicaciones mencionadas están descritas, además, por ejemplo en Pschyrembel, DeGruyter, 9ª edición, Berlín 2004.
- 25 El término “estratificación de riesgo” comprende, de acuerdo con la invención, la detección de pacientes, en especial pacientes de urgencia y pacientes de riesgo, con el peor pronóstico a fin de proceder a un diagnóstico y una terapia/tratamiento más intensivos de las enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones, en especial de infecciones y inflamaciones crónicas con el fin de facilitar el desarrollo más favorable posible de la enfermedad. Una estratificación de riesgo, según la invención, permite en consecuencia un procedimiento terapéutico más eficaz para el tratamiento o la terapia de infecciones o enfermedades crónicas de las vías respiratorias o de los pulmones mediante antibióticos.
- 30 Por lo tanto, la invención se refiere asimismo a la identificación de pacientes con un elevado riesgo y/o un pronóstico desfavorable de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones, concretamente en pacientes sintomáticos y/o asintomáticos, especialmente en pacientes de urgencia.
- 35 De forma muy ventajosa, se puede realizar una estratificación segura mediante el procedimiento de la invención, especialmente en casos de la medicina de urgencia y/o en la medicina intensiva. El procedimiento, según la invención, facilita por lo tanto decisiones clínicas que conducen a un rápido éxito terapéutico y a evitar muertes. Estas decisiones clínicas comprenden asimismo un tratamiento continuado mediante fármacos para el tratamiento o la terapia de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones.
- 40 Por lo tanto, la invención se refiere asimismo a un procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo de pacientes con enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones para llevar a cabo decisiones clínicas tales como el tratamientos y la terapia continuados mediante fármacos, preferentemente en la medicina intensiva y la medicina de urgencia que son críticas en el tiempo, incluyendo la decisión de hospitalizar al paciente.
- Según otra realización preferente, el procedimiento de la invención se refiere, por lo tanto, al control de la terapia de enfermedades de las vías respiratorias.
- 45 Según otra realización preferente del procedimiento de la invención, el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo se realiza para el pronóstico, para la detección precoz y la detección del diagnóstico diferencial, para la evaluación de la gravedad y para la evaluación del desarrollo concomitante a la terapia.
- Según otra realización preferente, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* para el diagnóstico precoz o diferencial o el pronóstico de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones, en el que se lleva a cabo una determinación del marcador NT-proET-1 o de fragmentos o péptidos parciales del mismo en un paciente a examinar.
- 50 Según una realización del procedimiento, según la invención, se extrae líquido corporal al paciente a examinar, preferentemente sangre, ya sea sangre total o suero o el plasma que se obtiene, y el diagnóstico se realiza *in vitro/ex vivo*, es decir al exterior del cuerpo humano o animal. Debido a la determinación del marcador NT-proET-1 o de fragmentos y péptidos parciales del mismo, se consigue una alta sensibilidad y especificidad (véanse los ejemplos y figuras) y, por medio de las cantidades disponibles en, como mínimo, una muestra del paciente, se puede llevar a cabo el diagnóstico o la estratificación de riesgo.
- 55 En el marco de esta invención, con “NT-proET-1” se entenderá una proteína humana o un polipéptido humano que se puede obtener a partir de la preproendotelina, y la preproendotelina (SEQ ID nº1 y figura 1) comprende los

fragmentos libres con los aminoácidos 18-52 y los fragmentos APETAVLGAELSAV (SEQ ID nº 2) pos. 18-31 de preproET-1 (SEQ ID nº 1 y figura 1) y GENGGEKPTSPPPWRLRRSKR (SEQ ID nº 3) pos. 32-52 de preproET-1 (SEQ ID nº 1 y figura 1). Además, estos polipéptidos de la invención pueden presentar modificaciones post-translacionales tales como la glicosilación, la lipidización o derivatizaciones.

- 5 Según otra realización, la determinación de NT-proET-1 o fragmentos y péptidos parciales de la misma puede realizarse adicionalmente con otros marcadores y, en concreto, preferentemente con aquellos que ya señalan enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una de estas realizaciones del procedimiento, según la invención, en la que la determinación se lleva a cabo adicionalmente con, como mínimo, un marcador adicional elegido entre el grupo de los marcadores inflamatorios, los marcadores cardiovasculares, los marcadores neurohormonales o los marcadores isquémicos, en un paciente a examinar.

