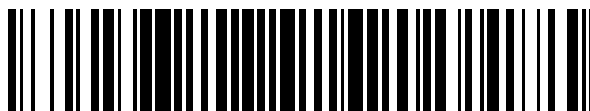


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 022**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08760196 .9**  
96 Fecha de presentación: **29.05.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2198307**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **Mioglobina como predictor precoz del infarto de miocardio**

30 Prioridad:  
**13.09.2007 EP 07116336**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.10.2012**

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

72 Inventor/es:  
**HESS, Georg;  
HÜDIG, Hendrik;  
KIENTSCH-ENGEL, Rosemarie y  
ZDUNEK, Dietmar**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

ES 2 389 022 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

Mioglobina como predictor precoz del infarto de miocardio

- 5 La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico del infarto de miocardio en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo y que presenta un nivel de Troponina cardíaca detectable, pero inferior al nivel considerado como indicativo de la presencia de un infarto de miocardio. Además, la presente invención se refiere a un método para identificar un individuo susceptible de ser sometido a una intervención cardíaca, en el que el individuo está afecto de un síndrome coronario agudo y presenta un nivel de Troponina cardíaca detectable, pero inferior al nivel considerado como indicativo de la presencia de un infarto de miocardio. Los métodos de la presente invención se basan en la determinación de la mioglobina y, opcionalmente, de la proteína transportadora de ácidos grasos específica del miocardio (H-FABP) en una muestra de dicho individuo y comparándola con la cantidad de mioglobina y, opcionalmente, de H-FABP de al menos una cantidad de referencia. También se incluyen en la presente invención los kits o dispositivos para llevar a cabo los métodos de la presente invención.
- 10
- 15 El objetivo de la medicina moderna es proporcionar regímenes terapéuticos personalizados o individualizados. Estos regímenes terapéuticos tienen en cuenta las necesidades y riesgos individuales del paciente. Un riesgo particularmente importante es la presencia de una complicación cardiovascular, especialmente la presencia de un evento cardiovascular agudo. Las complicaciones cardiovasculares son una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en el hemisferio occidental. Para el tratamiento individual de una persona afectada de una complicación cardiovascular, un diagnóstico fiable posee un impacto significativo sobre el éxito del tratamiento de dicha persona. Ello es particularmente importante en pacientes que muestran síntomas de un síndrome coronario agudo (ACS).
- 20
- 25 La expresión síndrome coronario agudo hace referencia a una constelación de síntomas clínicos provocados por la isquemia miocárdica aguda. Los pacientes con síndrome coronario agudo presentan un riesgo significativamente aumentado de muerte y, por lo tanto, necesitan ser identificados entre los paciente con síntomas torácicos no traumáticos (Morrow y otros, National academy of clinical biochemistry guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndrome (“Directrices de la Academia nacional de bioquímica clínica: Características clínicas y utilización de marcadores bioquímicos en los síndromes coronarios agudos”), 2007, Circulation;115:365-375). Los pacientes que presentan síntomas de un evento cardiovascular agudo (por ejemplo, molestia torácica de más de 20 minutos de duración) y acuden a una evaluación urgente son generalmente evaluados mediante electrocardiografía. Además, se obtiene una muestra sanguínea para la determinación del nivel de Troponina cardíaca. La Troponina cardíaca, por ejemplo la Troponina T, es un marcador biológico de infarto de miocardio (MI). El electrocardiograma (ECG) proporciona una información importante para el diagnóstico. En concreto, si el ECG muestra segmentos ST elevados, se diagnostica un infarto de miocardio con elevación del ST (STEMI). Si el ECG no muestra segmentos ST elevados, se diagnostica un IM sin elevación del ST (NSTEMI) cuando se detecta en la respectiva muestra del paciente Troponina cardíaca. En los pacientes sin un ECG diagnóstico y sin Troponina cardíaca detectable se sospecha la presencia de una angina de pecho inestable (UAP). La angina de pecho inestable y el NSTEMI se consideran patologías altamente relacionadas que comparten una presentación clínica similar. Sin embargo, difieren en su gravedad. El NSTEMI se distingue de la angina de pecho inestable por la presencia de una isquemia que provoca una lesión miocárdica irreversible detectable por los marcadores biológicos de necrosis miocárdica (Morrow y otros, citado anteriormente). En todos los casos descritos, es decir STEMI, NSTEMI y UAP, el paciente es tratado según su diagnóstico.
- 30
- 35
- 40
- 45 En las dos últimas décadas, los marcadores biológicos como la Troponina cardíaca se han convertido en herramientas valiosas para el diagnóstico de las enfermedades cardíacas. Son otros marcadores de enfermedades cardíacas, por ejemplo, el NTproBNP, o el isoenzima MB de la creatinin-quinasa (CK-MB). Recientemente, se ha demostrado que la determinación de mioglobina es una herramienta valiosa para el diagnóstico de individuos con síntomas de ACS (Brogan G.X. y otros. Evaluation of a new rapid quantitative immunoassay for serum myoglobin versus CK-MB for ruling out acute myocardial infarction in the emergency department (“Evaluación de un nuevo inmunoensayo cuantitativo rápido de la mioglobina sérica en comparación con la CK-MB para descartar el infarto agudo de miocardio en el departamento de urgencias”). 1994. Ann. Emerg. Med. 24(4):665-71). La determinación de mioglobina presenta la ventaja de que pueden determinarse concentraciones elevadas poco después del inicio de los síntomas (aproximadamente 1 hora), y diversos estudios han demostrado su elevada sensibilidad para la detección del AMI a las pocas horas de un ACS. Sin embargo, la utilización de la mioglobina en el diagnóstico del infarto de miocardio tiene algunas limitaciones. Aunque la concentración de mioglobina se incrementa rápidamente tras el inicio de los síntomas, la concentración disminuye rápidamente tras aproximadamente 8 a 16 horas (James McCord y otros, Ninety-Minute Exclusion of Acute Myocardial Infarction By Use of Quantitative Point-of-Care Testing of Myoglobin and Troponin I (“Exclusión del diagnóstico de infarto de miocardio a los noventa minutos mediante la utilización de la determinación cuantitativa en el lugar de atención de mioglobina y troponina I”). 2001. Circulation 104:1483; Morrow y otros, National academy of clinical biochemistry guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndrome (“Directrices de la Academia nacional de bioquímica clínica: Características clínicas y utilización de marcadores bioquímicos en los síndromes coronarios agudos”), 2007, Circulation;115:356-375).
- 50
- 55
- 60
- 65

