

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 795**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08162219 .3**
96 Fecha de presentación: **24.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1986012**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2008**

54 Título: **Utilización de péptidos de tipo Bnp para la evaluación del riesgo de sufrir insuficiencia cardiaca como consecuencia de la sobrecarga de volumen**

30 Prioridad:
24.01.2005 US 41671
14.02.2005 EP 05003114
08.12.2005 US 297923

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2012

72 Inventor/es:
Spanuth, Eberhard

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2012

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 388 795 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 de tipo Bnp para la evaluación del riesgo de sufrir insuficiencia cardiaca como consecuencia de la sobrecarga de volumen

5 La presente solicitud se refiere a la utilización de hormonas cardiacas para evaluar el riesgo de insuficiencia cardiaca de un paciente con respecto a la administración de un fármaco antiinflamatorio, particularmente los NSAID (fármacos antiinflamatorios no esteroideos) o esteroides, más particularmente los inhibidores selectivos de Cox-2.

10 Un objetivo de la medicina moderna es proporcionar regímenes de tratamiento personalizados o individualizados. Es decir, regímenes de tratamiento que consideran las necesidades o riesgos individuales del paciente. Resulta de particular importancia el riesgo o complicación cardiovascular, particularmente un riesgo o complicación cardiovascular no identificado.

15 Los inhibidores selectivos de Cox-2 son potentes fármacos antiinflamatorios ampliamente utilizados. En comparación con muchos otros fármacos antiinflamatorios, aparentemente provocan menos efectos secundarios gastrointestinales, tales como sangrados o úlceras gastrointestinales. Por lo tanto, para muchos pacientes el tratamiento con inhibidores selectivos de Cox-2 es el tratamiento de elección.

20 Sin embargo, recientemente se ha observado que los inhibidores selectivos de Cox-2 pueden conducir a complicaciones cardiovasculares, posiblemente seguidas de descompensación cardiaca e incluso la muerte. Rofecoxib (VIOXXTM), un inhibidor selectivo de Cox-2, recientemente ha sido retirado del mercado voluntariamente por la compañía fabricante, Merck, después de que un incremento de 3,9 veces de la tasa de sucesos tromboembólicos graves condujese a la interrupción prematura del estudio APPROVE (Prevención de Pólipos Adenomatosos con VIOXX). Sólo los pacientes sin ningún riesgo cardiovascular identificable fueron incluidos en dicho estudio para la prevención secundario de los adenomas de colon. Incluso en la etapa temprana post-observación se habían medido niveles de presión sanguínea más altos con 25 mg de rofecoxib que con un placebo. Se habían observado 16 sucesos cardiovasculares adicionales por cada 1.000 pacientes tratados (infarto de miocardio, ictus) con 25 mg de rofecoxib comparado con un placebo (Topol E.J., Failing the public health --rofecoxib, Merck, y la FDA. N. Engl. J. Med. 351: 1707-9, 2004) tras 18 meses de seguimiento. También se ha sospechado de un riesgo cardiovascular incrementado en otros estudios (VIGOR), apoyado por datos de un reciente metaanálisis (Bombardier C., Laine L., Reicin A., Shapiro D., Burgos-Vargas R., Davis B., Day R., Ferraz M.B., Hawkey C.J., Hochberg M.C., Kvien T.K., Schnitzer T.J.; grupo de estudio de VIGOR Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis [Comparación entre la toxicidad gastrointestinal superior del rofecoxib y del naproxeno en pacientes con artritis reumatoide] Grupo de estudio de VIGOR. N. Engl. J. Med. 343: 1520-8, 2000; Jüni P., Nartey L., Reichenbach S., Sterchi R., Dieppe P.A., Egger M., Risk of cardiovascular events and rofecoxib cumulative meta-analysis. Lancet 2004; en Internet antes de la publicación impresa).

40 Se sospechan efectos secundarios cardiovasculares similares dentro del contexto de un efecto de clase de otros inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (COX)-2, tales como el celecoxib (CelebrexTM, Pfizer), lumiracoxib (PrexigeTM, Novartis) y parecoxib, un profármaco del valdecoxib, aunque a una tasa de incidencia más baja (Fitzgerald G.A. Coxibs and cardiovascular disease. N. Engl. J. Med. 351: 1709-1711. Mukherjee D., Nissen S.E., Topol E.J., Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 Inhibitors. JAMA 286: 954-959, 2001).

45 Las complicaciones cardiovasculares, tales como el infarto agudo de miocardio o el ictus, pueden conducir a problemas de salud graves e incluso a la muerte. Por lo tanto, muchos pacientes que se beneficiarían claramente del tratamiento con inhibidores selectivos de Cox-2 no son tratados porque se desconoce si el tratamiento podría resultar en una complicación cardiovascular.

50 Los problemas o riesgos cardiovasculares pueden no manifestar síntomas durante largos periodos de tiempo. Por lo tanto, el diagnóstico fiable de la presencia de un riesgo cardiovascular resulta más difícil y se presta a más errores de lo que se cree generalmente. En particular, los médicos generalistas y los no cardiólogos con frecuencia no identifican un problema cardiovascular que previamente ha pasado inadvertido.

55 En el estado actual de la técnica, únicamente resulta posible excluir a los pacientes con síntomas cardiovasculares o un historial conocido de enfermedad cardiaca o hipertensión del tratamiento con inhibidores selectivos de Cox-2.

60 Este control de los riesgos resulta insuficiente, ya que los pacientes asintomáticos también podrían desarrollar una complicación cardiovascular debido a una predisposición no identificada, por ejemplo la presencia de una placa arterial. Tal como se ha indicado anteriormente, sólo los pacientes sin ningún riesgo cardiovascular identificable fueron incluidos en el estudio APPROVE, y sin embargo el tratamiento condujo a complicaciones cardiovasculares en varios pacientes.

65 En la técnica anterior, no se hace ninguna sugerencia sobre cómo el riesgo de una complicación cardiovascular asociada al tratamiento con un fármaco antiinflamatorio, en particular un inhibidor selectivo de Cox-2, puede ser

diagnosticado. En particular no se hace ninguna referencia a cómo puede realizarse dicho diagnóstico en pacientes que no presentan ningún historial conocido de complicaciones cardiovasculares.

Lo anterior no sólo resulta aplicable a los inhibidores selectivos de Cox-2, sino también a otras clases de fármacos antiinflamatorios, por ejemplo los inhibidores de Cox-2 y de otras dianas (por ejemplo Cox-1), y que también podrían provocar complicaciones cardiovasculares. Entre los ejemplos de estas otras clases de fármacos antiinflamatorios se incluyen los inhibidores no selectivos de Cox-2 (compuestos que inhiben Cox-1 y Cox-2). Aunque el riesgo de conducir a complicaciones cardiovasculares no es tan alto como el de los inhibidores selectivos de Cox-2, pueden darse casos en los que debe considerarse una posible complicación cardiovascular.

Por ejemplo, también se sospechan efectos secundarios cardiovasculares para otros fármacos antiinflamatorios, en particular otros NSAID o esteroides.

Maindani Muhammad *et al.*, Lancet, edición norteamericana, 363(9423):1751-1756, dan a conocer que los individuos que han recibido la administración de rofecoxib presentan un mayor riesgo de sufrir insuficiencia cardiaca congestiva. En particular se da a conocer que los pacientes con un historial de insuficiencia cardiaca congestiva relacionada con la admisión, al ser tratados con rofecoxib, deben tratarse con posibles efectos adversos (en 434 casos).

La patente US nº 2003/0022235 da a conocer que BNP puede utilizarse para determinar un pronóstico de un paciente diagnóstica con un síndrome coronario agudo sin elevación de ST. El resultado adverso que puede pronosticarse es, por ejemplo, muerte, infarto de miocardio e insuficiencia cardiaca congestiva.

Ruskoaho, Endocrine Reviews 24(3):341-356 da a conocer el valor general de una hormona cardiaca como herramienta diagnóstica en la insuficiencia cardiaca y proporciona una revisión del valor de los péptidos natriuréticos como herramientas diagnósticas. Estas hormonas se describen como predictivas de sucesos cardiovasculares graves (agudos) en el futuro, en pacientes con insuficiencia cardiaca (ver resumen). Dicho documento proporciona una revisión del valor de los péptidos natriuréticos como herramientas diagnósticas. Se afirma que "...también han aparecido informes contradictorios sobre el valor diagnóstico de los compuestos cardiacos, no son específicos para ninguna enfermedad y la magnitud de los efectos de la edad y el género de BNP en el subgrupo normal sugieren que estos parámetros deben ser considerados al interpretar los niveles de hormona cardiaca".

Por lo tanto, existe una necesidad de un método o medio para identificar los pacientes de riesgo antes de que reciban tratamiento con fármacos antiinflamatorios, particularmente NSAID o esteroides, más particularmente inhibidores selectivos de Cox-2. En particular, existe una necesidad de proporcionar un medio diagnóstico adecuado. En particular, existe una necesidad de un medio diagnóstico que permita identificar los pacientes de riesgo que no presentan historia, o historia conocida, de un riesgo de insuficiencia cardiaca o complicación cardiaca. En particular, los medios diagnósticos deben ser fiables y adecuados para la utilización por médicos generalistas y no cardiólogos.

El objetivo de la solicitud es un método para diagnosticar el riesgo de que un paciente sufra insuficiencia cardiaca como consecuencia de la administración de un compuesto inhibidor de COX-2, en el que el paciente o pacientes no muestran síntomas evidentes de una enfermedad, riesgo o complicación cardiovascular preexistente, que comprende las etapas de:

- a) medir *in vitro* el nivel de un péptido natriurético del grupo BNP y NTproBNP,
- b) diagnosticar el riesgo del paciente mediante comparación del nivel medido con 10 niveles conocidos asociados a diferentes grados de riesgo en un paciente, y en el que el riesgo no se debe a un incremento del volumen de sangre o del volumen intravascular.

Otro objetivo de la solicitud es un método para diagnosticar el riesgo cardiovascular de un paciente que es un candidato para la administración de un inhibidor selectivo de COX-2 ó para el seguimiento del riesgo cardiovascular en un paciente que no manifiesta síntomas evidentes de un trastorno cardiovascular y que está siendo tratado con un inhibidor selectivo de COX-2, en el que en una muestra de líquido corporal o tejido del paciente, se mide el nivel de un péptido natriurético del grupo BNP y NTproBNP *in vitro* mediante un medio diagnóstico capaz de medir dicha hormona.

Otro objetivo de la solicitud es un método para decir si iniciar el tratamiento de un paciente con un compuesto que presenta propiedades inhibitoras de COX-2, en el que el método comprende:

- a) medir *in vitro* el nivel de un péptido natriurético del grupo BNP y NTproBNP en el paciente,
- b) diagnosticar el riesgo del paciente mediante comparación del nivel medido con uno o más niveles conocidos asociados a diferentes grados de riesgo en un paciente,
- c) en el que,
 - ca) en el caso de que se diagnostique que el riesgo no se encuentra incrementado, se recomienda el inicio del tratamiento y/o

cb) en el caso de que se diagnostique que el riesgo se encuentra incrementado o altamente incrementado, se recomienda no llevar a cabo el tratamiento.

5 El compuesto que presenta propiedades inhibitoras de Cox-2 (también denominado inhibidor de Cox-2) también puede ser cualquier compuesto que presente propiedades antiinflamatorias (por ejemplo puede ser un esteroide o NSAID). Más preferentemente, el compuesto es un inhibidor selectivo de Cox-2.

10 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, resulta evidente que los métodos preferentemente se llevan a cabo antes de administrar el compuesto en cuestión.

10 El compuesto que presenta propiedades inhibitoras de Cox-2 (también denominado inhibidor de Cox-2) también puede ser cualquier compuesto que presente propiedades antiinflamatorias (por ejemplo puede ser un esteroide o NSAID). Más preferentemente, el compuesto es un inhibidor selectivo de Cox-2.

15 La presente solicitud proporciona métodos simples y económicos, y medios para cribar pacientes que están a punto de recibir medicación con un compuesto que presenta propiedades inhibitoras de Cox-2, particularmente un inhibidor selectivo de Cox-2, para su riesgo de desarrollar una complicación cardiovascular como consecuencia de dicha medicación. Dicha medicación puede comprender cualquier fármaco o compuesto antiinflamatorio que presenta propiedades inhibitoras de Cox-2, en particular un NSAID, esteroide, inhibidor selectivo de Cox-2 ó cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, dicha medicación puede comprender el tratamiento combinado con un esteroide y un inhibidor selectivo de Cox-2 ó puede comprender el tratamiento combinado con un inhibidor selectivo de Cox-2 y otro NSAID (ver también el Ejemplo 5). La presente invención proporciona además niveles de hormonas cardíacas que indican la existencia o la severidad de un riesgo cardiovascular en pacientes con o sin síntomas evidentes de un trastorno cardiovascular y/o de una enfermedad cardiovascular.

25 Puede suponerse que los pacientes con un trastorno cardiovascular en su historial clínico (infarto de miocardio, angina de pecho inestable, enfermedad arterial coronaria, insuficiencia cardíaca, CABG (injerto de derivación arterial coronaria), ictus) o los pacientes con un trastorno inflamatorio subyacente, tal como poliartritis crónica, osteoartritis o artritis reumatoide u otros trastornos reumatoides, presentan una predisposición a la aparición de complicaciones cardiovasculares. En la artritis reumatoide, la tasa de muerte cardiovascular es particularmente alta por diversos motivos.

35 Además, puede suponerse que los individuos que presentan un historial de enfermedad cardiovascular (es decir, individuos que sufren, por ejemplo, angina de pecho estable (APE) e individuos con síndromes coronarios agudos (SCA)) presentan una predisposición a la aparición de complicaciones cardiovasculares. Los pacientes de ACS pueden manifestar angina de pecho inestable (API) o estos individuos pueden haber sufrido ya un infarto de miocardio (IM) El IM puede ser un IM con elevación de ST o un IM sin elevación de ST. A la aparición de un IM puede seguir una disfunción ventricular izquierda (DVI). Finalmente, los pacientes de DVI experimentan insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) con una tasa de mortalidad de aproximadamente 15%.