De acuerdo con la invención, el marcador inflamatorio puede elegirse entre, como mínimo, un marcador del grupo de la proteína C reactiva (PCR), las citosinas tales como, por ejemplo, TNF-alfa, las interleucinas tales como, por ejemplo IL-6, la procalcitonina (1-116, 3-116) y moléculas de adhesión tales como VCAM o ICAM, así como el marcador cardiovascular, en especial un marcador que indica la necrosis de tejido cardíaco y un marcador que influye en la presión sanguínea entre, como mínimo, un marcador del grupo de la creatinquinasa, la mioglobina, la mieloperoxidasa, la proteína natriurética, en especial ANP (o ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o una secuencia parcial de las mismas respectivamente, troponina cardíaca, CRP. Además, con ello se entenderán también (pro)hormonas reguladoras de la circulación, en especial como el propéptido liberador de gastrina (proGRP), proendotelina-2, proendotelina-3, proleptina, proneuropéptido-Y, prosomatostatina, proneuropéptido-YY, proopiomelanocortina, proadrenomedulina (proADM), provasopresina (proAVP) o una secuencia parcial de las mismas, respectivamente.

El marcador isquémico puede elegirse entre, como mínimo, un marcador del grupo troponina I y T, CK-MB. Además, el marcador neurohormonal puede ser, como mínimo, otra proteína natriurética, en especial ANP (o ANF), pro ANP, NT-proANP, BNP, proBNP o una secuencia parcial de las mismas, respectivamente.

Según otra realización de la invención, el procedimiento, según la invención, puede llevarse a cabo en el marco de un diagnóstico in vitro mediante determinaciones paralelas o simultáneas de los marcadores (por ejemplo, placas de microtitulación con 96 o más cavidades), realizándose las determinaciones en, como mínimo, una muestra de paciente.

Además, el procedimiento, según la invención, y sus determinaciones pueden llevarse a cabo en un dispositivo diagnóstico por medio de un autómata de análisis, en especial mediante un encriptador (<http://www.kryptor.net/>).

Según otra realización, el procedimiento de la invención y sus determinaciones pueden realizarse mediante una prueba rápida (por ejemplo, prueba de flujo lateral (lateral flow) o punto de cuidado (point of care)), ya sea en determinaciones de parámetros individuales o múltiples. Según una realización muy preferente se trata de una autoprueba o de un dispositivo adecuado para el diagnóstico de urgencia.

Además, la invención se refiere a la utilización de NT-proET-1 o fragmentos de la misma, para la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones y/o para el diagnóstico in vitro para el diagnóstico precoz o diferencial o para el pronóstico de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones.

Otro objetivo consiste en la utilización de un dispositivo diagnóstico adecuado para llevar a cabo el procedimiento, según la invención.

En el marco de la presente invención, con un dispositivo diagnóstico de este tipo se entenderá especialmente un "array" o conjunto, o un "assay" o prueba (por ejemplo, un inmunoensayo, ELISA, etc.), y en el más amplio sentido, un dispositivo para llevar a cabo el procedimiento, según la invención.

La invención se refiere además a la utilización de un kit para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones, que contiene agentes reactivos de detección para determinar NT-proET-1 o fragmentos de las mismas, en su caso, otros marcadores mencionados anteriormente. Estos reactivos de detección comprenden, por ejemplo, anticuerpos, etc.

Los siguientes ejemplos y figuras sirven para explicar más detalladamente la invención, pero sin limitar la invención a estos ejemplos y figuras.

50 Ejemplos y figuras:

Inmunoensayo

Se ha utilizado un inmunoensayo tipo sándwich para la medición de NT-proET-1, tal como se describe en Struck y otros (Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. "Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor in vivo" [Procesamiento proteolítico de muestras de la precursora de endotelina-1 in vivo]. Péptidos 2005; 26; 2482-6).

Síntesis de péptidos:

Derivado de la conocida secuencia de aminoácidos de preproET-1 (figura 1) se eligieron dos regiones (pos. 18-31, 32-52). Las regiones fueron sintetizadas químicamente como péptidos solubles de acuerdo con un procedimiento estándar, en un caso complementadas por un resto de cisteína N-terminal, luego fueron depuradas, controladas en cuanto a su calidad mediante espectrometría de masas y HPLC de fase inversa y liofilizadas en alícuotas (firma JPT, Berlín, Alemania). Las secuencias de aminoácidos de los péptidos son las siguientes:

PAV15 CAPETAVLGAELSAV pos. 18-31 de preproET-1 (figura 1)

MPGC22 GENGGEKPTSPPWRLRRSKRC pos. 32-52 de preproET-1 (figura 1).