Sallach y otros, (2004, *The American Journal of Cardiology*, 94: 864-867) han publicado anteriormente un estudio sobre la utilidad de la mioglobina para la detección del infarto de miocardio en pacientes con dolor torácico pero sin cambios en el ECG y con niveles de Troponina I inferiores a 0,4 ng/ml. Se observó en este grupo de pacientes que un incremento de los niveles de mioglobina en el momento del ingreso precedía un incremento posterior de la troponina a valores superiores a los 0,4 ng/ml. El dintel de 0,4 ng/ml se ha considerado como indicativo de infarto de miocardio (MI). Sin embargo, generalmente se consideran como indicativos de MI niveles de troponinas cardíacas tan bajos como 0,1 ng/ml (Antman y otros, 2000, *Myocardial infarction redefined – consensus document of the Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology committee*, (“Redefinición del infarto de miocardio – Documento de consenso del comité conjunto de la Sociedad europea de cardiología/ American collage of Cardiology, *Am. Coll. Cardiol.*, 36: 959-969). Por lo tanto, el estudio de Sallach contenía un gran número de pacientes cuyo MI, según el conocimiento generalmente aceptado, ya era evidente en el momento del ingreso. Por lo tanto, la utilidad de la mioglobina como marcador biológico precoz de MI no fue demostrada por Sallach.