40 Entre los síntomas de las enfermedades cardiovasculares pueden incluirse, por ejemplo, nuevas ondas Q o bloqueo de una rama, signos de ictus no fatal, la aparición o empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, según sugiera el desarrollo de edema o el empeoramiento del edema preexistente de las extremidades inferiores, rales en la auscultación o congestión pulmonar, nueva aparición de hipertensión arterial o empeoramiento de hipertensión arterial preexistente, y trombosis venosa.

50 Los síntomas de las enfermedades cardiovasculares se han clasificado en un sistema de clasificación funcional según la New York Heart Association (NYHA). Los pacientes de clase I no presentan síntomas evidentes de enfermedad cardiovascular. La actividad física no se encuentra limitada y la actividad física ordinaria no causa fatiga indebida, palpitaciones o disnea (falta de aliento). Los pacientes de clase II presentan una ligera limitación de la actividad física. Se encuentran cómodos en reposo, pero la actividad física ordinaria resulta en fatiga, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase III presentan una limitación marcada de la actividad física. Se encuentran cómodos en reposo, pero una actividad inferior a la ordinaria resulta en fatiga, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase IV no pueden realizar ninguna actividad física sin experimentar molestias. Muestran síntomas de insuficiencia cardíaca en reposo. En el caso de que realicen cualquier actividad física, se incrementan las molestias.

55 En el contexto de la presente solicitud, una complicación cardiovascular según la presente invención finalmente puede causar síntomas, particularmente síntomas según NYHA de clase II-IV, más particularmente según NYHA de clase III-IV.

60 La presente solicitud resulta particularmente ventajosa para identificar pacientes de riesgo que no muestran síntomas de una enfermedad, riesgo o complicación cardiovascular preexistente. La presente invención también resulta útil para confirmar o realizar el seguimiento del estado de riesgo del paciente que muestra síntomas de una enfermedad cardiovascular.

Los pacientes que presentan una enfermedad cardiovascular subyacente pueden excluirse *per se* del tratamiento con un compuesto que presenta actividad inhibidora de Cox-2, particularmente un inhibidor selectivo de Cox-2, en el caso de que el paciente muestre síntomas que permitan estratificar el riesgo del paciente de sufrir una complicación cardiovascular, es decir, sin medir el nivel de una hormona cardiaca. Dicha exclusión se produce en particular en
 5 pacientes que sufren enfermedades cardiacas coronarias isquémicas, que han sufrido un infarto o en pacientes clasificados según NYHA en las clases III-IV. Aunque un compuesto que presenta actividad inhibidora de Cox-2, particularmente un inhibidor selectivo de Cox-2, no debe administrarse en estos pacientes, la medición de una hormona cardiaca según la invención podría permitir la estabilización de riesgos individual y el inicio de un
 10 tratamiento del paciente con un compuesto que presente actividad inhibidora de Cox-2, particularmente un inhibidor selectivo de Cox-2, y/o una supervisión del tratamiento, en el caso de que exista una necesidad del tratamiento o éste se encuentre altamente recomendado.

En los casos en los que los síntomas no permitan una clasificación inequívoca del paciente (y, por lo tanto, no permitan una decisión de excluir el paciente del tratamiento con un compuesto que presenta actividades inhibidoras de Cox-2), o en casos en los que el paciente no muestra un riesgo reconocible de sufrir una complicación cardiovascular, puede llevarse a cabo una evaluación de riesgos individual tras medir las hormonas cardiacas. La evaluación individual se lleva a cabo en particular en pacientes pertenecientes a grupos de riesgo, es decir, que presentan un historial de determinadas enfermedades o una historia vital que es conocido que incrementa la probabilidad de sufrir una complicación cardiovascular.

La evaluación de riesgos individual en particular resulta beneficiosa en los grupos de pacientes siguientes: pacientes clasificados según NYHA en la clase I-II, pacientes que sufren de diabetes, hiperlipemia, hipertonicidad, en fumadores y en pacientes de edad avanzada, por ejemplo mayores de 55 años.

La utilización de hormonas cardiacas y péptidos natriuréticos como marcadores moleculares o bioquímicos es conocida. En la patente WO n° 02/089657 se ha sugerido medir el péptido natriurético cerebral (PNC) para diagnosticar diversas disfunciones miocárdicas. En la patente WO n° 02/083913 se ha sugerido utilizar BNP para predecir la morbilidad o mortalidad a corto plazo en pacientes con síndromes coronarios agudos sin elevación de ST. En una solicitud de patente europea previamente no publicada (EP n° 1.577.673 A1) se ha sugerido utilizar péptidos natriuréticos para diagnosticar el riesgo de un paciente de sufrir una complicación cardiovascular como consecuencia de un incremento del volumen intravasal.

La presente solicitud resulta particularmente ventajosa para el médico generalista, para médicos especialistas y para salas, departamentos o clínicas especializados, que frecuentemente no disponen de acceso a exámenes cardiológicos extensivos realizados por cardiólogos. La presente invención proporciona medios y métodos para dichos no cardiólogos para el cribado simple y fiable de pacientes y la identificación de aquellos pacientes que presentan un riesgo cardiovascular respecto a la administración de un inhibidor de Cox o de un fármaco antiinflamatorio, en particular respecto a la administración de un NSAID, un esteroide o un inhibidor selectivo de Cox-2. Preferentemente, la decisión sobre continuar o iniciar el tratamiento con el inhibidor de Cox-2, en particular el NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2, será tomada por un médico. Más preferentemente, la decisión sobre continuar o iniciar el tratamiento con el inhibidor de Cox-2, en particular el NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2, será tomada por un cardiólogo o tras la consulta con un cardiólogo. Lo anterior resulta aplicable en particular a casos en los que se miden niveles elevados de la hormona u hormonas cardiacas o el péptido o péptidos natriuréticos. En los casos en los que se diagnostica que el paciente no presenta riesgo cardiovascular, la decisión de continuar o iniciar el tratamiento con un compuesto inhibidor de Cox-2, particularmente un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2, puede ser tomada por un médico no cardiólogo.

La solicitud se beneficia de determinados marcadores bioquímicos o moleculares. Las expresiones "marcador bioquímico" y "marcador molecular" son conocidas por el experto en la materia. En particular, los marcadores bioquímicos o moleculares son productos de expresión génica que se expresan diferencialmente (es decir, se encuentran regulados positiva o negativamente) en presencia o en ausencia de una determinada condición, enfermedad o complicación. Habitualmente, se define marcador molecular como un ácido nucleico (tal como un ARNm), mientras que un marcador bioquímico es una proteína o péptido. El nivel de un marcador bioquímico o molecular adecuado puede indicar la presencia o ausencia de la condición, enfermedad, riesgo o complicación, y de esta manera permitir el diagnóstico.

La presente solicitud se beneficia particularmente de los péptidos natriuréticos como marcadores bioquímicos. Debe indicarse que los péptidos natriuréticos pueden ser secretados en respuesta a la isquemia. Además, en el contexto de la presente invención se considera la utilización de combinaciones de cualesquiera péptidos natriuréticos a modo de marcadores bioquímicos.

Los péptidos natriuréticos según la presente solicitud comprenden péptidos de tipo BNP y variantes de los mismos (ver, por ejemplo, Bonow R.O., New insights into the cardiac natriuretic peptides, Circulation 93: 1946-1950, 1996).

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

El prepro péptido (134 aminoácidos en el caso de pre-proBNP) comprende un péptido de señal corto, que se escinde enzimáticamente para liberar el propéptido (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El propéptido es cortado adicionalmente formando un propéptido N-terminal (NT-propéptido, 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de BNP).

5 Los péptidos natriuréticos preferentes según la presente solicitud son NT-proBNP, BNP y variantes de los mismos. BNP son las hormonas activas y presentan una semivida más corta que sus contrapartidas inactivas respectivas, NT-proBNP. BNP resulta metabolizado en la sangre, mientras que NT-proBNP circula en la sangre en forma de molécula intacta y en esta forma resulta eliminada renalmente. La semivida *in vivo* de NT-proBNP es 120 minutos más prolongada que la de BNP, que es de 20 minutos (Smith M.W., Espiner E.A., Yandle T.G., Charles C.J., Richards A.M. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. J Endocrinol. 167: 239-46, 2000).

15 Los resultados preanalíticos son más robustos con NT-proBNP, permitiendo el fácil transporte 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. Clin. Chem. Lab. Med. 42:942-4, 2004). Las muestras de sangre pueden almacenarse a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o embarcarse sin pérdidas en la recuperación. En contraste, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C conduce a una pérdida de la concentración de por lo menos 20% (Mueller T., Gegenhuber A. *et al.*, Clin. Chem. Lab. Med. 42: 942-4, 2004, *supra*; 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. Clin Chem 50: 867-73, 2004).

25 Por lo tanto, dependiendo del curso temporal o propiedades de interés, puede resultar ventajosa la medición de la forma activa o de las formas inactivas del péptido natriurético. Los péptidos natriuréticos más preferentes según la presente invención son NT-proBNP o variantes del mismo.

30 El término "variantes" en el presente contexto se refiere a péptidos sustancialmente similares a dichos péptidos. La expresión "sustancialmente similar" es perfectamente conocida por el experto en la materia. En particular, 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 presenta una similitud de secuencias a la isoforma más prevalente del péptido de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 85%, más preferentemente de por lo menos 90% y todavía más preferentemente de por lo menos 95%. También son sustancialmente similares los productos de degradación proteolítico que todavía son reconocidos por los medios diagnósticos o por ligandos dirigidos contra el péptido de longitud completa respectivo.

40 El término "variante" se refiere además a un péptido modificado post-traduccionalmente, tal como un péptido glucosilado. Una "variante" también es un péptido que ha sido modificado tras la recolección de la muestra, por ejemplo mediante unión covalente o no covalente de un marcaje, particularmente un marcaje radioactivo o fluorescente, al péptido.

45 La solicitud comprende la medición de diferentes hormonas cardiacas en combinación, simultáneamente o no simultáneamente. Por ejemplo, la medición de diferentes hormonas cardiacas puede proporcionar información adicional importante, por ejemplo sobre el curso temporal de una complicación cardiovascular en desarrollo. Por lo tanto, la presente invención se refiere además a la medición de un péptido de tipo BNP o a una variante del mismo.

50 El término "diagnosticar" es conocido por el experto en la materia. Se entiende que diagnosticar se refiere a tomar conciencia de una condición médica, enfermedad, complicación o riesgo particular. También puede entenderse que diagnosticar se refiere a detectar o determinar la presencia de una condición médica, enfermedad, complicación o riesgo particular. Diagnosticar según la presente invención también incluye el seguimiento, confirmación, subclasificación y predicción de la enfermedad, complicación o riesgo relevante. El seguimiento se refiere a llevar un control de un riesgo o complicación ya diagnosticado, por ejemplo para analizar una elevación o reducción del riesgo o la influencia de un tratamiento particular sobre la elevación o reducción del riesgo. La confirmación se refiere a la corroboración o respaldo de un diagnóstico ya realizado utilizando otros indicadores o marcadores. La subclasificación se refiere a la definición adicional de un diagnóstico según diferentes subclases del riesgo de enfermedad diagnosticado, por ejemplo definir como riesgo incremento o riesgo altamente incrementado. La predicción se refiere a la evaluación de un riesgo cardiovascular antes de que se pongan de manifiesto o se hayan alterado significativamente otros síntomas o marcadores.

65 Los individuos que sufren una enfermedad cardiovascular pueden ser individuos que sufren angina de pecho estable (APE) e individuos con síndromes coronarios agudos (SCA). Los pacientes de ACS pueden manifestar angina de pecho inestable (API) o estos individuos pueden haber sufrido ya un infarto de miocardio (IM) El IM puede ser un IM con elevación de ST o un IM sin elevación de ST. A la aparición de un IM puede seguir una disfunción ventricular

izquierda (DVI). Finalmente, los pacientes de DVI experimentan insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) con una tasa de mortalidad de aproximadamente 15%.

5 Además, los individuos que sufren una complicación cardiovascular pueden ser individuos que sufren un ictus. El término "ictus" se refiere a cualquier suceso cerebrovascular en el que el flujo de sangre a regiones pequeñas o grandes del cerebro se interrumpe, por ejemplo debido a una hemorragia en el cerebro o a una trombosis de una arteria cerebral. Un ictus puede resultar en una pérdida temporal de la conciencia o en parálisis. En este caso, el ictus se denomina "ictus apoplético".

10 Los individuos pueden manifestar síntomas clínicos (por ejemplo disnea, dolor torácico; ver también la clasificación de NYHA, posteriormente) y pueden ser asintomáticos. Aunque la presente invención resulta particularmente ventajosa para identificar los pacientes de riesgo que no muestran síntomas de una enfermedad, riesgo o complicación cardiovascular preexistente, también resulta útil en otros contextos, por ejemplo para confirmar o seguir el estado de riesgo del paciente que muestra síntomas de una enfermedad cardiovascular.

15 La expresión "riesgo cardiovascular" se refiere al riesgo de desarrollar una complicación cardiovascular.

20 La presente solicitud se refiere a la insuficiencia cardiaca que se desarrolla como consecuencia de la administración de un fármaco antiinflamatorio o inhibidor de Cox-2, particularmente un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2. Las complicaciones cardiovasculares también se conocen como "sucesos cardiovasculares". A continuación se utiliza única o mayoritariamente la expresión "complicación cardiovascular".

25 La expresión "insuficiencia cardiaca" es conocida por el experto en la materia. De esta manera, una insuficiencia cardiaca según la presente invención se refiere a insuficiencia cardiaca (particularmente insuficiencia cardiaca aguda) conocida por el experto en la materia. La trombosis arterial puede provocar síndromes coronarios (por ejemplo infarto de miocardio agudo o ictus).

30 Particularmente, la expresión "complicación cardiovascular" se refiere a una complicación en el sistema arterial, por ejemplo SCA, API, IM con elevación de ST, IM sin elevación de ST, o ictus.

Más particularmente, la expresión "complicación cardiovascular" se refiere a IM, IM con elevación de ST, IM sin elevación de ST, o ictus.

35 Los síntomas de las enfermedades cardiovasculares son conocidos por el experto en la materia y pueden incluir, por ejemplo, nuevas ondas Q o el bloqueo de una rama, signos de ictus no fatal, la aparición o empeoramiento de insuficiencia cardiaca, tal como sugiere el desarrollo de edema o el empeoramiento de edema preexistente de las extremidades inferiores, rales en la auscultación o congestión pulmonar, nueva aparición de hipertensión arterial o empeoramiento de la hipertensión arterial preexistente, y trombosis venosa.