Asimismo, se ha sintetizado un péptido que comprende la región pos. 18-52 de preproET-1 (PAR35 APETAVLGAELSAVGENGGEKPTSPPWRLRRSKR).

Conjugación e inmunización

Mediante MBS (éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-succinimida) fueron conjugados los péptidos PAV15 y MPGC22 en la proteína portadora KLH (hemocianina Keyhole limpet) (véanse las instrucciones de trabajo "NHS-Esters-Maleimide Crosslinkers", firma PIERCE, Rockford, IL, EEUU). Con estos conjugados fueron inmunizados corderos según el siguiente esquema: Cada cordero recibió inicialmente 100 µg de conjugado (indicación de masas referida a la porción de péptido del conjugado) y, a continuación, cada 4 semanas 50 µg de conjugado (indicación de masas referida a la porción de péptido del conjugado). Empezando con el cuarto mes después del inicio de la inmunización fueron extraídos cada 4 semanas 700 ml de sangre a cada cordero y mediante centrifugación se obtuvo, a partir de la misma, un antisero. Las conjugaciones, las inmunizaciones y la obtención de antiseros fueron llevadas a cabo por la firma MicroPharm, Carmarthenshire, Reino Unido.

Depuración de los anticuerpos

En un procedimiento de 1 etapa, a partir de los antiseros, que se habían obtenido empezando en el cuarto mes tras la inmunización, se prepararon los anticuerpos específicos para los péptidos. A tal efecto, primero los péptidos PAV15 y MPGC22 fueron acoplados al gel SulfoLink (véanse las instrucciones de trabajo "SulfoLink Kit" firma PIERCE, Rockford, IL, EEUU). Para el acoplamiento se ofrecieron 5 mg de péptido por 5 ml de gel, respectivamente.

La depuración de afinidad de anticuerpos específicos para péptidos a partir de antiseros de cordero contra los péptidos se realizó de la siguiente manera:

Las columnas de péptido fueron, en primer lugar, lavadas alternativamente tres veces con 10 ml de tampón de elución respectivamente (ácido cítrico 50 mM, pH 2,2) y tampón de fijación (fosfato sódico 100 mM, Tween al 0,1%, pH 6,8). 100 ml de los antiseros fueron filtrados a través de 0,2 µm y mezclados con el material de columna existente. A tal efecto, el gel fue barrido cuantitativamente de la columna con 10 ml de tampón de fijación. La incubación se realizó durante la noche a temperatura ambiente con agitación. Las preparaciones se pasaron cuantitativamente a columnas vacías (NAP 25, Pharmacia, vaciadas). Se desecharon los filtrados. A continuación se realizó el lavado con 250 ml de tampón de fijación libre de proteína (contenido de proteína del eluido de lavado < 0,02 A280 nm). Se aportó tampón de elución a las columnas lavadas, y se recogieron fracciones de 1 ml. Se determinó el contenido de proteína de cada fracción mediante el método BCA (véanse las instrucciones de trabajo de la firma PIERCE, Rockford, IL, EEUU). Fueron reunidas las fracciones con concentraciones de proteína > 0,8 mg/ml. Tras determinación de la proteína del "pool" mediante el método BCA, se obtuvieron unas producciones de 27 mg para el anticuerpo anti-PAV15 y de 35 mg para el anticuerpo anti-MPGC22.

Marcación

Por medio de una columna de filtración en gel NAP-5 (Pharmacia), 500 µl del anticuerpo anti-MPGC22 purificado (véase lo indicado anteriormente) se pasaron a 1 ml de tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 8,0) según las instrucciones de trabajo. Las concentraciones de proteína de la solución de anticuerpos se ajustaron a un valor de 1,5 mg/ml mediante el tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 8,0).