Más recientemente, se ha sugerido la proteína transportadora de ácidos grasos específica de miocardio (H-FABP) como marcador biológico precoz de infarto de miocardio. La proteína transportadora de ácidos grasos específica de miocardio (H-FABP) es una proteína citoplasmática de bajo peso molecular muy abundante en el miocardio. Cuando se lesiona el miocardio, como ocurre en el caso del infarto de miocardio, se liberan a la circulación proteínas citoplasmáticas de bajo peso molecular incluyendo la H-FABP, siendo detectables niveles elevados de H-FABP en las muestras sanguíneas (por ejemplo, Okamoto y otros, *Clin Chem Lab Med* 38(3):231-8 (2000) *Human Heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein (H-FABP) for the diagnosis of acute myocardial infarction. Clinical evaluation of H-FABP in comparison with myoglobin and creatinine kinase isoenzyme MB* (“Proteína citoplasmática transportadora de ácidos grasos específica de miocardio (H-FABP) para el diagnóstico del infarto agudo de miocardio. Evaluación clínica de H-FABP en comparación con la mioglobina y el isoenzima MB de la creatinin-quinasa”); O’Donoghue y otros, *Circulation*, 114,550-557 (2006) *Prognostic utility of Heart-type Fatty Acid Binding Protein in patients with acute coronary syndrome* (“Utilidad pronóstica de la Proteína transportadora de ácidos grasos específica de miocardio en pacientes con síndrome coronario agudo”) o Ruzgar y otros. *Heart Vessels*, 21;209-314 (2006) *The use of human heart-type fatty acid binding protein as an early diagnostic marker of myocardial necrosis in patients with acute coronary syndrome, and its comparison with troponin-T and its creatinine kinase myocardial band* (“Utilización de la proteína transportadora de ácido grasos específica de miocardio humana como marcador diagnóstico precoz de necrosis miocárdica en pacientes con síndrome coronario agudo, y su comparación con la troponina-T y su banda de creatinin-quinasa miocárdica”).

El descubrimiento de que la Troponina cardíaca, por ejemplo la Troponina cardíaca T (TnT) o la Troponina cardíaca I (TnI) es un marcador de infarto de miocardio ha revolucionado el diagnóstico y manejo de los pacientes con síntomas de ACS. En concreto, la Troponina cardíaca T es un marcador muy específico de lesión miocárdica y, por lo tanto, permite diferenciar entre UAP y MI en pacientes con síntomas de ACS. Sin embargo, existen aún algunos problemas relacionados con la utilización de la Troponina cardíaca como marcador diagnóstico en pacientes con síndrome coronario agudo. Por ejemplo, el nivel de Troponina cardíaca no está habitualmente elevado al inicio de los síntomas del evento coronario agudo. De modo general, un nivel elevado de Troponina se puede detectar aproximadamente de 4 a 6 horas después del inicio de síntomas de ACS. Por ello, entre las 0 y 6 horas de un evento cardiovascular agudo, la utilización de la Troponina como marcador biológico para el diagnóstico del infarto de miocardio genera una proporción relativamente elevada de resultados falsos negativos. Por lo tanto, un infarto de miocardio puede no ser reconocido mediante el ensayo de la Troponina cardíaca y ello puede dar lugar a un tratamiento posiblemente inadecuado o tardío. La introducción de una nueva generación de ensayos de Troponina cardíaca, que son más sensibles que los ensayos de Troponina de generaciones previas y que, por lo tanto, pueden detectar niveles de Troponina mucho más bajos, ha permitido una detección más fiable y temprana de niveles elevados de Troponina cardíaca. Por lo tanto, en presencia de un infarto de miocardio, la necrosis puede detectarse de forma más temprana. Sin embargo, estudios recientes han puesto en evidencia que, utilizando ensayos de Troponina cardíaca más sensibles, la Troponina cardíaca también puede detectarse de forma reproducible en pacientes con una enfermedad coronaria estable que no padecen un evento agudo (datos no publicados). Por lo tanto, si una persona con una enfermedad cardíaca coronaria estable y un nivel ya detectable, pero aún bajo de Troponina cardíaca muestra síntomas de ACS, no queda claro si el nivel detectable de Troponina cardíaca elevado es debido al evento agudo o la enfermedad cardíaca coronaria ya existente. Ello da lugar a la posibilidad de un diagnóstico incorrecto, por ejemplo MI en lugar de UAP, lo que resulta en un tratamiento posiblemente perjudicial, incorrecto y/o tardío.

Por lo tanto, existe una clara necesidad para medios y métodos diagnósticos y pronósticos que permitan un diagnóstico de MI rápido y fiable en los individuos que presentan síntomas de síndrome coronario agudo y cuyos niveles de Troponina cardíaca están cercanos al límite de detección. Dichos medios y métodos deberán permitir el diagnóstico de dichos sujetos y permitirá identificar a un sujeto como susceptible de intervención cardíaca, un tratamiento apropiado de dicho sujeto evitará los inconvenientes de las técnicas actuales tal como se ha establecido anteriormente.