40 Los síntomas de las enfermedades cardiovasculares se han clasificado en un sistema de clasificación funcional según la New York Heart Association (NYHA). Los pacientes de Clase I no presentan síntomas evidentes de enfermedad cardiovascular. La actividad física no se encuentra limitada y la actividad física ordinaria no causa fatiga indebida, palpitaciones o disnea (falta de aliento). Los pacientes de clase II presentan una ligera limitación de la actividad física. Se encuentran cómodos en reposo, pero la actividad física ordinaria resulta en fatiga, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase III presentan una limitación marcada de la actividad física. Se encuentran cómodos en reposo, pero una actividad inferior a la ordinaria resulta en fatiga, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase IV no pueden realizar ninguna actividad física sin experimentar molestias. Muestran síntomas de insuficiencia cardiaca en reposo. En el caso de que realicen cualquier actividad física, se incrementan las molestias.

50 Una complicación cardiovascular finalmente puede provocar síntomas, particularmente síntomas según la NYHA de clase II-IV, más particularmente según NYHA de clase III-IV.

55 Otra característica de una complicación o insuficiencia cardiovascular puede ser la "fracción de eyección ventricular izquierda" (FEVI), también conocida como "fracción de eyección". Las personas con un corazón sano habitualmente presentan una FEVI intacta, que se describe generalmente como superior a 50%. La mayoría de personas con una enfermedad cardiaca sistólica que es sintomática generalmente presentan una FEVI de 40% o inferior.

Una complicación cardiovascular (por ejemplo IM) finalmente puede resultar en una FEVI de 40% o inferior.

60 Una insuficiencia cardiaca puede ser "compensada" o "descompensada". El término "compensada" se refiere a que la demanda corporal habitual de oxígeno todavía puede ser satisfecha, mientras que "descompensada" se refiere a que la demanda corporal habitual de oxígeno ya no es satisfecha.

65 El término "diagnosticar" referido a la insuficiencia cardiaca según la presente invención incluye diagnosticar (es decir, tomar conciencia) de una insuficiencia cardiaca, aunque también el seguimiento de una elevación o reducción de una insuficiencia cardiaca preexistente o conocida.

El término "paciente" según la presente solicitud se refiere a un individuo sano, a un individuo aparentemente sano, o particularmente a un individuo que sufre una enfermedad. El paciente puede ser un individuo tanto varón como mujer, ya que la presente invención resulta adecuada para diagnosticar ambos grupos. Particularmente, el paciente que sufre y/o es tratado de reumatismo, artritis reumatoide (poliartritis crónica), osteoartritis, artritis psoriática, espondiloartropatía u otras enfermedades inflamatorias u osteoartritis. El paciente también puede sufrir de ulceraciones o cáncer. En el presente contexto debe indicarse que las enfermedades anteriormente mencionadas son enfermedades en las que la administración de compuestos que presentan propiedades inhibitorias de Cox-2 (tales como fármacos antiinflamatorios), en particular los NSAID, los esteroides o los inhibidores selectivos de Cox-2, se considera parte del tratamiento. Todavía más particularmente, el paciente no presenta historial conocido de riesgo o complicación cardiovascular, y/o ningún síntoma o pocos síntomas de un riesgo o complicación cardiovascular, y/o no está siendo tratado por una enfermedad, riesgo o complicación cardiovascular. Sin embargo, también individuos sanos que no presentan signos o historia de un riesgo o complicación cardiovascular se consideran pacientes según la presente invención.

Preferentemente, el paciente se tratar o será tratado inminentemente con un fármaco antiinflamatorio. Este tipo de paciente se entiende que es un "candidato" para el tratamiento con dicho fármaco. Más preferentemente, el paciente se trata o será tratado inminentemente con un inhibidor selectivo de Cox-2. Dicho paciente se entiende que es un "candidato" para el tratamiento con un inhibidor selectivo de Cox-2. Evidentemente el tratamiento con el fármaco o inhibidor selectivo de Cox-2 respectivo en general debería considerarse una opción de tratamiento recomendable.

Son conocidas por el experto en la materia las circunstancias bajo las que una complicación cardiovascular puede considerarse que aparece "como consecuencia" de la administración de un fármaco antiinflamatorio o de un inhibidor de Cox-2, en particular de un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2. Debe entenderse que puede no resultar posible o necesario establecer definitivamente la relación causal. Puede resultar suficiente establecer una probabilidad suficientemente alta de que la complicación cardiovascular ha sido precipitada, o será precipitada, por la administración del fármaco antiinflamatorio o inhibidor de Cox-2, en particular de un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2. Por ejemplo, el estudio APPROVE muestra una diferencia de prácticamente cuatro veces del número de complicaciones cardiovasculares entre el grupo de ensayo y el grupo de placebo. Para el propósito de la presente invención, puede estar justificado suponer que cualquier complicación cardiovascular en un paciente bajo tratamiento con un inhibidor selectivo de Cox-2 también ha sido provocada por el tratamiento. De esta manera, la presente invención se refiere además al diagnóstico del riesgo de sufrir una complicación cardiovascular tras la administración de un fármaco antiinflamatorio, inhibidor de Cox-2, NSAID o inhibidor selectivo de Cox-2.

Además, para el experto en la materia resultarán familiares los métodos o signos que indican una relación causal. Por ejemplo, una relación temporal entre la administración del fármaco y la manifestación de una complicación cardiovascular siempre es un indicador de que el fármaco ha sido causal para la complicación o que ha "precipitado" la complicación. Por ejemplo, el incremento del número de complicaciones cardiovasculares en el estudio APPROVE resultó evidente tras 18 meses de tratamiento. En otro ejemplo, en el caso de que la severidad de la complicación cardiovascular se correlacione con la cantidad del fármaco administrado, puede indicar una relación causal. Por ejemplo, los cambios patológicos en un ecocardiograma o electrocardiograma pueden mejorar al interrumpir el tratamiento con el fármaco. En un ejemplo particular, el nivel de una o más hormonas cardíacas puede seguirse antes y durante la administración del fármaco antiinflamatorio. En el caso de que el nivel de la hormona cardíaca se incremente al iniciar el tratamiento y se reduzca tras interrumpir el tratamiento con el fármaco, lo anterior indica que el fármaco está causando una elevación del riesgo cardiovascular. De manera similar, en el caso de que el nivel se correlacione con la dosis del fármaco, también indica que el fármaco está causando una elevación del riesgo cardiovascular. Cualquier complicación cardiovascular que se manifieste bajo dichas circunstancias probablemente está causado por la administración del fármaco. Lo anterior resulta todavía más probable en el caso de que el incremento del nivel de hormona cardíaca con la administración del fármaco sea inusualmente elevado en comparación con otros pacientes o en el caso de que un pequeño incremento de la dosis provoque un incremento inusualmente acusado del nivel de la hormona cardíaca.

Los fármacos antiinflamatorios son conocidos por el experto en la materia. Particularmente, entre dichos fármacos se incluyen los antirreumáticos no esteroideos (también conocidos como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, NSAID), los inhibidores de Cox-2, los corticoesteroides y los inhibidores de TNF.

Entre los ejemplos de fármacos antiinflamatorios se incluyen Alclofenac; Dipropionato de Alclometasona; Acetonido de Algestona; Alfa Amilasa; Amcinafal; Amcinafida; Amfenac Sódico; Hidrocloruro de Amiprilosa; Anakinra; Anirolac; Anitrazafeno; Apazona; Balsalazida Disódica; Bendazac; Benoxaprofeno; Hidrocloruro de Bencidamina; Bromelaínas; Broperamol; Budesónido; Carprofeno; Cicloprofeno; Cintazona; Cliprofeno; Propionato de Clobetasol; Butirato de Clobetasona; Clopirac; Propionato de Cloticasona; Acetato de Cormetasona; Cortodoxona; Celecoxib; Rofecoxib (VIOXX); Etoricoxib; Valdecoxib; Parecoxib; lumiracoxib; Deflazacort; Desónido; Desoximetasona; Dipropionato de Dexametasona; Diclofenac; Diclofenac Potásico; Diclofenac Sódico; Diacetato de Diflorasona; Diflumidona Sódica; Diflunisal; Difluprednato; Diftalona; DimetilSulfóxido; Drocinnonida; Endrisona; Enlimomab; Enolicam Sódica; Epirizol; Etodolac; Etofenamato; Felbinac; Fenamol; Fenbufeno; Fenclofenac; Fenclorac; Fendosal; Fenpipalona; Fentiazac; Flazalona; Fluazacort; Ácido Flufenámico; Flumizol; Acetato de Flunisólido; Flunixinina; Flunixinina Meglumina; Fluocortina Butilo; Acetato de Fluormetolona; Fluquazona; Flurbiprofeno;

Fluretofenol; Propionato de Fluticasona; Furaprofeno; Furobufeno; Halcinonida; Propionato de Halobetasol; Acetato de Halopredona; Ibufenac; Ibuprofeno; Ibuprofeno Aluminio; Ibuprofeno Piconol; Ilonidap; Indometacina; Indometacina Sódica; Indoprofeno; Indoxol; Intrazol; Acetato de Isoflupredona; Isoxepac; Isoxicam; Ketoprofeno; Hidrocloruro de Lofemizol; Lomoxicam; Etabonato de Loteprednol; Meclofenamato Sódico; Ácido Meclofenámico; Dibutirato de Meclorisona; Ácido Mefenámico; Meloxicam (Mobic™); Mesalamina; Meseclazona; Suleptanato de Metilprednisolona; Morniflumato; Nabumetona; Naproxeno; Naproxeno Sódico; Naproxol; Nimazona; Olsalazina Sódica; Orgoteína; Orpanoxina; Oxaprozina; Oxifenbutazona; Hidrocloruro de Paranilina; Polisulfato de Pentosan Sódico; Glicerato de Fenbutazona Sódica; Pírfenidona; Piroxicam; Piroxicam Cinamato; Piroxicam Olamina; Pirprofeno; Prednazato; Prifelona; Ácido Prodólico; Procuazona; Proxazol; Citrato de Proxazol; Rimexolona; Romazarit; Salcolex; Salnacedina; Salsalato; Salicilatos; Cloruro de Sanguinarium; Seclazona; Sermetacina; Sudoxicam; Sulindac; Suprofenol; Talmetacina; Talniflumato; Talosalato; Tebufelona; Tenidap; Tenidap Sódico; Tenoxicam; Tesicam; Tesimida; Tetridamina; Tiopinac; Pivalato de Tixocortol; Tolmetina; Tolmetina Sódica; Triclónido; Triflumidato; Zidometacina; Zomepirac Sódico; Etanercept; Lenercept; Infliximab; Cortisona; Fluocortolona; Hidrocortisona; Metil-prednisolona; Prednisolona; Prednisona; Prednilideno.

En su caso, se encuentra comprendido en la presente invención medir la hormona cardiaca o péptido natriurético, NT-proBNP, administrando previamente también cualquiera de los compuestos anteriormente mencionados.

La expresión "antirreumáticos no esteroideos" (también denominados fármacos antiinflamatorios no esteroideos o NSAID) es conocida por el experto en la materia. Los NSAID inhiben las ciclooxigenasas (también conocidas como prostaglandina-H-sintetasas). Las ciclooxigenasas catalizan la reacción a partir del ácido araquidónico en prostaglandina H2 (un endoperóxido cíclico), que es el precursor de la prostaglandina I2 (también conocida como prostaciclina), tromboxano A2 y otras prostaglandinas. Las prostaglandinas desempeñan un papel significativo en el dolor, la fiebre y en reacciones inflamatorias. Existen dos isoformas de las ciclooxigenasas, Cox-1 y Cox-2. El gen de Cox-2 es un gen temprano inmediato y resulta inducido bajo condiciones de daños a los tejidos, reacciones de dolor o reacciones inflamatorias. De esta manera, entre los NSAID se incluyen los inhibidores de Cox-1 y los inhibidores de Cox-2. Los NSAID pueden inhibir ambas isoformas o pueden ser selectivos para una isoforma (es decir, inhiben únicamente una de las dos isoformas a la dosis terapéutica).

Entre los ejemplos de NSAID no específicos se incluyen ibuprofeno, flurbiprofeno, naproxeno, ácido flufenámico, ácido mefenámico, piroxicam, diclofenax, glicerato de fenbutazona sódica, indometacina y tenoxicam.

Los inhibidores selectivos de Cox-2 según la presente invención son compuestos que, bajo condiciones terapéuticas, inhiben la expresión o, preferentemente, la función enzimática de Cox-2, mientras que no inhiben significativamente la expresión o, preferentemente, la función enzimática de Cox-1. Entre los ejemplos de inhibidores selectivos de Cox-2 se incluyen coxibes (por ejemplo celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib, parecoxib (un profármaco de valdecoxib), lumiracoxib), meclofenamato, sulfuro de sulindac, diclofenac, nimesúlido, meloxicam, etodolac, NS398, L-745,337 y DFP (3-(2-propiloxi)-4-(4-metilsulfonilfenil)-5,5-dimetilfuranona). Los últimos tres compuestos se describen en Warner T.D. *et al.*, 1999.

La función enzimática de las dos ciclooxigenasas puede medirse según métodos conocidos de la técnica, incluyendo ensayos *in vivo* o *in vitro* adecuados. Un marcador típico de la función enzimática de Cox-1 es la formación de tromboxano A2, mientras que un marcador típico de la función enzimática de Cox-2 es la formación de las prostaglandinas (por ejemplo la prostaglandina E2 de macrófagos).

Se han publicado ejemplos de sistemas de ensayo adecuados (por ejemplo Warner T.D., Giuliano F., Vojnovic I. *et al.*, (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full *in vitro* analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 96., páginas 7563-7568, 1999; se ha publicado una fe de errata relevante en vol. 96(17), página 9966d). Este ensayo se denomina en lo sucesivo Ensayo Modificado de William Harvey. El ensayo se describe en detalle en Warner T.D. *et al.*, *supra*, en las páginas 7563-4, la descripción del cual se incorpora expresamente como referencia en la presente memoria.

Preferentemente, un inhibidor selectivo de Cox-2 según la presente invención es 5 veces más selectivo de Cox-2 según el Ensayo Modificado de William Harvey, más preferentemente más de 50 veces más selectivo de Cox-2 según el Ensayo Modificado de William Harvey (ver Warner T.D. *et al.*, *supra*, fig. 3 en la página 7567).