Para la marcación por quimioluminiscencia se siguió tratando el anticuerpo de la siguiente manera: 67 µl de la solución de anticuerpos fueron mezclados con 10 µl de éster MA70-acridinio-NHS (1 mg/ml; firma HOECHST Behring) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego fueron añadidos 423 µl de glicina 1 M y se prosigió la incubación por espacio de otros 10 minutos. Por medio de una columna de filtración en gel NAP-5 (Pharmacia), la preparación de marcación se pasó a continuación a 1 ml de eluyente A (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) según las instrucciones de trabajo, y fue además liberada de componentes de bajo peso molecular. Para la separación de los últimos residuos de etiquetas no fijadas a anticuerpos fue efectuada una HPLC por filtración en gel (columna: Waters Protein Pak SW300). La muestra fue aplicada y cromatografiada con eluyente A con un caudal de 1 ml/min. Con un fotómetro de flujo fueron medidas las longitudes de onda de 280 nm y 368 nm. La relación de absorción de 368 nm/280 nm como medida para el grado de marcación del anticuerpo fue en el pico de 0,10 +/- 0,01. Las fracciones con contenido de anticuerpos monómeros (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

5 Tubos de poliestireno de 5 ml irradiados (firma Greiner) fueron recubiertos de anticuerpo anti-PAV15 purificado de la siguiente manera: el anticuerpo fue diluido en Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8, hasta una concentración de 6,6 µg/ml. Se pipetearon al interior de cada tubo 300 µl de esta solución. Los tubos fueron incubados durante 20 horas a 22° C. Se aspiró la solución. Entonces se llenó cada tubo 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 se aspiró la solución. Los tubos fueron finalmente secados en un secador al vacío.

10 Realización y evaluación del inmunoensayo

Sirvió de material patrón el péptido PAR35 que fue diluido en serie en suero normal de caballo (firma SIGMA). A los patrones así fabricados les fueron atribuidas concentraciones de acuerdo con la pesada de péptidos.

15 El inmunoensayo tipo sándwich se preparó de la siguiente manera: en los respectivos tubos de ensayo recubiertos de anticuerpos se pipetearon 50 µl de patrones o muestras, así como 200 µl de tampón de ensayo (fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM, albúmina de suero bovino al 5%, IgG no específica de cordero al 0,1%, azida sódica al 0,1%, pH 7,4) que contenía 1 millón de RLU (unidades relativas de luz) del anticuerpo marcado con MA70. Se procedió a incubación durante 2 horas a 22° C con sacudidas. Luego se procedió 4 veces al lavado con 1 ml de solución de lavado (Tween 20 al 0,1%) por tubo, dejando escurrir cada vez y procediendo a la medición de la quimioluminiscencia fijada al tubo en un luminómetro (firma BERTHOLD, LB952T; reactivos básicos de BRAHMS AG). Utilizando el software MultiCalc (Spline Fit) se procedió a la lectura de la concentración de NT-proET-1 de las muestras en la curva patrón.

20 El analito que puede ser medido con el ensayo descrito se denomina proendotelina-1 N-terminal (NT-proET-1).

Evaluación clínica (los ejemplos que se refieren a los pacientes con enfermedades cardíacas sirven de referencia).

Rango normal

25 Las concentraciones de NT-proET-1 fueron determinadas en muestras de personas de control sanas (n=200). La mediana se situó en 30,5 pmol/L, el valor medido más pequeño estuvo en 2,0, al más grande en 53 pmol/L, los percentiles 95% en 16,3 o 47,2 pmol/L, respectivamente.

Insuficiencia cardíaca / Gravedad

30 Se midieron las concentraciones de NT-proET-1 en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica o aguda descompensada. Las concentraciones NT-proET-1 estaban asociadas a la gravedad de la insuficiencia cardíaca, en especial con la gravedad aumentada: las medianas de las concentraciones de NT-proET-1 en las cuatro categorías de gravedad NYHA I-IV eran: 35,4, 37,3, 45,5 ó 83,9 pmol/L, respectivamente (véase la figura 2).

Insuficiencia cardíaca crónica / Diagnóstico

35 De un colectivo de 316 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, así como 200 controles sanos se determinaron los valores NT-proET-1. El análisis de las características del operador receptor arrojó una AUC de 0,72. Con un valor de corte de 49,7 pmol/L la sensibilidad era del 34,3% con una especificidad del 98%. Con un valor de corte de 47,2 pmol/L, la sensibilidad era del 38,5% con una especificidad del 95%.

Insuficiencia cardíaca crónica / Pronóstico

40 Se determinaron los valores NT-proET-1 de un colectivo de 316 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. Los pacientes fueron observados durante un período de tiempo medio de 360 días. En este período murieron 42 pacientes, 274 sobrevivieron. Mediante el análisis de las características del operador receptor se detectó el mejor valor de corte (definido como el mayor producto de sensibilidad y especificidad) para el pronóstico de la mortalidad: 51,3 pmol/L. Con este valor de corte la sensibilidad del pronóstico era del 71,4%, la especificidad era del 74,5%. La relación de probabilidad (likelihood ratio) de morir con un valor de corte de 51,3 pmol/L era: 2,8.