Por lo tanto, el problema técnico que subyace en la presente invención debe ser visto como la provisión de medios y métodos que cumplan con las necesidades anteriormente mencionadas.

El problema técnico se soluciona por las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y a continuación.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico del infarto de miocardio en un individuo que padece un síndrome coronario agudo y un nivel de Troponina cardíaca detectable, per inferior al nivel considerado como indicativo de infarto de miocardio, que comprende

- a) determinar la cantidad de mioglobina en una muestra de dicho individuo,
- b) comparar la cantidad de mioglobina determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
- c) diagnosticar el infarto de miocardio en base a la información obtenida en las etapas a) y b).

En una realización del método mencionado anteriormente de la presente invención, adicionalmente se determina en una etapa adicional aa) la cantidad de proteína transportadora de ácidos grasos del miocardio (H-FABP, frecuentemente también denominada Proteína transportadora de ácidos grasos específica de miocardio) en una muestra de dicho individuo y se compara con al menos una cantidad de referencia de H-FABP en una etapa bb). Por consiguiente, en la etapa c) el infarto de miocardio se diagnostica sobre la base de las cantidades determinadas de mioglobina y H-FABP y la comparación con la cantidad de mioglobina de al menos una cantidad de referencia de mioglobina y la comparación de la cantidad de H-FABP con al menos una cantidad de referencia de H-FABP. Preferentemente, se determina primero la cantidad de mioglobina y posteriormente la cantidad de H-FABP, sin embargo también se contempla que se determinen las cantidades de mioglobina y H-FABP en cualquier orden, es decir de forma simultánea, o en primer lugar mioglobina y a continuación H-FABP o en primer lugar H-FABP y a continuación mioglobina.

El método de la presente invención es, preferentemente, un método in vitro. Además, puede incluir etapas adicionales a las mencionadas explícitamente con anterioridad. Por ejemplo, las etapas adicionales pueden referirse al pre-tratamiento o a la evaluación de los resultados obtenidos mediante el método. El método de la presente invención también puede ser utilizado para la monitorización, confirmación o subclasificación de un diagnóstico. El método puede ejecutarse de forma manual o asistida por automatización. Preferentemente, las etapas (a), (b) y/o (c) pueden estar total o parcialmente asistidas por automatización, por ejemplo mediante un equipo de robótica y sensores adecuados para la determinación en la etapa (a) o una comparación mediante métodos informáticos en la etapa (b).

El término "diagnóstico del infarto de miocardio" se refiere a evaluar si recientemente se ha producido o no un infarto de miocardio en un individuo, tal como se define en la presente invención (es decir, un individuo afecto de un ACS que presenta un nivel de Troponina cardíaca detectable, pero inferior al nivel considerado indicativo de la presencia de un MI) y, por lo tanto, si la causa subyacente del ACS es un infarto de miocardio o una angina de pecho inestable. El término "infarto de miocardio" es conocido por los expertos en la técnica. El término se refiere a la necrosis irreversible del miocardio como resultado de una isquemia prolongada. Como se entenderá por los expertos en la técnica, habitualmente no se pretende que el diagnóstico sea correcto en el 100% de los individuos analizados. El término, sin embargo, requiere que el diagnóstico sea válido en una proporción estadísticamente significativa de los individuos examinados. Si una proporción es estadísticamente significativa, puede determinarse sin más por los expertos en la técnica utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, la prueba de la T de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles pueden encontrarse en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research* ("Estadística para investigación"), John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son de al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. Los valores p son, preferentemente 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferentemente, la probabilidad prevista por la presente invención permite que el diagnóstico sea correcto en al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de los individuos de una cohorte determinada.

El término "individuo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y más preferentemente, humanos.