Alternativamente, el inhibidor selectivo de Cox-2 según la presente solicitud es un compuesto que preferentemente es más selectivo para Cox-2 que el diclofenac, más preferentemente más selectivo de Cox-2 que el nimesúlido, todavía más preferentemente por lo menos tan selectivo de Cox-2 como el celecoxib bajo condiciones terapéuticas.

La presente solicitud se refiere a medios y métodos para diagnosticar el riesgo cardiovascular de un paciente que es un candidato para la administración de un "coxibe". Entre los ejemplos de coxibes se incluyen celecoxib (Celebrex™, Pfizer), rofecoxib (VIOXX™, Merck), etoricoxib, valdecoxib, parecoxib (un profármaco del valdecoxib), lumiracoxib (Prexige™, Novartis). Otros compuestos similares, algunos de los cuales se encuentran bajo desarrollo y examen, también se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

El mecanismo patológicamente actualmente comentado para los efectos secundarios cardiovasculares no deseados de los inhibidores selectivos de Cox-2 puede ser el siguiente: a la inhibición de la formación de prostaglandina I₂ (PGI₂) se atribuye un papel importante en la génesis de dichos sucesos cardiovasculares. PGI₂ conduce a la inhibición de la agregación de los trombocitos, a vasodilatación y a la prevención de la proliferación de las células musculares lisas *in vitro*.

Por otra parte, el tromboxano A₂, el producto de COX-1 más importante de las plaquetas conduce a la agregación de las plaquetas, a vasoconstricción y a proliferación vascular. Se sospecha que la interferencia con el equilibrio entre PGI₂ y el tromboxano A₂ estimula la activación intravascular de la hemostasis, conduce a un incremento de la presión sanguínea e intensifica la aceleración de la aterosclerosis.

De esta manera, la presente solicitud se refiere además a la utilización de hormonas cardiacas para evaluar el riesgo cardiovascular de un paciente con respecto a la administración de un fármaco antiinflamatorio, en la que el riesgo cardiovascular está provocado por una perturbación del equilibrio entre Cox-1 y la inhibición de Cox-2, y/o el metabolismo de las prostaglandinas y/o el equilibrio entre PGI₂ y el tromboxano A₂, más particularmente la inhibición de la formación de PGI₂. La presente invención se refiere además a la utilización de hormonas cardiacas para evaluar el riesgo cardiovascular de un paciente con respecto a la administración de un fármaco antiinflamatorio que estimula la trombosis intravascular y/o conduce a un incremento de la presión sanguínea y/o intensifica la aceleración de la aterosclerosis. Más preferentemente, la presente invención no se refiere a la utilización de hormonas cardiacas para evaluar el riesgo de sufrir una complicación cardiovascular, en la que el riesgo se debe a un incremento del volumen sanguíneo o del volumen intravasal (sobrecarga de volumen).

En el presente contexto, el término "esteroide" se utiliza como abreviatura del término "corticoesteroide". Se cree generalmente que los corticoesteroides ejercen su actividad antiinflamatoria mediante su influencia sobre el metabolismo de las prostaglandinas. Entre los ejemplos de corticoesteroides según la presente invención se incluyen cortisona, fluocortolona, hidrocortisona, metil-prednisolona, prednisolona, prednisona y prednildeno.

También se utilizan inhibidores de TNF como fármacos antiinflamatorios, en particular en pacientes con artritis reumatoide (se observaron concentraciones incrementadas de TNF- α en pacientes que sufren artritis reumatoide). La inhibición de TNF- α también reduce la formación de IL-1 e IL-6. Entre los ejemplos de inhibidores de TNF se incluyen Etanercept, Lenercept (un análogo de Etanercept), Infliximab y D2E7 (un anticuerpo monoclonal completamente humanizado contra TNF- α).

En otra realización preferente, la presente solicitud se refiere a medir adicionalmente el nivel de por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste de: (a) marcadores de inflamación, (b) marcadores de la función endotelial, (c) marcadores de isquemia, (d) marcadores de la activación de los trombocitos, (e) marcadores de la activación de la aterosclerosis, y (f) marcadores de la activación intravascular de la coagulación.

La medición de un marcador adicional puede incrementar la selectividad y especificidad del diagnóstico. También puede servir para confirmar un diagnóstico establecido mediante la medición del nivel de un péptido natriurético.

Los marcadores de inflamación según la presente invención incluyen cualesquiera marcadores indicativos de un proceso inflamatorio, particularmente un proceso inflamatorio vascular o arterial. Particularmente, los marcadores de inflamación según la presente invención comprenden citoquinas inflamatorias activas. Entre los ejemplos de marcadores de inflamación se incluyen interferones (por ejemplo el interferón γ), las interleuquinas (por ejemplo IL-1, IL-6, IL-8), el factor de necrosis tumoral (TNF- α), CRP (proteína C-reactiva), CRP_{hs} (proteína C-reactiva de alta sensibilidad).

Los marcadores de la función endotelial según la presente solicitud comprenden cualesquiera marcadores indicativos de procesos de reparación intravascular, incluyendo las citoquinas relacionadas con dichos procesos. Entre los ejemplos de dichos marcadores se incluyen las selectinas (por ejemplo la selectina E y la selectina P), ICAM-1 (molécula 1 de adhesión intercelular), VCAM-1 (molécula 1 de adhesión celular vascular), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF- α , TGF- β , catecolaminas, prostaglandinas, angiotensina, endotelina y NO (óxido nítrico). Aunque ya se han mencionado como marcadores de inflamación, TNF- α , TNF- β e IL-1 también puede considerarse que pertenecen al grupo de los marcadores de la función endotelial.

Los marcadores de isquemia según la presente solicitud comprenden cualesquier marcadores indicativos de un suministro de oxígeno insuficiente que resulta en isquemia. Particularmente, el suministro insuficiente de oxígeno es local y cualquier isquemia resultante también es local. Dicha isquemia local puede estar provocada por trombosis arterial que limita el flujo sanguíneo al tejido diana de la arteria afectada.

Entre los ejemplos de marcadores de isquemia se incluyen albúmina modificada isquémica (AMI) y troponinas de alta sensibilidad (por ejemplo TnI y TnT).

Los marcadores de activación de los trombocitos según la presente solicitud comprenden cualesquier marcadores indicativos de activación o agregabilidad de las plaquetas sanguíneas. Un marcador preferente es el ligando de

5 CD40 soluble (sCD40L). Debe entenderse que la activación de los trombocitos o la agregabilidad de las plaquetas también pueden medirse mediante el análisis de una muestra de plasma sanguíneo rica en trombocitos. Tras obtener la muestra, se añade una sustancia inductora y se mide el curso temporal de la agregación de los trombocitos a partir de la reducción de la turbidez. La reducción de la turbidez está causada por la agregación de las muchas plaquetas pequeñas en agregados de mayor tamaño, lo que reduce la dispersión de la luz. La sustancia inductora puede ser cualquier sustancia considerada apropiada por el experto en la materia (por ejemplo la adenosina difosfato (ADP), la serotonina, el colágeno, la proteasa o la ristocetina). El diagnóstico puede llevarse a cabo mediante comparación del resultado de la medición con el resultado del mismo experimento en una muestra de control o en un grupo de control. Por lo tanto, dicho ensayo puede considerarse un marcador según la presente invención.

15 Los marcadores de activación de la aterosclerosis según la presente solicitud comprenden cualesquier marcadores indicativos de progresión de la aterosclerosis. Entre los ejemplos de marcadores de la activación de la aterosclerosis se incluyen la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2).

Entre los ejemplos de marcadores de activación intravascular de la coagulación se incluyen los productos de degradación del fibrinógeno, D-dímero e inhibidor del activador del plasminógeno.

20 El diagnóstico según la presente solicitud preferentemente se lleva a cabo mediante la utilización de un medio diagnóstico. Un medio diagnóstico es cualquier medio que permita medir la cantidad o la concentración de una sustancia de interés, particularmente un péptido o polipéptido de interés, más particularmente una hormona cardiaca.

25 Los métodos y medios diagnósticos que pueden utilizarse para determinar los niveles de los péptidos respectivos son conocidos por el experto en la materia. Entre estos métodos se incluyen los métodos basados en microplaca de ELISA, los inmunoensayos totalmente automáticos o robóticos (disponibles en, por ejemplo, los analizadores Elecsys™), CBA (un ensayo enzimático de unión del cobalto, disponible en, por ejemplo, los analizadores Roche-Hitachi™) y los ensayos de aglutinación en látex (disponibles en, por ejemplo, los analizadores Roche-Hitachi™).

30 Además, al experto en la materia le resultarán familiares diferentes métodos de medición del nivel de un péptido o polipéptido. El término "nivel" se refiere a la cantidad o a la concentración de un péptido o polipéptido en un paciente (más concretamente, en la sangre u orina del paciente) o en una muestra obtenida de un paciente (por ejemplo una muestra de sangre u orina). El término "medir" según la presente solicitud se refiere a determinar la cantidad o la concentración, preferentemente de manera semicuantitativa o cuantitativa, del ácido nucleico, péptido, polipéptido u otra sustancia de interés. La medición puede realizarse directa o indirectamente. La medición indirecta incluye la medición de respuestas celulares, ligandos unidos, marcajes o productos de reacción enzimática.

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

La medición puede llevarse a cabo según cualquier método conocido de la técnica. Se describen los métodos preferentes a continuación.

45 En una realización, el método para medir el nivel de un péptido o polipéptido de interés, particularmente una hormona cardiaca, comprende las etapas de: (a) poner en contacto una célula capaz de una respuesta celular al péptido o polipéptido, con el péptido o polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, y (b) medir la respuesta celular.

50 En otra realización, el método para medir el nivel de un péptido o polipéptido de interés, particularmente una hormona cardiaca, comprende las etapas de: (a) poner en contacto un péptido o polipéptido con un sustrato adecuado durante un periodo de tiempo adecuado, y (b) medir la cantidad de producto.

55 En otra realización, el método para medir el nivel de un péptido o polipéptido de interés, particularmente una hormona cardiaca, 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, y (c) medir la cantidad de ligando unido.

Preferentemente, el péptido o polipéptido se encuentra contenido en una muestra, particularmente un líquido corporal o muestra de tejido, y se mide la cantidad del péptido o polipéptido en la muestra.

60 Los péptidos y polipéptidos (proteínas) pueden medirse en muestras de tejido, células y líquido corporal, es decir, preferentemente *in vitro*. Preferentemente, el péptido o polipéptido de interés se mide en una muestra de líquido corporal.

Una muestra de tejido según la presente solicitud se refiere a cualquier tipo de tejido obtenido del cuerpo humano o animal, muerto o vivo. Pueden obtenerse muestras de tejido mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo mediante biopsia o curetaje.

5 Entre los líquidos corporales según la presente invención pueden incluirse sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, linfa, líquido cerebral, saliva y orina. Particularmente, entre los líquidos corporales se incluyen sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo y orina. Pueden obtenerse muestras de líquidos corporales mediante cualquier método conocido de la técnica.

10 Entre los métodos para obtener muestras celulares se incluyen preparar directamente células individuales o grupos pequeños de células, la disociación de tejido (por ejemplo utilizando tripsina) y la separación de células de líquidos corporales, por ejemplo mediante filtración o centrifugación. Las células según la presente invención también comprenden plaquetas y otras células no nucleadas, por ejemplo eritrocitos.

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

20 Para medir las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade a un cultivo celular y se mide 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.

25 Otros métodos preferentes de medición pueden incluir medir la cantidad de un ligando que se une específicamente al péptido o polipéptido de interés. La unión según la presente invención incluye la unión tanto covalente como no covalente.

30 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, en caso de obtenerse o purificarse a partir del cuerpo humano o animal, pueden modificarse mediante, por ejemplo, glucosilación. Un ligando adecuado según la presente invención puede unirse al péptido o polipéptido también mediante dichos sitios.

35 Preferentemente, el ligando debe unirse específicamente al péptido o polipéptido que debe medirse. La expresión "unión específica" según la presente solicitud se refiere a que el ligando no debe unirse sustancialmente (es decir, "reaccionar cruzadamente") a otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra investigada. Preferentemente, la proteína o isoforma unida específicamente debe unirse con una afinidad por lo menos 3 veces más alta, preferentemente por lo menos 10 veces más alta y todavía más preferentemente por lo menos 50 veces más alta, que cualquier otro péptido o polipéptido relevante.

40 La unión no específica puede ser tolerable, particularmente en el caso de que el péptido o polipéptido investigado todavía pueda distinguirse y medirse inequívocamente, por ejemplo según su tamaño en una transferencia western, o a partir de su abundancia relativamente más alta en la muestra.

45 La unión del ligando puede medirse mediante cualquier método conocido de la técnica. Preferentemente el método es semicuantitativo o cuantitativo. A continuación se describen métodos adecuados.

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

50 En segundo lugar, en el caso de que el ligando también sirva de sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse un producto de una reacción enzimática (por ejemplo la cantidad de una proteasa puede medirse mediante la medición de la cantidad de producto cortado, por ejemplo en una transferencia western).

55 Para la medición de los productos de una reacción enzimática, preferentemente la cantidad de sustrato es saturante. El sustrato también puede marcarse con un marcador detectable previamente a la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para producir una cantidad detectable, preferentemente medible, de producto. En lugar de medir la cantidad de producto, puede medirse el tiempo necesario para la aparición de una cantidad dada (por ejemplo detectable) de producto.

60 En tercer lugar, el ligando puede acoplarse covalente o no covalentemente a un marcaje que permita la detección y medición del ligando.

65 El marcaje puede llevarse a cabo mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcaje directamente (covalente o no covalentemente) con el ligando. El marcaje indirecto implica la unión (covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse

específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con un marcaje adecuado y/o ser la diana (receptor) de la unión de un ligando terciario al ligando secundario. La utilización de ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden más alto con frecuencia se utiliza para incrementar la señal. Entre los ligandos de orden secundario y orden superior adecuados pueden incluirse anticuerpos, anticuerpos secundarios y el bien conocido sistema de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.).