45

	<51,3 pmol/L	>51,3 pmol/L
Sobrevivientes	204	70
Muertos	12	30

Insuficiencia cardíaca aguda / Diagnóstico

Se determinaron los valores NT-proET-1 de un colectivo de 125 pacientes con insuficiencia respiratoria aguda. De los 125 pacientes 69 pacientes también tenían insuficiencia cardíaca. El análisis de las características del operador receptor para el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardíaca arrojó una AUC de 0,72. Con un valor de corte de 111 pmol/L la sensibilidad era del 10,2% con una especificidad del 98%. Con un valor de corte de 90,5 pmol/L la sensibilidad era del 17,5% con una especificidad del 95%.

Insuficiencia cardíaca aguda / Pronóstico

Se determinaron los valores NT-proET-1 de un colectivo de 69 pacientes con insuficiencia cardíaca aguda decompensada. Los pacientes fueron observados durante un período de tiempo de 360 días. Durante este período de tiempo murieron 21 pacientes, 48 sobrevivieron. Mediante un análisis de las características del operador receptor se detectó el mejor valor de corte (definido como el mayor producto de sensibilidad y especificidad) para el pronóstico de la mortalidad: 64 pmol/L. Con este valor de corte la sensibilidad del pronóstico era del 66,6%, la especificidad era del 68,7%. La relación de probabilidad (likelihood ratio) de morir con un valor de corte de 64 pmol/L era: 2,0.

15

	<64 pmol/L	>64 pmol/L
Sobrevivientes	33	15
Muertos	7	14

Infarto de miocardio / Pronóstico

Se obtuvieron muestras de 246 pacientes con un infarto de miocardio agudo tres días después de sufrir el infarto cardíaco y se midieron los valores NT-proET-1. Los pacientes fueron observados durante un período de tiempo de 60 días. Durante este período de tiempo 220 pacientes no sufrieron ninguna adversidad, 26 murieron o fueron rehospitalizados debido a una insuficiencia cardíaca. Mediante un análisis de las características del operador receptor (AUC = 0,70) se detectó el mejor valor de corte (definido como el mayor producto de sensibilidad y especificidad) para el pronóstico de la mortalidad o la rehospitalización por insuficiencia cardíaca: 63,9 pmol/L. Con este valor de corte la sensibilidad del pronóstico era del 65,4%, la especificidad era del 73,6%. La relación de probabilidad (likelihood ratio) de morir con un valor de corte de 63,9 pmol/L era: 2,5.

20

25

	<63,9 pmol/L	>63,9 pmol/L
Ninguna adversidad	162	58
Muerte/insuficiencia cardíaca	9	17

Neumonía / Gravedad y pronóstico

Se obtuvieron en el hospital muestras de 142 pacientes con neumonía adquirida en la comunidad y se midieron los valores NT-proET-1. Los pacientes fueron observados durante un período de tiempo de 70 días. En este período de tiempo murieron 10 pacientes. Las concentraciones de NT-proET-1 aumentaron con el PSI (índice de gravedad de la neumonía), una puntuación para la gravedad de la enfermedad (figura 3), y eran elevadas en la mediana, con 53 pmol/L con respecto a controles sanos (30,5 pmol/L). Para el pronóstico de la mortalidad el análisis de las características de operador-receptor arrojó una AUC de 0,89. Mediante el análisis de las características de operador-receptor se detectó el mejor valor de corte (definido como el mayor producto de sensibilidad y especificidad) para el pronóstico de la mortalidad: 77 pmol/L. Con este valor de corte, la sensibilidad del pronóstico era del 100%, la especificidad era del 81,2%. La relación de probabilidad (likelihood ratio) de morir con un valor de corte de 77 pmol/L era: 5,5.

30

35

	<77 pmol/L	>77 pmol/L
Ninguna adversidad	108	24

Muerte	0	10
--------	---	----

EPOC exacerbada

5 Se midieron los valores NT-proET-1 de 53 pacientes con enfermedades pulmonares obstructivas crónicas e infección simultánea de las vías respiratorias inferiores. Con 47 pmol/L en la mediana estos pacientes presentaban valores superiores a los de los controles sanos (30,5 pmol/L), pero inferiores a los de los pacientes con neumonía (véase arriba, 53 pmol/L).