El individuo deberá presentar, preferentemente, síntomas de ACS. El término "síndrome coronario agudo" (ACS) es conocido por los expertos en la técnica. El término se refiere a la constelación de síntomas clínicos provocados por la isquemia miocárdica aguda. La isquemia en sí misma es el resultado de la disrupción de una placa aterosclerótica en una arteria coronaria. Los síntomas de ACS son, preferentemente, dolor torácico de más de 20 minutos de duración, dificultad para respirar, náuseas, vómitos y /o sudoración. Además, es conocido que el dolor torácico irradia frecuentemente al brazo izquierdo y el ángulo izquierdo de la mandíbula. Generalmente, estos síntomas clínicos, especialmente el dolor torácico, se presentan de forma brusca; aparecen en reposo o tras un ejercicio mínimo. Además, en el contexto de la presente invención, el término "síndrome coronario agudo" también se refiere a la sospecha, presunción, o posibilidad de ACS, dado que estos términos se utilizan frecuentemente en los paciente que muestran síntomas compatibles con un ACS, pero en los que no se ha establecido el diagnóstico de forma concluyente (ver Morrow, citado anteriormente). Los pacientes con ACS pueden presentar una angina de pecho

5 inestable (UAP) o pueden estar afectos de un infarto de miocardio (MI). El MI puede ser un MI con elevación del ST (STEMI) o un MI sin elevación del ST (NSTEMI). El MI se clasifica dentro de las enfermedades cardíacas coronarias (CHD) y es precedido por otros eventos también clasificados dentro de las CHD, como la angina de pecho inestable (UAP). En el caso de la UAP es sintomático el dolor torácico que desaparece mediante la administración sublingual de nitroglicerina. La UAP es provocada por la oclusión parcial de las arterias coronarias que provoca hipoxemia e isquemia miocárdica. En el caso de que la oclusión sea demasiado importante o total, se produce una necrosis miocárdica irreversible (que es el estado patológico que subyace en el infarto de miocardio). Generalmente, el STEMI se diagnostica mediante electrocardiografía, en cuyo caso el electrocardiograma (ECG) muestra elevación del segmento ST. La determinación del nivel de Troponina cardíaca al menos seis horas después del inicio de los síntomas de ACS permite diferenciar entre UAP y NSTEMI. Si el nivel de Troponina es elevado (lo que indica lesión miocárdica) se asume el diagnóstico de NSTEMI. El MI se puede producir sin síntomas obvios, es decir sin que el individuo muestre ninguna molestia, ni el MI está precedido de angina estable o inestable. Cuando se produce un MI, éste puede ser seguido de la aparición de una disfunción ventricular izquierda (LVD).

10

15 Se contempla particularmente que el individuo puede estar afecto de una enfermedad cardíaca coronaria (también denominada frecuentemente como enfermedad arterial coronaria) antes del ACS y que presente ya niveles detectables de Troponina cardíaca al inicio de los síntomas de ACS (y, por lo tanto, también anteriores al inicio de los síntomas). Particularmente, dicho sujeto tendrá niveles detectables de Troponina cardíaca, pero más bajos que el nivel que se considera indicativo de MI en el inicio de los síntomas de ACS. Para dicho individuo, el método de la presente invención será particularmente ventajoso dado que, en el caso de un ACS, no quedará claro si los niveles elevados de Troponina cardíaca indican un evento agudo (necrosis en curso) o son debidos a una enfermedad cardíaca coronaria previamente existente.

20

25 El término "Troponina cardíaca" se refiere a todas las isoformas de Troponina expresadas en células del corazón y, preferentemente, las células subendocárdicas. Estas isoformas están bien caracterizadas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Anderson 1995, *Circulation Research*, vol. 76, nº 4: 681-686 y Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44; 487-493. Preferentemente, el término Troponina cardíaca se refiere a la Troponina T y/o la Troponina I y, más preferentemente, a la Troponina T. Debe entenderse que en el método de la presente invención pueden determinarse las isoformas de la Troponina de forma conjunta, es decir simultáneamente o secuencialmente o de forma individual, es decir sin determinar en ningún momento la otra isoforma. Las secuencias de aminoácidos de la Troponina T humana y la Troponina I humana se dan a conocer en Anderson, citado previamente, y Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44; 487-493. El término "Troponina cardíaca" incluye también variantes de las Troponinas específicas previamente mencionadas, es decir, preferentemente de la Troponina T o de la Troponina I. Dichas variantes poseen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en la presente invención, por ejemplo ensayos ELISA utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen de forma específica dichas Troponinas cardíacas. Además, debe entenderse que una variante, tal como se define de acuerdo con la presente invención, deberá poseer una secuencia de aminoácidos que difiera como consecuencia de al menos la sustitución, delección y/o adición de un aminoácido, siendo así y todo la secuencia de aminoácidos de la variante idéntica al menos, preferentemente, en un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de la Troponina específica. Las variantes pueden ser variantes alélicas o genes homólogos, parálogos u ortólogos específicos de cualquier otra especie. Además, las variantes referidas en la presente invención incluyen fragmentos de Troponinas cardíacas específica o de los tipos de variantes previamente mencionados siempre y cuando dichos fragmentos posean las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales, tal como se ha definido anteriormente. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de las Troponinas. También se incluyen además aquellas variantes que difieren debido a modificaciones post-traducción tales como la fosforilación o la miristilación.