El ligando o sustrato también puede "etiquetarse" con una o más etiquetas conocidas de la técnica. Dichas etiquetas pueden ser dianas para ligandos de orden superior. Entre las etiquetas adecuadas se incluyen biotina, digoxigenina, etiqueta His, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, etiqueta myc, hemaglutinina (HA) del virus de la influenza A, proteína de unión a maltosa, y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta preferentemente se encuentra en el extremo N-terminal y/o C-terminal.

Los marcajes adecuados son cualesquier marcajes detectables mediante un método de detección apropiado. Entre los marcajes típicos se incluyen las partículas de oro, las perlas de látex, el éster de acridán, luminol, rutenio, marcajes enzimáticamente activos, marcajes radioactivos, marcajes magnéticos (por ejemplo "perlas magnéticas", incluyendo marcajes paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcajes fluorescentes.

Entre los marcajes enzimáticamente activos se incluyen, por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la luciferasa y derivados de las mismas. Entre los sustratos adecuados para la detección se incluyen diaminobencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro-azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible en forma de solución madre lista para utilizar de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences) y ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación de enzima-sustrato adecuada puede resultar en un producto de reacción de color, fluorescencia o quimioluminiscencia, que pueden medirse según métodos conocidos de la técnica (por ejemplo utilizando una película fotosensible o un sistema de cámara adecuado). Respecto a la medición de la reacción enzimática, los criterios proporcionados anteriormente se aplican análogamente.

Entre los marcajes fluorescentes típicos se incluyen las proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo de Texas, fluoresceína y los pigmentos Alexa (por ejemplo Alexa 568). Se encuentran disponibles marcajes fluorescentes adicionales de, por ejemplo, Molecular Probes (Oregon). Además, se encuentra contemplada la utilización de puntos cuánticos ("quantum dots") a modo de marcajes fluorescentes.

Entre los marcajes radioactivos típicos se incluyen ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P , ^{33}P y similares. Puede detectarse un marcaje radioactivo mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo una película fotosensible o un Phosphorimager.

Entre los métodos de medición adecuados según la presente solicitud también se incluyen la precipitación (particularmente la inmunoprecipitación), la electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), el RIA (radioinmunoensayo), el ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), ensayos inmunológicos con enzimas de tipo sándwich, los inmunoensayos de electroquimioluminiscencia de tipo sándwich (ECLIA), el fluoroinmunoensayo de disociación incrementada por lantánidos (DELFI), el ensayo de proximidad de centelleo (SPA), la turbidimetría, la nefelometría, la turbidimetría o nefelometría incrementada con látex o los ensayos inmunológicos en fase sólida. Pueden utilizarse métodos adicionales conocidos de la técnica (tales como la electroforesis en gel, la electroforesis en gel 2D, la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), la transferencia western y la espectrometría de masas), solos o en combinación, con marcaje u otros métodos de detección tal como se ha indicado anteriormente.

Entre los ligandos preferentes se incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos, y aptámeros, por ejemplo aptámeros de ácidos nucleicos o de péptidos. Los métodos con dichos ligandos son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, los proveedores comerciales también ofrecen la identificación y producción de anticuerpos y aptámeros adecuados. Al experto en la materia le resultarán familiares los métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos de afinidad o especificidad más elevadas. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones adecuadas en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. A continuación pueden someterse a ensayo dichos derivados para la unión siguiendo procedimientos de cribado conocidos de la técnica, por ejemplo de expresión fágica.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unirse a antígenos o haptenos. La presente invención también incluye anticuerpos híbridos "humanizados", en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que muestra una especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donadoras habitualmente incluyen por lo menos los residuos aminoácidos de unión a antígeno del donador, aunque también pueden comprender otros residuos aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos pueden prepararse mediante varios métodos bien conocidos de la técnica.

En otra realización preferente, el ligando, preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, más preferentemente de entre el grupo que consiste de ácidos nucleicos, anticuerpos o aptámeros, se encuentra presente sobre una matriz.

5 Dicha matriz contiene por lo menos un ligando adicional, que puede dirigirse contra un péptido, polipéptido o un ácido nucleico de interés. Dicho ligando adicional también puede dirigirse contra un péptido, polipéptido o un ácido nucleico de ningún interés particular en el contexto de la presente invención. Preferentemente, se encuentran contenidos sobre la matriz ligandos de por lo menos tres, preferentemente por lo menos cinco, más preferentemente por lo menos ocho péptidos o polipéptidos de interés en el contexto de la presente invención.

10 Según la presente invención, el término "matriz" se refiere a un portador de fase sólida o de tipo gel sobre el que se unen por lo menos dos compuestos en una disposición unidimensional, bidimensional o tridimensional. Dichas matrices (incluyendo los "chips génicos", "chips de proteínas", matrices de anticuerpos y similares) son generalmente conocidas por el experto en la materia y típicamente se generan sobre portaobjetos de vidrio de microscopía, especialmente portaobjetos de vidrio recubiertos, tales como portaobjetos recubiertos con policationes, nitrocelulosa o biotina, cubreobjetos y membranas tales como, por ejemplo, membranas a base de nitrocelulosa o nilón.

15 La matriz puede incluir un ligando unido o por lo menos dos células cada una de las cuales expresa por lo menos un ligando.

20 También se encuentra contemplada la utilización de "matrices en suspensión" como matrices según la presente invención (Nolan J.P., Sklar LA., Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. Trends Biotechnol. 20(1):9-12, 2002). En dichas matrices en suspensión, el portador, por ejemplo una microperla o microesfera, se encuentra presente en suspensión. La matriz consiste de diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que portan diferentes ligandos.

25 La solicitud se refiere además a un método para producir matrices tal como se ha definido anteriormente, en el que se une por lo menos un ligando al material portador además de otros ligandos.

30 Los métodos para producir dichas matrices, por ejemplo basadas en la química de la fase sólida y en grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (patente US nº 5.744.305). Dichas matrices también pueden ponerse en contacto con sustancias o bibliotecas de sustancias y someterse a ensayo para la interacción, por ejemplo para la unión o el cambio de conformación. Por lo tanto, las matrices que comprenden un péptido o polipéptido tal como se ha definido anteriormente pueden utilizarse para identificar ligandos que se unen específicamente a dichos péptidos o polipéptidos.

35 Además, se encuentra contemplada la utilización de los dispositivos denominados de diagnóstico inmediato ("point-of-care") o de laboratorio-en-un-chip ("lab-on-a-chip") para la obtención de la muestra y la medición del marcador. Dichos dispositivos pueden diseñarse análogamente a los dispositivos utilizados en la medición de la glucosa en sangre. De esta manera, un paciente podrá obtener la muestra y medir el marcador sin asistencia inmediata de un médico o enfermera capacitado.

40 Los medios adecuados para medir el nivel de expresión de un marcador según la presente invención, tal como anticuerpos, aptámeros, ácidos nucleicos antisentido, etc., ya han sido descritos en detalle anteriormente en la presente memoria. En una realización preferente, los medios se empaquetan en forma de kit que comprende un recipiente para los medios o agente para la medición, así como recipientes para cualesquier agentes auxiliares para la medición, por ejemplo tampones adecuados, filtros, columnas, enzimas, etc.

45 En otra realización preferente, se encuentra contemplado que el medio sea un dispositivo lab-on-a-chip o cualquier otro dispositivo adecuado para el diagnóstico inmediato. Los dispositivos para el diagnóstico inmediato son conocidos de la técnica. Preferentemente, dicho dispositivo comprende una unidad de muestreo (por ejemplo para obtener una muestra de sangre) y una unidad de medición (por ejemplo para medir la unión del marcador a un ligando). Los medios también pueden ser una tira de ensayo u otra herramienta auxiliar para medir el nivel de expresión del marcador en dicho dispositivo.

50 El método según la presente solicitud comprende la etapa de diagnosticar el riesgo del paciente mediante comparación del nivel medido con niveles conocidos asociados a diferentes grados de riesgo en un paciente.

55 El experto en la materia podrá determinar los niveles conocidos de hormonas cardiacas que se asocian a diferentes grados de riesgo cardiovascular con respecto a la administración de un fármaco antiinflamatorio, particularmente un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2. En general, cuanto mayor sea el nivel de la hormona cardiaca, más alto será el riesgo para el paciente.

60 Según la presente solicitud, el término "riesgo" se refiere a la probabilidad de que tenga lugar un suceso particular, más particularmente una complicación cardiovascular. El grado de riesgo puede encontrarse incrementado o muy

incrementado. El grado de riesgo también puede encontrarse no incrementado. La expresión "riesgo no incrementado" se refiere a que aparentemente no existe riesgo de un suceso cardiovascular con respecto a la administración de un fármaco antiinflamatorio, particularmente un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2.

5 Las recomendaciones sobre los niveles asociados a los diferentes grados de riesgo pueden obtenerse a partir de los niveles de las hormonas cardíacas que es conocido que se encuentran asociados a la presencia o severidad de una enfermedad cardiovascular. Por ejemplo, basándose en un percentil 97,5 obtenido en individuos de menos de 50 años de edad, un nivel plasmático de 125 pg/ml de NT-proBNP puede considerarse un nivel normal (más concretamente, un nivel plasmático de NT-proBNP de 100 pg/ml para varones y de 150 pg/ml para mujeres puede considerarse un nivel normal). Los niveles más altos de NT-proBNP se correlacionan con, por ejemplo, el nivel de síntomas según la clasificación de la NYHA y con el nivel de alteración de la FEVI. La expresión "nivel plasmático" se refiere a los niveles de NT-proBNP medidos en el plasma sanguíneo. Los niveles medidos en el plasma generalmente son comparables a los niveles medidos en el suero sanguíneo.

15 En otro ejemplo, basándose en un percentil 97,5 obtenido en individuos aparentemente sanos de menos de 65 años de edad, los niveles plasmáticos inferiores a 84 pg/ml para varones e inferiores a 155 pg/ml para mujeres, de NT-proBNP pueden considerarse niveles que indican un riesgo no incrementado. En pacientes que se quejan de disnea, los niveles inferiores a 100 pg/ml para varones e inferiores a 150 pg/ml para mujeres pueden considerarse criterios de exclusión de insuficiencia cardíaca o disfunción ventricular. Los niveles de NT-proBNP superiores a los niveles indicados en el presente ejemplos se correlacionan con, por ejemplo, el nivel de síntomas según la clasificación de la NYHA y con el nivel de alteración de la FEVI. La expresión "nivel plasmático" se refiere a los niveles de NT-proBNP medidos en el plasma sanguíneo. Nuevamente, los niveles medidos en plasma y suero sanguíneos son generalmente comparables.

25 Posteriormente se proporcionan los niveles plasmáticos de NT-proBNP que se consideran, o pueden considerarse, típicamente asociados a los grados indicados de riesgo cardiovascular con respecto a la administración de un fármaco antiinflamatorio, un compuesto inhibidor de Cox-2, particularmente un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2.

30 Resulta evidente que los niveles proporcionados posteriormente pueden servir únicamente como una primera clasificación del riesgo de un paciente. El experto en la materia podrá determinar otros niveles relevantes de la literatura (por ejemplo Wang T.J., Larson M.G., Levy D. *et al.*, Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med*, vol. 350, páginas 655-63, 2004; Olson, M.H., Wachtell, K. Tuxen, C., Fossum, E. *et al.*, N-terminal pro-brain natriuretic peptide predicts cardiovascular events in patients with hypertension and left hypertrophy: a LIFE study. *J Hypertens*, vol. 22, páginas 1597-1604, 2004) o de otros estudios clínicos.

Típicamente, un nivel plasmático inferior a 125 pg/ml de NT-proBNP se asocia a un riesgo cardiovascular no incrementado con respecto a la administración de un fármaco antiinflamatorio, un inhibidor de Cox-2, particularmente un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2.

40 Típicamente, un nivel plasmático inferior a 125 a 500 pg/ml de NT-proBNP se asocia a un riesgo cardiovascular incrementado con respecto a la administración de un fármaco antiinflamatorio, un inhibidor de Cox-2, particularmente un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2. Sin embargo, también un nivel de entre 80 y 125 pg/ml debe justificar la clasificación adicional de la presencia o no de un riesgo incrementado.

45 Típicamente, un nivel plasmático superior a 500 pg/ml de NT-proBNP se asocia a un riesgo cardiovascular muy incrementado con respecto a la administración de un fármaco antiinflamatorio, un inhibidor de Cox-2, particularmente un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2. Sin embargo, también un nivel superior a 400 pg/ml debe justificar la clasificación adicional de la presencia o no de un riesgo muy incrementado.

50 Tras diagnosticar el riesgo de un paciente, este diagnóstico puede presentar consecuencias para el tratamiento posterior tal como se indica posteriormente (también se proporciona en la fig. 1 un ejemplo no limitativo de este tipo de decisiones de tratamiento). Los grados de riesgo indicados posteriormente se refieren particularmente a grados de riesgo asociados a los niveles anteriormente indicados de NT-proBNP.

55 En el caso de que un método según la presente solicitud indique un riesgo no incrementado, puede administrarse el fármaco antiinflamatorio, preferentemente considerando cualesquier otros factores de riesgo conocidos de enfermedad cardiovascular. Preferentemente, la administración del fármaco se acompaña de seguimiento adicional del nivel de la hormona cardíaca, particularmente en el caso de la aplicación de dosis altas o a largo plazo del fármaco. De esta manera, resultará posible la detección precoz de cualquier incremento no habitual del nivel de la hormona cardíaca que indicaría una elevación del riesgo cardiovascular.

60 En el caso de que un método según la presente solicitud indique un riesgo incrementado, el paciente preferentemente se investiga intensivamente mediante el diagnóstico adicional según métodos conocidos por el cardiólogo experto, tales como la electrocardiografía y la ecocardiografía. El tratamiento con un fármaco antiinflamatorio, más particularmente un inhibidor selectivo de Cox-2, sólo debe iniciarse tras la cuidadosa

consideración de riesgos y beneficios potenciales. En particular, la presente invención no sólo ayudará a hacer más segura la administración de fármacos antiinflamatorios mediante la identificación de los pacientes de riesgo, sino que también ayudará a descubrir un riesgo cardiovascular previamente no identificado en un paciente. De esta manera, un paciente que presente un riesgo cardiovascular incrementado o muy incrementado preferentemente se somete a un diagnóstico adicional para identificar un trastorno cardiovascular subyacente. Lo anterior permitirá iniciar el tratamiento precozmente, es decir, antes de la aparición de síntomas evidentes del trastorno cardiovascular. De esta manera, el estado general de salud del paciente se beneficiará de los métodos de la presente invención para diagnosticar el riesgo cardiovascular antes o durante la administración de un fármaco antiinflamatorio. Además, en el caso de que el tratamiento del trastorno cardiovascular subyacente tenga éxito, podrá reducirse el riesgo (diagnosticado según los medios y métodos proporcionados por la presente invención) y podrá iniciarse el tratamiento con un fármaco antiinflamatorio, particularmente un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2, o podrá incrementarse la dosis de dicho fármaco.