Tabla: Clasificación de la Asociación del Corazón de Nueva York (NYHA)

10	NYHA I	Ninguna limitación a la actividad física. La actividad física cotidiana no produce ningún agotamiento inadecuado, arritmias, insuficiencia respiratoria o angina de pecho (angina pectoris).
	NYHA II	Ligera limitación de la actividad física. Ninguna molestia en reposo. Agotamiento, arritmias, insuficiencia respiratoria o angina de pecho al realizar actividades físicas cotidianas.
	NYHA III	Marcada limitación del rendimiento físico al realizar actividades habituales. Ninguna molestia en reposo. Agotamiento, arritmias, insuficiencia respiratoria o angina de pecho al realizar actividades físicas menores.
15	NYHA IV	Molestias al realizar cualquier actividad física y en reposo. Postración en cama.

Descripción de las figuras:

En la figura 1 se muestra la secuencia de aminoácidos (AS) de preproendotelina-1 con los segmentos 1-17 péptido de señal, 18-52 NT-proET-1, 53-73 ET-1 maduro, 53-90 ET-1 grande (ó 74-90).

20 En la figura 2 se muestran concentraciones de NT-proET-1 en función de la gravedad de la insuficiencia cardíaca. Se representan los valores medios (+SEM) de controles sanos (n=200), así como de pacientes con insuficiencia cardíaca agrupados según la gravedad NYHA (NYHA I: n=22, NYHA II: n=126, NYHA III: n=132, NYHA IV: n=17).

En la figura 3 se muestran concentraciones de NT-proET-1 en función de la gravedad de la neumonía. Se representan los valores medio (+SEM) de controles sanos (n=200), así como de pacientes con neumonía agrupados según el índice de gravedad de la neumonía (PSI I: n=36, PSI II: n=44, PSI III: n=25, PSI IV: n=19, PSI V: n=18).

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BRAHMS GmbH

<120> Diagnóstico y estratificación de riesgo mediante NT-proET-1

<130> 03/07 BRA35WOEP-02

<140> PCT/DE2008/000781

30 <141> 2008-05-08

<150> 10 2007 041 443.1

<151> 2007-05-08

<160> 6

<170> Patente versión 3.3

35 <210> 1

<211> 212

<212> PRT

<213> Humano

<400> 1

ES 2 388 055 T3

Met Asp Tyr Leu Leu Met Ile Phe Ser Leu Leu Phe Val Ala Cys Gln
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val Gly
 20 25 30

Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg
 35 40 45

Arg Ser Lys Arg Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val
 50 55 60

Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp Val Asn Thr Pro Glu His Val
 65 70 75 80

Val Pro Tyr Gly Leu Gly Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ala Leu Glu Asn
 85 90 95