30

35

40

45

50 El término "nivel de Troponina cardíaca" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a la concentración de Troponina cardíaca, preferentemente de TnT. Preferentemente, el término se refiere a la concentración de Troponina cardíaca en una muestra de plasma o suero de un individuo. El término "nivel de Troponina cardíaca detectable" puede referirse a cualquier nivel de Troponina cardíaca diferente de cero y que es detectable mediante los medios y métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante ensayos de Troponina cardíaca disponibles comercialmente. Preferentemente, el término "nivel de Troponina cardíaca detectable" se refiere a una concentración igual o mayor que el límite de detección inferior del ensayo utilizado para determinar el nivel de Troponina. Preferentemente, el nivel de Troponina cardíaca detectable puede referirse a cualquier concentración igual o superior a 0,001 ng/ml, 0,005 ng/ml, 0,0075 ng/ml, o superior, preferentemente igual o superior a 0,01 ng/ml o 0,002 ng/ml. De forma más preferentemente, el nivel de Troponina cardíaca detectable se refiere a cualquier concentración igual o superior a 0,002 ng/ml. El término "nivel de Troponina considerado indicativo de infarto de miocardio" se refiere a la concentración comúnmente aceptada de Troponina que indica un infarto de miocardio. Preferentemente, el nivel de Troponina considerado indicativo de infarto de miocardio se refiere a una concentración por encima de la concentración del percentil 99 de una población de referencia adecuada (punto de corte). Este nivel se basa en la recomendación realizada por un comité conjunto de la Sociedad europea de cardiología/ American College of Cardiology para evitar resultados falsos positivos (The Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined – a consensus document of the Joint European Society of

55

60

65

Cardiology/ American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction, (Comité conjunto de la Sociedad Europea de Cardiología/ American college of Cardiology. Redefinición del infarto de miocardio – Documento de consenso del comité conjunto de la Sociedad europea de cardiología/ American College of Cardiology para la redefinición del infarto de miocardio.) J. Am. Coll. Cardiol. 2000;36:959-969). Los expertos en la técnica saben cómo seleccionar una población de referencia adecuada y cómo determinar la concentración del percentil 99. Debe entenderse que esta concentración puede ser diferente según el ensayo utilizado para determinar la concentración de Troponina cardiaca y según la población de referencia seleccionada. Los niveles de Troponina cardiaca preferentes considerados indicativos de MI en el contexto de la presente invención pueden ser, pero sin carácter limitante, de 0,05 ng/ml, 0,075 ng/ml, 0,099 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,2 y 0,3 ng/ml. El nivel más preferente de Troponina cardiaca considerado indicativo de MI en el contexto de la presente invención es 0,1 ng/ml. Debe entenderse que un nivel detectable (por ejemplo, superior a 0,002 ng/ml) de una Troponina cardiaca se considera un nivel elevado de dicha Troponina cardiaca dado que dichos niveles no se detectan habitualmente en individuos sanos. Además, un nivel elevado de una Troponina cardiaca indica necrosis.

En una realización preferente de los métodos de la presente invención, el nivel de Troponina, particularmente el nivel de Troponina T, en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo y que presenta un nivel de Troponina cardiaca detectable, pero inferior al nivel considerado indicativo de infarto de miocardio (tal como se define en la presente solicitud) es igual o superior a 0,002 e inferior a 0,1 ng/ml.

La mioglobina es una hemoproteína citoplasmática formada por una sola cadena polipeptídica de 154 aminoácidos y se expresa prácticamente de forma exclusiva en los miocitos cardiacos y las fibras de músculo esquelético oxidativas. Al igual que la hemoglobina, la mioglobina se une reversiblemente al oxígeno y por lo tanto puede facilitar el transporte de oxígeno desde los hematíes a las mitocondrias durante los períodos de incremento de la actividad metabólica o servir como reserva de oxígeno durante situaciones de hipoxia o anoxia. Ordway G. y Garry D.J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle (“Mioglobina: Una proteína esencial del músculo estriado”) 2004. Journal of Experimental Biology 207, 3441-3446 (2004). La mioglobina es bien conocida en la técnica. Además son bien conocidos ensayos para determinar la cantidad de mioglobina.