El tratamiento de un paciente que presenta un riesgo incrementado también puede acompañarse de medidas adicionales, tales como la limitación o la reducción de la dosis de un fármaco antiinflamatorio administrado o que se administrará inminentemente, la restricción de la ingesta de sal, el ejercicio moderado regular, la provisión de inmunización para virus Influenza y neumocócica, el tratamiento quirúrgico (por ejemplo la revascularización, la dilatación con balón, la colocación de stent o la cirugía de derivación), la administración de fármacos tales como diuréticos (incluyendo la coadministración de más de un diurético), inhibidores de la ACE (enzima conversor de la angiotensina), bloqueantes β -adrenérgicos, antagonistas de la aldosterona, antagonistas del calcio (por ejemplo bloqueantes de los canales del calcio), bloqueantes de los receptores de la angiotensina, digitalis y cualesquiera otras medidas conocidas y que el experto en la materia considere apropiadas.

La presente invención también comprende un método de seguimiento del tratamiento con un compuesto inhibidor de Cox-2, particularmente un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2, en el que se mide el nivel de una hormona cardiaca, en particular NT-proBNP.

En el caso de que, basándose en la consideración de los riesgos y beneficios potenciales, se inicie el tratamiento con un compuesto inhibidor de Cox-2, en particular un NSAID, esteroide o inhibidor selectivo de Cox-2, también puede llevarse a cabo en forma de terapia intermitente.

La medición de un péptido natriurético puede utilizarse entonces para el seguimiento de la terapia, particularmente la terapia intermitente y/o para identificar una elevación del riesgo. La administración se detiene al alcanzar el nivel de la hormona cardiaca un determinado valor y opcionalmente se reinicia al caer los niveles por debajo de un valor determinado. Los valores respectivos de la hormona cardiaca son los mencionados anteriormente. Por ejemplo, un valor que indique detener la administración puede ser un valor que normalmente indicaría un riesgo muy incrementado (tal como se ha indicado en la presente memoria). En este caso, un valor que indique opcionalmente reiniciar el tratamiento puede ser un valor que indique meramente un riesgo incrementado (tal como se indica en la presente memoria) o un valor que indique un riesgo no incrementado (tal como se indica en la presente memoria).

A partir de lo anteriormente expuesto resulta evidente que la presente solicitud también proporciona un método de seguimiento de un paciente que está siendo tratado o que será tratado inminentemente con un compuesto inhibidor de Cox-2, en particular un NSAID, esteroide o un inhibidor selectivo de Cox-2.

En el caso de que un método según la presente solicitud indique un riesgo muy incrementado, el tratamiento puede adaptarse tal como se ha descrito para el riesgo incrementado. Sin embargo, la administración de un compuesto inhibidor de Cox-2, en particular de un NSAID, esteroide o un inhibidor selectivo de Cox-2, a priori no será una opción de tratamiento para un paciente con un riesgo muy incrementado. En el caso de que se administre, sea cual sea el motivo, un compuesto inhibidor de Cox-2, en particular un NSAID, o esteroide, más particularmente un inhibidor selectivo de Cox-2, la administración debe realizarse bajo cuidadosa supervisión médica, en particular incluyendo la medición de un péptido natriurético a intervalos cortos para realizar un seguimiento del riesgo y/o para identificar una elevación del riesgo.

Leyendas de las figuras

Fig. 1 Diagrama de flujo de un ejemplo de la invención. Los pacientes que son candidatos a recibir un fármaco antiinflamatorio (por ejemplo un inhibidor de Cox-2) se agrupan en pacientes con y pacientes sin síntomas de enfermedad cardiovascular (EC). En el caso de que el nivel plasmático medido de NT-proBNP sea superior al valor de corte seleccionado de 125 pg/ml, el paciente se remite a un cardiólogo. En el caso de que el nivel medido de la hormona cardiaca sea inferior al valor de corte seleccionado (por ejemplo un nivel plasmático de 125 pg/ml de NT-proBNP), el paciente se somete a un examen físico limitado (por ejemplo que establezca la puntuación PROCAM o la puntuación Framingham, anamnesis, presión sanguínea (PS), posiblemente electrocardiograma). En el caso de que el resultado del examen físico no indique un riesgo cardiovascular, se administra el fármaco antiinflamatorio pero se realiza un seguimiento del nivel de la hormona cardiaca. El cardiólogo desempeña un papel importante en la evaluación de todos los indicadores de riesgo y las opciones de tratamiento.

Fig. 2 La figura se refiere al Ejemplo 5. La curva de Kaplan-Meier de sucesos cardiovasculares adversos (SA-CV) para el grupo de los inhibidores de Cox-2 frente a todos los pacientes sin comedición de inhibidor de Cox-2. El gráfico de sucesos cardiovasculares adversos frente al tiempo en forma de curva de Kaplan-Meier demuestra un riesgo más alto en el grupo de inhibidores de Cox-2 (ccox2=sí). Todos los pacientes sin comedición de inhibidor de Cox-2 (ccox2=no) en resumen mostraron meramente un riesgo cardiovascular menor. "comprobado" se refiere a que no se ha observado ningún SA-CV hasta el final del periodo de observación. N, número; HR, índice de riesgo; p, probabilidad; ccox-2, Cox-2 concomitante (se refiere a la medicación concomitante con inhibidores de Cox-2); función de distribución de la supervivencia, función de distribución de supervivencia sin sucesos.

Fig. 3 La figura se refiere al Ejemplo 5. La curva de Kaplan-Meier basada en sucesos cardiovasculares adversos (SA-CV) evaluados por un cardiólogo para el grupo de inhibidores de Cox-2 y el grupo de comparación con NT-proBNP < 100 pg/ml vs. NT-proBNP > 100 pg/ml. A la luz de los resultados que demuestran un exceso de riesgo de SA-CV con la inhibición selectiva de Cox-2, los SA-CV crudos fueron reconciliados por un cardiólogo ciego a los valores de NT-proBNP utilizando criterios de definición previamente especificados. El gráfico de estos SA-CV adjudicados, frente al tiempo en forma de curva de Kaplan-Meier demuestran un riesgo 4,4 veces más alto en el grupo de inhibidores de Cox-2 con NT-proBNP > 100 pg/ml que el grupo de comparación (de control) y un riesgo 6,4 veces más alto que el grupo de inhibidores de Cox-2 con NT-proBNP < 100 pg/ml. Este riesgo se restringía prácticamente por completo a los pacientes con NT-proBNP > 100 pg/ml al inicio del estudio o en la semana 24 del seguimiento. Los índices de riesgo a la derecha indican los índices de riesgo para los grupos comparados que se indican a la izquierda (control vs. grupo de inhibidores de Cox-2), mientras que los índices de riesgo proporcionados en la parte inferior de la figura se refieren a los grupos comparados anteriormente (niveles de NT-proBNP inferiores a 100 pg/ml vs. niveles de NT-proBNP de 100 pg/ml o superiores). SA, suceso adverso; n, número; HR, índice de riesgo; p, probabilidad; función de distribución de la supervivencia, función de distribución de la supervivencia sin sucesos.

Fig. 4 La figura se refiere al Ejemplo 5. Curva de Kaplan-Meier basada en sucesos cardiovasculares (CV) adversos (SA) adjudicados por un cardiólogo para el grupo de inhibidores de Cox-2 y el grupo de comparación con NT-proBNP < 125 pg/ml vs. > 125 pg/ml. La fig. 4 muestra los mismos resultados que los indicados en la figura 3 utilizando un valor de corte de NT-proBNP de 125 pg/ml. SA, suceso adverso; n, número; HR, índice de riesgo; p, probabilidad; función de distribución de la supervivencia, función de distribución de la supervivencia sin sucesos.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención y no pretenden limitar el alcance de la misma en modo alguno.

Ejemplo 1

Medición de NT-proBNP:

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

En la última etapa, se aplica voltaje al electrodo en presencia de un tampón que contiene tripropilamina y la señal electroquimioluminiscente resultante se registra con un fotomultiplicador. Todos los reactivos y muestras son manipulados de forma totalmente automática por el instrumento ElecsysTM. Los resultados se determinan en una curva de calibración generada específicamente por el instrumento mediante una calibración de 2 puntos y una curva patrón proporcionada mediante el código de barras del reactivo. El ensayo se lleva a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

La sangre para el análisis de hormonas puede muestrearse en tubos con EDTA que contienen 5.000 U de aprotinina (Trasylol, Bayer, Alemania) y tubos de litio-heparina (para la química clínica), según resulte apropiado. 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 el análisis.

Medición de NT-proANP:

NT-proANP puede determinarse mediante un radioinmunoensayo de unión competitiva con una técnica de fase sólida magnética modificada de Sundsfjord J.A., Thibault G. *et al.*, Identification and plasma concentrations of the N-terminal fragment of proatrial natriuretic factor in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66:605-10, 1988, utilizando el

mismo suero policlonal de conejo anti-pro-ANP de rata, proANP humano (1-30) de Peninsula Lab (Bachem Ltd, St. Helene, Reino Unido) como el estándar, y proANP 130 yodada purificada mediante HPLC para el radiomarcaje. Con el fin de conseguir una elevada sensibilidad y una buena precisión, pueden utilizarse Dynabeads M280 con IgG de oveja anticonejo (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) como fase sólida y anticuerpo secundario.

Ejemplo 2

Un paciente de 70 años sufre de artritis reumatoide severa y ha recibido tratamiento de largo plazo con ibuprofeno. Durante el tratamiento con ibuprofeno ha experimentado efectos secundarios gastrointestinales, incluyendo sangrados gastrointestinales. El médico considera cambiar el tratamiento para utilizar inhibidores selectivos de Cox-2 y realizar una medición de NT-proBNP. El nivel de NT-proBNP es de 223 pg/ml. El paciente se remite a un cardiólogo para un diagnóstico más completo. Mediante ecocardiograma, el cardiólogo diagnostica un defecto funcional isquémico y un riesgo de la terapia con inhibidores selectivos de Cox-2. Debido a que el defecto de la función cardiaca no es severo, se inicia una terapia intermitente con un inhibidor selectivo de Cox-2 bajo el seguimiento estrecho de NT-proBNP.

Ejemplo 3

Un paciente mujer de 55 años ha sido tratado durante 6 años para diabetes de tipo II y sufre de una enfermedad reumática dolorosa crónica. Por lo tanto, su médico considera el tratamiento con inhibidores de Cox-2. Se mide el valor de NT-proBNP y se determina que es de 647 pg/ml. El paciente se remite a un cardiólogo para un diagnóstico más completo. Debido al elevado valor de NT-proBNP y debido a la comorbilidad de la diabetes, no se inicia el tratamiento con inhibidores de Cox-2.

Ejemplo 4

Paciente sano y fumador de 72 años pero que no presenta otros factores de riesgo adicionales de enfermedad cardiaca, sufre de un fuerte dolor articular en las rodillas (probablemente debido a actividades deportivas prolongadas). El paciente sabe que tiene un estómago sensible. Por lo tanto, se considera el tratamiento con inhibidores selectivos de Cox-2. Se determina que el valor plasmático de NT-proBNP medido es de 65 pg/ml. Debido a que la puntuación PROCAM es inferior a 40 y el único factor de riesgo tradicional es el tabaquismo, se inicia el tratamiento con inhibidores selectivos de Cox-2.

Ejemplo 5

La utilización de NT-proBNP para evaluar el riesgo de sufrir una complicación cardiovascular con respecto a la administración de fármacos antiinflamatorios.

Resulta importante en el contexto del presente ejemplo que la expresión "inhibidor de Cox-2" debe entenderse como haciendo referencia a un "inhibidor selectivo de Cox-2". Además, en el contexto del presente ejemplo, el término "NSAID" se refiere a un NSAID que no es un inhibidor selectivo de Cox-2.

NT-proBNP se midió en muestras de suero de línea base procedentes de 433 pacientes que iniciaban un estudio prospectivo diseñado principalmente para definir el efecto terapéutico de un nuevo inhibidor de metaloproteinasa en la osteoartritis (OA). Se realizó un seguimiento de los sucesos cardiovasculares adversos (SA-CV) y se relacionaron con la utilización concomitante de inhibidores de Cox-2 o NSAID o esteroides que influían sobre el metabolismo de las prostaglandinas. En un análisis retrospectivo, se evaluó la cuestión de si los SA-CV en pacientes que recibían fármacos antiinflamatorios podrían haberse predicho a partir de valores elevados de NT-proBNP.

El estudio fue originalmente diseñado por Hoffmann-La Roche Inc., Basel, Suiza, para investigar el efecto de un nuevo inhibidor de metaloproteinasa de matriz (MMP) sobre la progresión de la osteoartritis (OA) primaria en un ensayo con diferentes dosis de 24 semanas del inhibidor de MMP Ro 113-0830 en pacientes con OA primaria de rodilla con o sin OA de mano, seguido de una extensión de 30 meses. El diagnóstico de la OA se basó en criterios clínicos y radiográficos. Los pacientes con causas secundarias de OA, tales como artritis inflamatoria, displasias y malformaciones congénitas, enfermedades metabólicas y por depósito de cristales, neuropatía, osteonecrosis, fractura articular previa, enfermedad ósea de Paget, ocronosis, acromegalia, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, gota, osteocondromatosis primaria, no fueron incluidos. Otros criterios de exclusión comprendían una historia de patología gastrointestinal (por ejemplo erosiones, úlceras, sangrado) o renal (por ejemplo creatinina incrementada >2,0 mg/dl, insuficiencia renal) activa significativa dentro del primer año posterior a la visita de cribado. El estudio se llevó a cabo basándose en un diseño multicéntrico de doble ciego, aleatorizado, de 5 brazos, controlado con placebo, de grupos paralelos y diferentes dosis de 24 semanas de duración. Al final del periodo de doble ciego los pacientes podrían disponer de la opción de continuar en un periodo de extensión de 30 meses con tratamiento de Ro113-0830. Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado. Se permitieron analgésicos de rescate (es decir, analgésicos considerados necesarios como tratamiento por el médico responsable) y fármacos antiinflamatorios, incluyendo inhibidores de Cox-2, NSAID o esteroides como terapias concomitantes y se permitió su utilización según necesidad por el paciente.