Leu Leu Pro Thr Lys Ala Thr Asp Arg Glu Asn Arg Cys Gln Cys Ala
 100 105 110

Ser Gln Lys Asp Lys Lys Cys Trp Asn Phe Cys Gln Ala Gly Lys Glu
 115 120 125

Leu Arg Ala Glu Asp Ile Met Glu Lys Asp Trp Asn Asn His Lys Lys
 130 135 140

Gly Lys Asp Cys Ser Lys Leu Gly Lys Lys Cys Ile Tyr Gln Gln Leu
 145 150 155 160

Val Arg Gly Arg Lys Ile Arg Arg Ser Ser Glu Glu His Leu Arg Gln
 165 170 175

Thr Arg Ser Glu Thr Met Arg Asn Ser Val Lys Ser Ser Phe His Asp
 180 185 190

Pro Lys Leu Lys Gly Lys Pro Ser Arg Glu Arg Tyr Val Thr His Asn
 195 200 205

Arg Ala His Trp
 210

<210> 2

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Humano

<400> 2

Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val
1 5 10

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 3

Gly Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu
1 5 10 15

Arg Arg Ser Lys Arg
20

<210> 4

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> derivado sintético

<400> 4

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

15

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> artificial

20 <220>

<223> derivado sintético

<400> 5

Gly Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu
1 5 10 15

Arg Arg Ser Lys Arg Cys

<210> 6

25 <211> 35

<212> PRT

ES 2 388 055 T3

<213> Humano

<400> 6

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

Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg Arg
20 25 30

Ser Lys Arg
35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el diagnóstico in vitro y/o la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones, caracterizado porque se realiza una determinación del fragmento libre 18-52 de SEQ ID nº 1 (NT-proET-1) o de un fragmento elegido de SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 3 en una muestra de líquido corporal de un paciente a examinar.
- 10 2. Procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones, según la reivindicación 1, caracterizado porque éstas son elegidas entre infecciones causadas por bacterias, virus, hongos o parásitos, en especial la infección de las vías respiratorias inferiores (LRTI: Lower respiratory tract infections), bronquitis, neumonía, sarcoidosis, bronquiectasias, edema pulmonar no cardíaco y/o enfermedades crónicas de los pulmones y de las vías respiratorias, en especial enfermedades pulmonares intersticiales y fibrosis pulmonares, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), especialmente exacerbaciones infecciosas de las EPOC, asma bronquial, en especial exacerbaciones infecciosas del asma bronquial.
- 15 3. Procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo, según una de las reivindicaciones anteriores, para la identificación de pacientes con un riesgo elevado y/o un pronóstico desfavorable de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones.
- 20 4. Procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo, según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente es un paciente sintomático y/o un paciente asintomático, en especial un paciente de urgencia.
- 25 5. Procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo, según una de las reivindicaciones anteriores, para el control de la terapia de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones, especialmente en la medicina intensiva o en la medicina de urgencia.
- 30 6. Procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones, según una de las reivindicaciones anteriores, para llevar a cabo decisiones clínicas, especialmente el tratamiento continuado y terapias con fármacos, especialmente en la medicina intensiva o en la medicina de urgencia, incluyendo la decisión de hospitalizar a un paciente.
- 35 7. Procedimiento para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones, según una de las reivindicaciones anteriores, para el pronóstico, para la detección precoz y la detección del diagnóstico diferencial, para la evaluación de la gravedad y para la evaluación del desarrollo concomitante a la terapia.
- 40 8. Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque adicionalmente se lleva a cabo la determinación de, como mínimo, otro marcador elegido entre el grupo de marcadores inflamatorios, marcadores cardiovasculares, marcadores neurohormonales o marcadores isquémicos.
- 45 9. Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el marcador inflamatorio está elegido entre, como mínimo, un marcador del grupo de la proteína C reactiva (PCR), las citosinas tales como, por ejemplo, TNF-alfa, las interleucinas tales como, por ejemplo IL-6, la procalcitonina (1-116, 3-116) y moléculas de adhesión tales como VCAM ó ICAM.
- 50 10. Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el marcador cardiovascular está elegido entre, como mínimo, un marcador del grupo de la creatinquinasa, la mioglobina, la mieloperoxidasa, la proteína natriurética, en especial ANP (ó ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o una secuencia parcial de las mismas respectivamente, troponina cardíaca, CRP, así como (pro)hormonas reguladoras de la circulación tales como el propéptido liberador de gastrina (proGRP), proendotelina-2, proendotelina-3, proleptina, proneuropéptido-Y, prosomatostatina, proneuropéptido-YY, por-opiomelanocortina, proadrenomedulina (proADM), provasopresina (proAVP) o una secuencia parcial de las mismas, respectivamente.
11. Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el marcador isquémico está elegido entre, como mínimo, un marcador del grupo troponina I y T, CK-MB.
12. Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el marcador neurohormonal es, como mínimo, una proteína natriurética, en especial ANP (ó ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o una secuencia parcial de las mismas.
13. Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se llevan a cabo determinaciones paralelas o simultáneas de los marcadores.
14. Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las determinaciones se llevan a cabo en, como mínimo, una muestra de paciente.

15. Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las determinaciones se realizan mediante una prueba rápida, en especial mediante determinaciones de parámetros individuales o múltiples.

5 16. Utilización del fragmento libre 18-52 de SEQ ID nº 1 (NT-proET-1) o de un fragmento elegido de SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 3, para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones y, en su caso, de otros marcadores, según una de las reivindicaciones 8 a 12.

17. Utilización de un kit para el diagnóstico y/o la estratificación de riesgo de enfermedades de las vías respiratorias y de los pulmones que contiene reactivos de detección para determinar el fragmento libre 18-52 de SEQ ID nº 1 (NT-proET-1) o un fragmento elegido entre SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 3 y, en su caso, otros marcadores según una de las reivindicaciones 8 a 12 y coadyuvantes.