La proteína transportadora de ácidos grasos específica de miocardio, también denominada en la presente invención H-FABP o proteína transportadora de ácidos grasos de miocardio, es una pequeña proteína citoplasmática que actúa como el principal transportador de los ácidos grasos de cadena larga en el cardiomiocito. H-FABP está presente en el miocardio y generalmente se cree que se libera rápidamente en la circulación en respuesta a la lesión del miocardio. Diversos estudios han demostrado que H-FABP es un marcador bioquímico precoz de infarto de miocardio por ejemplo Okamoto y otros, Clin Chem Lab Med 38(3):231-8 (2000) Human Heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein (H-FABP) for the diagnosis of acute myocardial infarction. Clinical evaluation of H-FABP in comparison with myoglobin and creatinine kinase isoenzyme MB (“Proteína citoplasmática transportadora de ácidos grasos específica de miocardio (H-FABP) para el diagnóstico del infarto agudo de miocardio. Evaluación clínica de H-FABP en comparación con la mioglobina y el isoenzima MB de la creatinin-quinasa”); O’Donoghue y otros, Circulation, 114,550-557 (2006) Prognostic Utility of Heart-type Fatty Acid Binding Protein in patients with acute coronary syndrome (“Utilidad pronóstica de la Proteína transportadora de ácidos grasos específica de miocardio en pacientes con síndrome coronario agudo”) o Ruzgar y otros. Heart Vessels, 21;209-314 (2006) The use of human heart-type fatty acid binding protein as an early diagnostic marker of myocardial necrosis in patients with acute coronary syndrome, and its comparison with troponin-T and its creatinine kinase myocardial band (“Utilización de la proteína transportadora de ácido grasos específica de miocardio humana como marcador diagnóstico precoz de necrosis miocárdica en pacientes con síndrome coronario agudo, y su comparación con la troponina-T y su banda de creatinin-quinasa miocárdica”). H-FABP es bien conocida en la técnica. Además, son bien conocidos los ensayos para determinar la cantidad de H-FABP.

Los términos “Mioglobina” y “H-FABP” utilizados en la presente invención también incluyen variantes de los polipéptidos mioglobina y la H-FABP, respectivamente. Dichas variantes poseen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que los polipéptidos mioglobina y H-FABP específicos. En concreto, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en la presente invención, por ejemplo ensayos ELISA utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen de forma específica dichos polipéptidos mioglobina y H-FABP, respectivamente. Además, debe entenderse que una variante, tal como se define de acuerdo con la presente invención, deberá poseer una secuencia de aminoácidos que difiera como consecuencia de al menos la sustitución, delección y/o adición de un aminoácido, siendo así la secuencia de aminoácidos de la variante, idéntica al menos, preferentemente, en un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos específicos mioglobina y H-FABP, respectivamente. El nivel de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el nivel de identidad se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, de manera que en un alineamiento óptimo el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (por ejemplo, espacios o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones). El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales existe un residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias dando como