Los fármacos antiinflamatorios de rescate permitidos, incluyendo los inhibidores de Cox-2 y los NSAID o esteroides para dicho ensayo fueron aspirina, diclofenac sódico, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, nabumetona, oxaprozina, piroxicam, salicilato sódico, salicilato de colina-magnesio, celecoxib, rofecoxib o tolmetina. La cohorte completa del estudio se siguió para la aparición de SA-CV (sucesos cardiovasculares adversos). Los pacientes no fueron activamente encuestados para la aparición de angina de pecho, signos o síntomas de insuficiencia cardiaca congestiva o hipertensión arterial, ni se evaluó rutinariamente la ECG para la aparición de nuevas ondas Q o nuevos bloqueos de rama. Todos los SA-CV fueron clasificados retrospectivamente en diferentes categorías por expertos externos al estudio.

Todos los SA-CV fueron examinados por dos cardiólogos no participantes activamente en el ensayo y que eran ciegos a los resultados de los biomarcadores. Los sucesos CV adversos definitivos o potencialmente incluíbles en el estudio comprendían un registro de infarto de miocardio agudo, nuevas ondas Q o bloqueo de una rama, muerte por infarto de miocardio u otro motivo cardiovascular, ictus no fatal, la aparición o empeoramiento de insuficiencia cardiaca sugerida por el desarrollo de edema o el empeoramiento de edema preexistente de las extremidades inferiores, rales en la auscultación o congestión pulmonar documentada en la fluoroscopia, nueva aparición de hipertensión arterial o empeoramiento de hipertensión arterial preexistente y trombosis venosa confirmada. Otros signos de ECG, edema unilateral o edema aislado de las extremidades superiores no se consideraron sucesos incluíbles.

En cada día de muestro se recogieron dos muestras de 10 ml de sangre venosa en tubos separados de vidrio simple, se centrifugaron y se almacenaron a -70°C o temperatura inferior en soportes de almacenamiento de poliestireno para tubos. Las muestras se enviaron desde los centros de estudio a la Oficina Central de Muestras a intervalos regulares. Se midió NT-proBNP utilizando un inmunoensayo de tipo sándwich disponible comercialmente en un analizador totalmente automático (ELECSYS proBNP, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

Se incluyó un total de 433 pacientes con OA y recibieron placebo o la medicación del estudio a dosis crecientes de 10 a 150 mg. Los pacientes se dividieron según su comedición en los grupos siguientes:

grupo de inhibidores de Cox-2:

55 pacientes tratados con inhibidores de Cox-2 de entre los que 11 también recibían NSAID, 10 pacientes también recibían esteroides y 9 pacientes también recibían NSAID y esteroides.

grupo de NSAID:

157 pacientes tratados con NSAID de entre los que 39 pacientes también recibían esteroides.

Grupo de esteroides:

41 pacientes tratados con esteroides únicamente

Grupo de comparación:

180 pacientes no tratados con fármacos antiinflamatorios, ni con inhibidores de Cox-2, NSAID ni esteroides. Se permitió la medicación adicional con analgésicos.

Las características de línea base de la población entera en estos cuatro grupos eran comparables (Tabla 1). Los pacientes recibieron un placebo o la medicación de estudio a dosis crecientes de 10 a 150 mg. La proporción de pacientes que recibían una comedición con inhibidores de Cox-2, NSAID o esteroides se encontraba igualmente distribuida a través de todas las dosis del fármaco de estudio. Todos los grupos de pacientes eran comparables respecto a los criterios cardiovasculares básicos, por ejemplo enfermedades cardiológicas previas, criterios de ECG, hipertensión o diabetes. Tal como se muestra en la Tabla 2, la distribución de los valores de NT-proBNP de línea base era similar para los grupos de comedición y también en relación al número de pacientes con valores de NT-proBNP inferiores o superiores a los valores de corte de 125 pg/ml y 100 pg/ml.

Durante el periodo de observación de 24 semanas, se registró un total de 82 SA-CV leves a graves. La incidencia relativa de los SA CV fue significativamente más alta en el grupo que recibió inhibidores de Cox-2. Se observó una tendencia hacia una mayor incidencia de SA-CV también en aquellos pacientes que habían recibido NSAID. El riesgo de SA-CV era 1,78 veces superior con la utilización de inhibidores de Cox-2 ($p=0,06$). NT-proBNP < 100 pg/ml no predecía un incremento del riesgo CV. En contraste, el riesgo de un suceso adverso CV predicho por NT-proBNP > 100 pg/ml era 4,23 veces superior utilizando inhibidores de Cox-2 ($p=0,002$), 1,6 veces superior utilizando NSAID ($p=0,4$) y 2,2 veces superior utilizando esteroides ($p=0,09$) (ver la Tabla 3).

Se ajustaron las tasas de SA-CV para fármaco de estudio, edad y presencia de diabetes. Las tasas de SA-CV era significativamente más altas en el grupo de inhibidores de Cox-2 y se observó una tendencia hacia una incidencia más alta de SA-CV en el grupo de NSAID y el grupo de esteroides. Se muestran en un gráfico las tasas de SA-CV frente al tiempo para todos los grupos (figura 2). La incidencia relativa de los SA CV fue significativamente más alta y se produjo antes en el grupo que recibió inhibidores de Cox-2.

Tabla 1: Demografía y valores de línea base según los grupos de medicación

	Grupo de inhibidores de Cox-2	Grupo de NSAID	Grupo de esteroides	Grupo de comparación
N	55	157	41	180
Edad (media ± SD)	62 ± 9	59 ± 8	60 ± 9	62 ± 9
Varones (%)	22	26	20	32
Caucásicos (%)	96	89	95	88
IMC (media ± SD)	31 ± 5	30 ± 5	31 ± 5	30 ± 5
Disf.CV previa/conc. (%)		23	32	29
Diabetes mellitus (%)	5	4	7	9
Hipertensión (%)	31	27	29	35
Ictus (%)	0	1	2	3
PS sistólica (media ± SD)	130 ± 14	131 ± 17	135 ± 17	133 ± 17
PS diastólica (media ± SD)	79 ± 9	80 ± 8	80 ± 9	80 ± 9
Tasa cardíaca (media ± SD)	74 ± 8	73 ± 9	72 ± 9	72 ± 9
PQ (media ± SD)	164 ± 26	161 ± 22	162 ± 27	163 ± 25
QRS (media ± SD)	90 ± 15	90 ± 29	88 ± 17	87 ± 14
QT (media ± SD)	400 ± 35	396 ± 32	399 ± 40	395 ± 35

N, número; SD, desviación estándar; IMC, índice de masa corporal; Disf.CV previa/conc., disfunción cardiovascular previa o concomitante; PS, presión sanguínea; tiempo PQ; QRS, complejo QRS; QT, tiempo QT.

Tabla 2: NT-proBNP en la línea base para los grupos de comedicación

		Inhibidores de Cox-2	NSAID sistémicos	Esteroides	Grupo de comparación
N en la línea base		55	118	41	180
NT-proBNP en la línea base [pg/ml]	Media ± SD	125 ± 141	77 ± 78	118 ± 106	110 ± 131
	Mediana [Q1, Q3]	83 [38, 187]	55 [27, 94]	77 [36, 196]	63 [35, 139]
NT-proBNP en la línea base <125 (%)		65	83	66	72
NT-proBNP en la línea base <100 (%)		60	73	59	66

N, número; SD, desviación estándar; Q1, primer cuartil; Q3, tercer cuartil.

Tabla 3: SA CV e índices de riesgo (para el tiempo hasta el primer SA) respecto al grupo de comparación para el grupo de inhibidores de Cox-2, el grupo de NSAID y los grupos de esteroides

	Grupo de inhibidores de Cox-2		Grupo de NSAID		Grupo de esteroides		Grupo de comparación				
	N	N (%) SA	HR (vs. grupo de comparación)	N	N (%) SA	HR (vs. grupo de comparación)	N	N (%) SA			
Todos	55	16 (29)	1784 (p=0,06)	157	27 (17)	0,990 (p=0,969)	41	10 (24)	180	29 (16)	1,530 (p=0,243)
NT-proBNP <100 pg/ml	33	7 (21)	1,059 (p=0,895)	114	19 (17)	0,822 (p=0,532)	24	5 (21)	118	22 (19)	1,106 (p=0,840)
NT-proBNP ≥100 pg/ml	22	9 (41)	4,233 (p=0,002)	43	8 (19)	1,572 (p=0,378)	17	5 (29)	62	7 (11)	2,165 (p=0,089)
HR (≥100 vs 100)	2,531 (p=0,058)			1,213 (p=0,646)			1,502 (p=0,518)			0,621 (p=0,268)	

N, número; HR, índice de riesgo; SA, sucesos adversos; p, probabilidad

5 La Tabla 4 muestra los resultados del análisis de regresión multivariante. Incluso tras el ajuste para la edad, género y diabetes, un valor de NT-proBNP elevado siguió siendo independientemente predictivo de un resultado adverso al recibir los pacientes un inhibidor de Cox-2. Se observó una tendencia similar al administrar NSAID o esteroides como medicación de rescate o concomitante. Tras ajustar para el fármaco de estudio, la edad, historia de hipertensión o diabetes y para posibles efectos de comedificaciones antiinflamatorias, el riesgo de SA-CV era 4,3 veces más alto en el grupo que recibió inhibidores de Cox-2 con NT-proBNP > 100 pg/ml comparado con el grupo de comparación sin comedificación antiinflamatoria (p=0,0045), mientras que en pacientes que recibieron inhibidores de Cox-2 con valores de NT-proBNP < 100 pg/ml no se observó riesgo incrementado de SA-CV. Incluso tras el ajuste para la edad, género y diabetes, un valor de NT-proBNP elevado siguió siendo independientemente predictivo de un resultado adverso al recibir los pacientes un inhibidor de Cox-2. Se observó una tendencia similar al administrar NSAID o esteroides como medicación de rescate o concomitante.

Tabla 4: Análisis de regresión multivariante de Cox para el tiempo hasta sucesos adversos cardiovasculares en el grupo de inhibidores de Cox-2 basado en NT-proBNP 100 pg/ml

Variables	Sin otras covariables			
	Pr > Chi cuadrado	Índice de riesgo	NCI al 95% para HR	NCS al 95% para HR
NT-proBNP < 100; Grupo de inhibidores de Cox-2 vs. grupo de comparación	0,9565	1,024	0,437	2,399
NT-proBNP > 100; Grupo de inhibidores de Cox-2 vs. grupo de comparación	0,0045	4,197	1,561	11,285
NT-proBNP > 100 vs. NT-proBNP < 100; dentro del grupo de comparación	0,2628	0,615	0,263	1,440
NT-proBNP > 100 vs. NT-proBNP < 100; dentro del grupo de inhibidores de Cox-2	0,0672	2,521	0,937	6,785
Con covariables				
NT-proBNP < 100; Grupo de inhibidores de Cox-2 vs. grupo de comparación	0,9359	0,965	0,400	2,325
NT-proBNP > 100; Grupo de inhibidores de Cox-2 vs. grupo de comparación	0,0045	4,338	1,575	11,954
NT-proBNP > 100 vs. NT-proBNP < 100; dentro del grupo de comparación	0,1827	0,549	0,227	1,326
NT-proBNP > 100 vs. NT-proBNP < 100; dentro del grupo de inhibidores de Cox-2	0,0879	2,469	0,847	6,971
Edad > 70 años	0,3707	1,418	0,660	3,050
Presión sanguínea sistólica	0,8488	1,072	0,524	2,196
Diabetes mellitus	0,1999	1,891	0,714	5,008
Toma acetaminofeno en la línea base	0,6064	0,653	0,129	3,302
Toma NSAID en la línea base	0,4095	0,729	0,344	1,545
Pr > Chi cuadrado, probabilidad superior a Chi cuadrado; NCI, nivel de confianza inferior; NCS, nivel de confianza superior; HR, índice de riesgo.				

15 Estos resultados muestran que NT-proBNP permite identificar los candidatos para la terapia con fármacos antiinflamatorios que presentan un riesgo de SA CV durante el curso de la terapia o como consecuencia de la misma. Aparentemente la administración de fármacos antiinflamatorios es segura en pacientes con valores de NT-proBNP inferiores al nivel de corte en la línea base o durante el seguimiento. A la inversa, un nivel de NT-proBNP >

100 ng/ml o > 125 pg/ml predice un riesgo varias veces superior de sufrir un suceso adverso cardiovascular al tomar inhibidores de Cox-2 o NSAID o esteroides solos, o una combinación de fármacos antiinflamatorios.