10

Figura 1:

```

Met Asp Tyr Leu Leu Met Ile Phe Ser Leu Leu Phe Val Ala Cys Gln
 1          5          10          15
Gly Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val Gly
          20          25          30
Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg
          35          40          45
Arg Ser Lys Arg Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val
 50          55          60
Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp Val Asn Thr Pro Glu His Val
 65          70          75          80
Val Pro Tyr Gly Leu Gly Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ala Leu Glu Asn
          85          90          95
Leu Leu Pro Thr Lys Ala Thr Asp Arg Glu Asn Arg Cys Gln Cys Ala
          100          105          110
Ser Gln Lys Asp Lys Lys Cys Trp Asn Phe Cys Gln Ala Gly Lys Glu
          115          120          125
Leu Arg Ala Glu Asp Ile Met Glu Lys Asp Trp Asn Asn His Lys Lys
 130          135          140
Gly Lys Asp Cys Ser Lys Leu Gly Lys Lys Cys Ile Tyr Gln Gln Leu
 145          150          155          160
Val Arg Gly Arg Lys Ile Arg Arg Ser Ser Glu Glu His Leu Arg Gln
          165          170          175
Thr Arg Ser Glu Thr Met Arg Asn Ser Val Lys Ser Ser Phe His Asp
          180          185          190
Pro Lys Leu Lys Gly Lys Pro Ser Arg Glu Arg Tyr Val Thr His Asn
          195          200          205
Arg Ala His Trp
 210

```

1-17 péptido de señal

18-52 NT-proET-1

53-73 ET-1 maduro

53-90 ET-1 grande (ó 74-90)

Figura 2

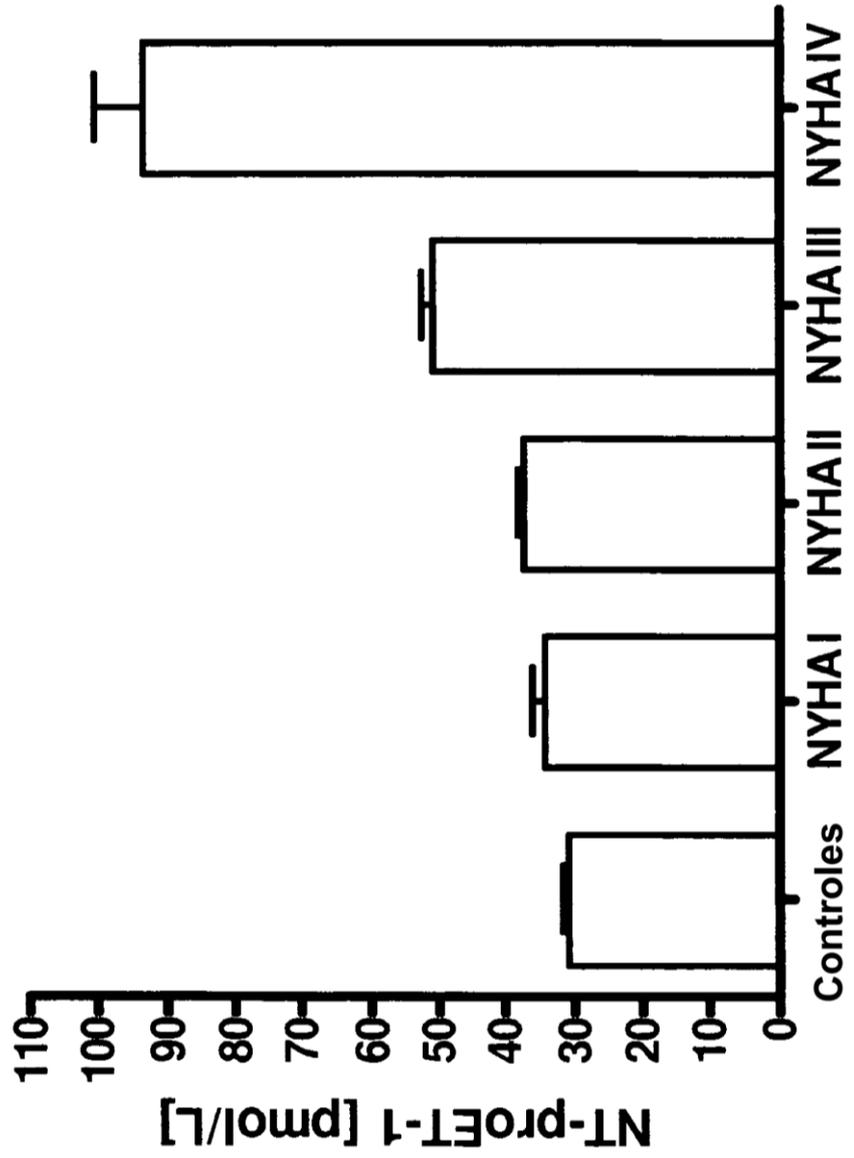


Figura 3