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar el riesgo de un paciente de sufrir insuficiencia cardiaca como consecuencia de la administración de un compuesto inhibidor de COX-2, en el que el paciente no muestra síntomas evidentes de una enfermedad, riesgo o complicación cardiovascular preexistente, que comprende las etapas de:
 - 5 a) medir *in vitro* el nivel de un péptido natriurético del grupo BNP y NTproBNP,
 - b) diagnosticar el riesgo del paciente mediante comparación del nivel medido con niveles conocidos asociados a diferentes grados de riesgo en un paciente, y en el que el riesgo no se debe a un incremento del volumen de sangre o del volumen intravasal.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el péptido natriurético es NT-proBNP.
- 10 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que un nivel plasmático inferior a 125 pg/ml de NT-proBNP se asocia a un riesgo no incrementado de sufrir insuficiencia cardiaca.
4. Método según la reivindicación 3, en el que el nivel plasmático es inferior a 80 pg/ml.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que un nivel plasmático superior a 125 e inferior a 500 pg/ml de NT-proBNP se asocia a un riesgo no incrementado de sufrir insuficiencia cardiaca.
- 15 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que un nivel plasmático superior a 500 pg/ml de NT-proBNP se asocia a un riesgo muy incrementado de sufrir una complicación cardiovascular.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el método se lleva a cabo dentro del seguimiento de una terapia con un inhibidor selectivo de COX-2.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el método es para el seguimiento de una terapia intermitente con un inhibidor selectivo de COX-2.
- 20 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el coxibe se selecciona de entre el grupo que consiste de celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib, parecoxib y lumiracoxib.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que adicionalmente se mide el nivel o niveles de por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste de:
 - 25 a) marcadores de inflamación
 - b) marcadores de la función endotelial
 - c) marcadores de isquemia
 - d) marcadores de la activación de los trombocitos
 - e) marcadores de la activación de la aterosclerosis
 - 30 f) marcadores de activación intravascular de la coagulación
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la insuficiencia cardiaca es una enfermedad cardiaca sistólica compensada o descompensada y/o insuficiencia cardiaca aguda.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el nivel de la hormona cardiaca se mide en una muestra de orina, sangre, plasma sanguíneo o suero sanguíneo.
- 35 13. Método para diagnosticar el riesgo cardiovascular de un paciente que es un candidato para la administración de un inhibidor selectivo de COX-2 ó para el seguimiento del riesgo cardiovascular en un paciente que no manifiesta síntomas evidentes de un trastorno cardiovascular y que está siendo tratado con un inhibidor selectivo de COX-2, en el que en una muestra de líquido corporal o tejido del paciente, se mide el nivel de un péptido natriurético del grupo BNP y NTproBNP *in vitro* mediante un medio diagnóstico capaz de medir dicha hormona.
- 40 14. Método para decir si iniciar el tratamiento de un paciente con un compuesto que presenta propiedades inhibitoras de COX-2, comprendiendo el método:
 - a) medir *in vitro* el nivel de un péptido natriurético del grupo BNP y NTproBNP en el paciente,
 - b) diagnosticar el riesgo del paciente mediante comparación del nivel medido con uno o más niveles conocidos asociados a diferentes grados de riesgo en un paciente,
 - 45 c) en el que,

ca) en el caso de que se diagnostique que el riesgo no se encuentra incrementado, se recomienda el inicio del tratamiento y/o

cb) en el caso de que se diagnostique que el riesgo se encuentra incrementado o altamente incrementado, se recomienda no llevar a cabo el tratamiento.

5 15. Método según la reivindicación 14, en el que el inhibidor de COX-2 es un inhibidor selectivo de COX-2, preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste de celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib, parecoxib y lumiracoxib.

16. Método según la reivindicación 14 ó 15, en el que,

10 a) en el caso de que el nivel plasmático o sérico medido de NT-proBNP sea 100 pg/ml o superior, particularmente 125 pg/ml o superior, se recomienda no tratar el paciente o aprobar el tratamiento bajo seguimiento cardiovascular y/o a dosis baja del inhibidor selectivo de COX-2, y/o

b) en el caso de que el nivel plasmático o sérico medido de NT-proBNP sea 400 pg/ml o superior, particularmente superior a 500 pg/ml o más alto, se recomienda no tratar al paciente.

Fig. 1

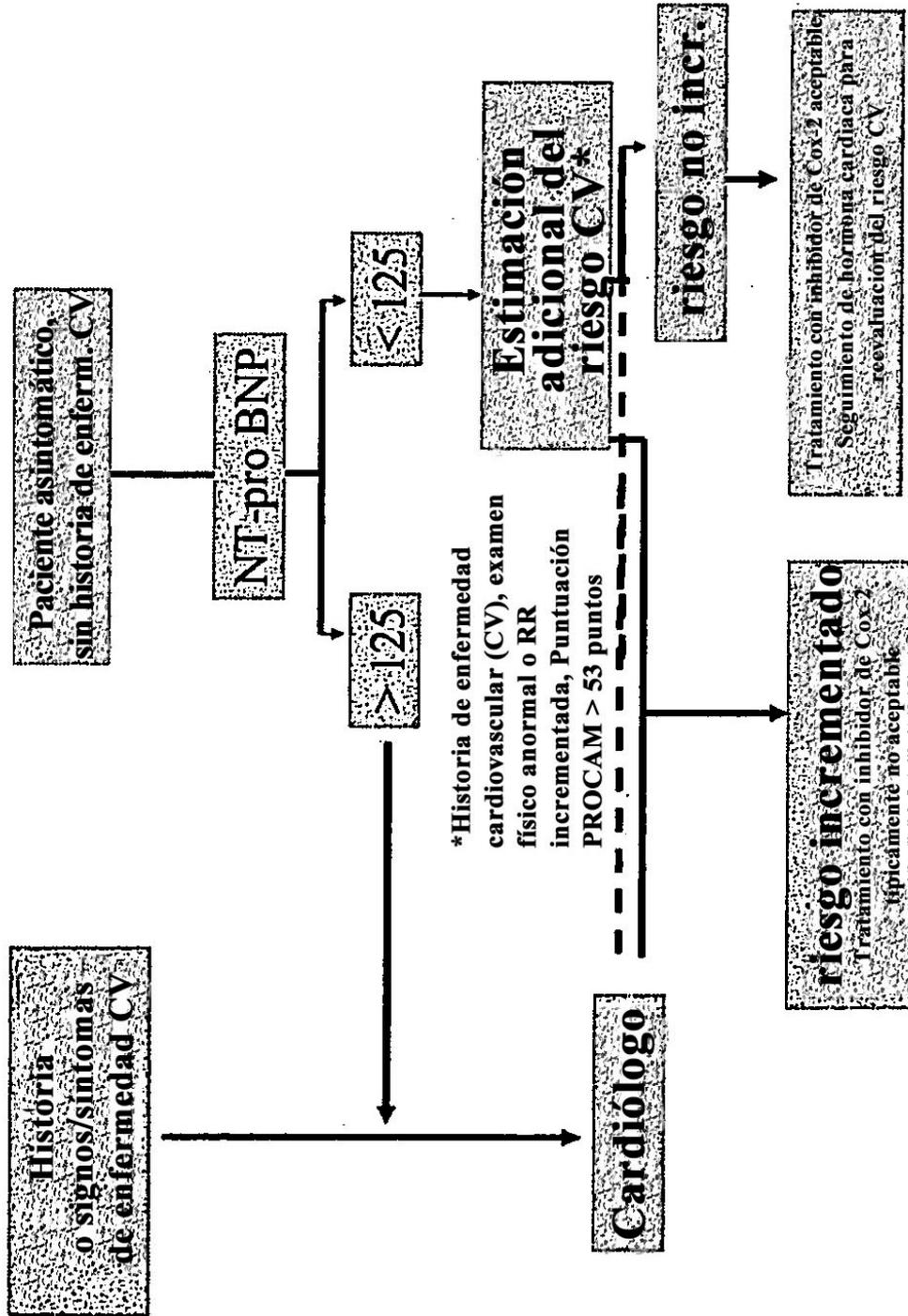
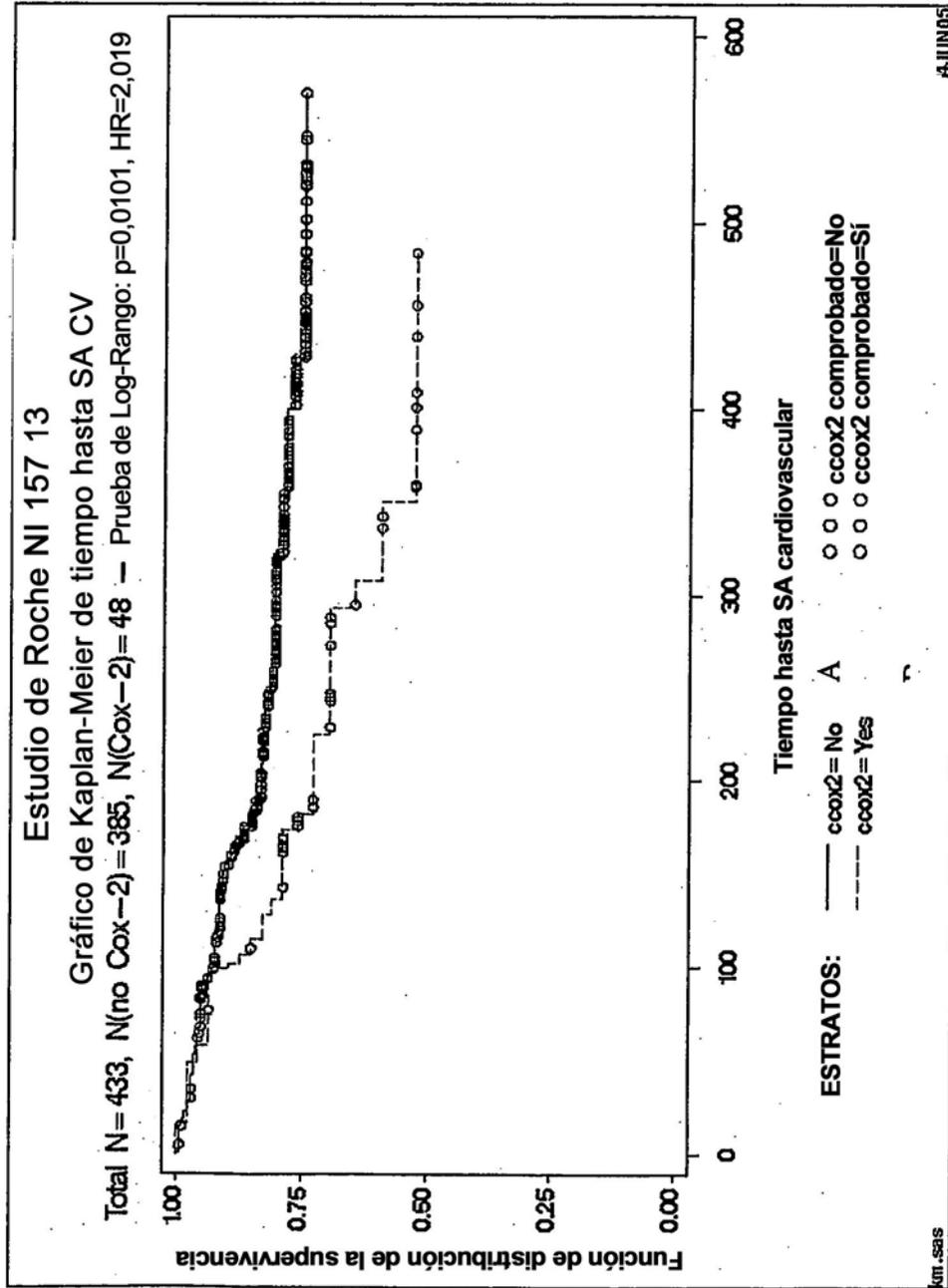


Fig. 2



A

B

Fig. 3

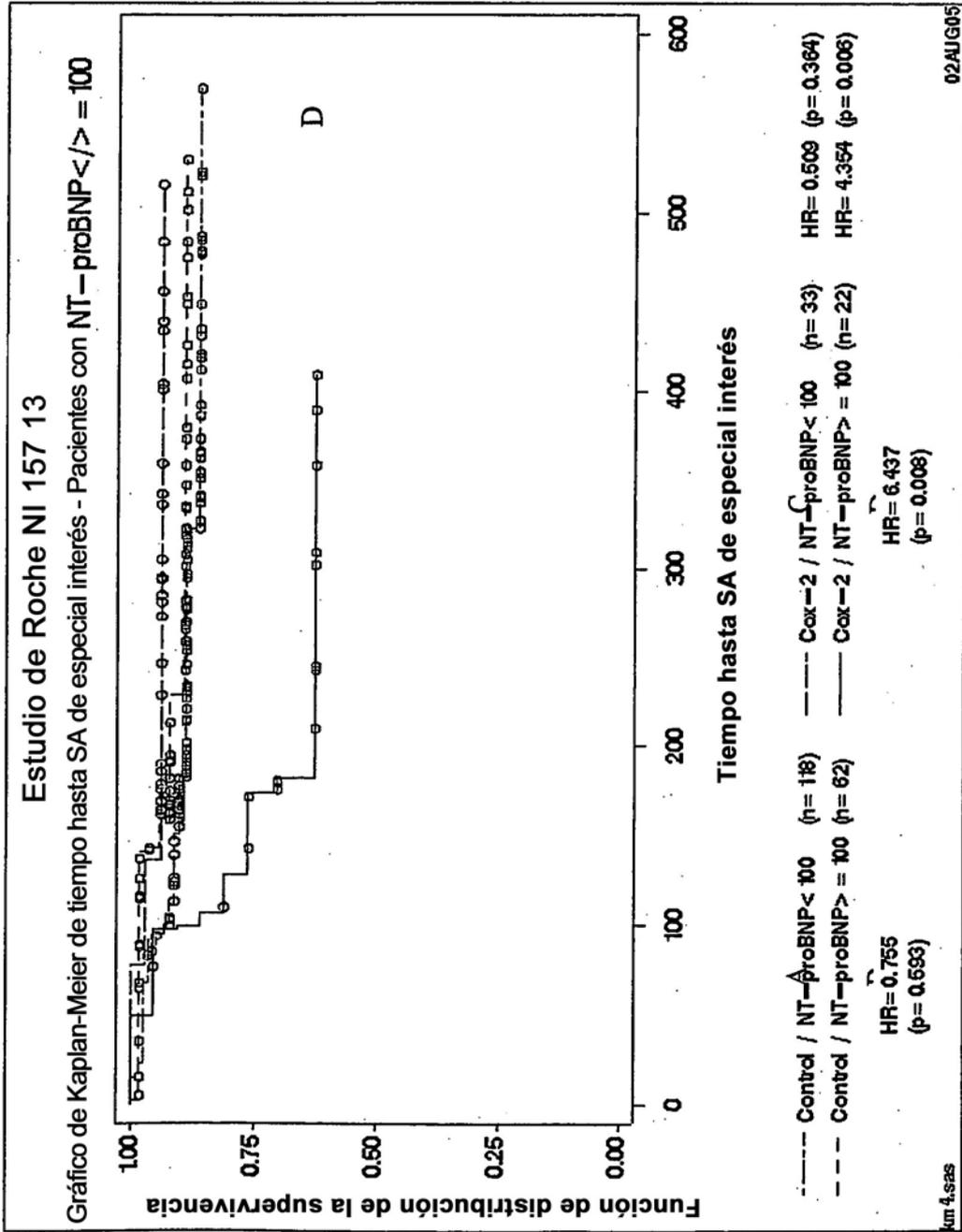


Fig. 4