- resultado el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 dando como resultado el porcentaje de identidad de la secuencia. La alineación óptima de las secuencias para realizar la comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Add. APL. Math.* 2:482(1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homologías de Needleman y Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsquedas de similitud de Pearson y Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el paquete de software de genética Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para ser comparadas, se utilizan preferentemente GAP y BESTFIT para determinar su alineamiento óptimo y, por lo tanto, su nivel de identidad. Preferentemente se utilizan por defecto un valor de 5,00 para el peso del intersticio y de 0,30 para la longitud del peso intersticio. Las variantes mencionadas anteriormente pueden ser variantes alélicas o genes homólogos, parálogos u ortólogos específicos de cualquier otra especie. Además, las variantes mencionadas en la presente invención incluyen fragmentos de los polipéptidos específicos mioglobina y H-FABP o de los tipos de variantes previamente mencionados siempre y cuando dichos fragmentos posean las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales, tal como se ha definido anteriormente. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de los polipéptidos mioglobina y H-FABP. También se incluyen aquellas variantes que difieren debido a modificaciones post-traducción, tales como la fosforilación o la miristilación.
- El término "muestra" se refiere a una muestra de fluido corporal, a una muestra de células individualizadas o a una muestra de un tejido u órgano. Las muestras de fluidos corporales pueden obtenerse mediante técnicas bien conocidas e incluyen, preferentemente, muestras de sangre, plasma, suero, u orina, más preferentemente muestras de sangre, plasma o suero. Las muestras de tejidos u órganos pueden obtenerse de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, una biopsia. Las células individualizadas pueden obtenerse de fluidos corporales o de tejidos u órganos mediante técnicas de separación como la centrifugación o la clasificación de células. Preferentemente, las muestras de células, tejidos u órganos se obtienen de aquellas células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos mencionados en la presente invención. Preferentemente, el término "muestra" se refiere a una muestra de suero o plasma, más preferentemente a una muestra de suero.
- La muestra se obtiene en un punto temporal conocido por los expertos en la técnica. Preferentemente, la muestra se obtiene del individuo de acuerdo con la presente invención poco después, preferentemente no más de 2 horas (y por lo tanto en las primeras 2 horas), y, más preferentemente, no más de 4 horas, y más preferentemente, no más de 6 horas después del inicio de los síntomas del síndrome coronario agudo. El método de la presente invención es particularmente ventajoso en casos en que las muestras se obtienen poco después del inicio de los síntomas del ACS. En dichos casos no está claro si un nivel de Troponina cardíaca detectable y elevado es debido al evento agudo o a una enfermedad cardíaca coronaria previamente existente.
- Determinar la cantidad de mioglobina, preferentemente mioglobina humana, o la cantidad de H-FABP, preferentemente H-FABP humana, o cualquier otro péptido o polipéptido o proteína mencionado en la presente invención se refiere a medir la cantidad o concentración, preferentemente de forma cuantitativa o semi-cuantitativa. Los términos polipéptido y proteína se utilizan en la presente solicitud de forma intercambiable. La medición puede realizarse de forma directa o indirecta. La medición directa se refiere a la medición de la cantidad o concentración del péptido o polipéptido sobre la base de una señal que se obtiene a partir del propio péptido o polipéptido y cuya intensidad se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presentes en la muestra. Dicha señal, en ocasiones denominada en la presente invención como señal de intensidad, puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta incluye la medición de una señal obtenida a partir de un componente secundario (es decir, un componente que no es el propio péptido o polipéptido) o de un sistema de lectura biológico, por ejemplo, respuestas biológicas, ligandos, marcadores o productos de reacciones enzimáticas medibles.
- Según la presente invención, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido puede llevarse a cabo mediante todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos de inmunoensayo, y métodos que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayos tipo sándwich, competitivos u otros. Dichos ensayos desarrollarán una señal indicativa de la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la potencia de la señal puede, preferentemente, correlacionarse de forma directa o indirecta (por ejemplo inversa o proporcional) a la cantidad de polipéptido presente en la muestra. Además, los métodos adecuados comprenden una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido, tal como su masa molecular o espectro RMN concretos. Dichos métodos comprenden, preferentemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos como espectrómetros de masa, analizadores RMN, o dispositivos cromatográficos. Además, los métodos incluyen métodos ELISA en microplacas, inmunoensayos totalmente automatizados o robotizados (disponibles, por ejemplo, en los analizadores Elecsys™), CBA (Cobalt Binding Assay) (ensayo de unión en cobalto) disponible, por ejemplo en los analizadores Roche-Hitachi™ y ensayos de aglutinación en látex (disponibles, por ejemplo, en los analizadores Roche-Hitachi™).
- Preferentemente, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido comprende las etapas de (a) poner en contacto

una célula capaz de provocar una respuesta cuya intensidad es indicativa de la cantidad de péptido o polipéptido con dicho péptido o polipéptido durante un período adecuado de tiempo, (b) medir la respuesta celular. Para medir las respuestas celulares, preferentemente, se añade la muestra o la muestra procesada a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión medible de un gen informador o la secreción de una sustancia, por ejemplo, un péptido, polipéptido o molécula pequeña. La expresión o sustancia deberá generar una señal de intensidad que se correlacione con la cantidad de péptido o polipéptido.

También preferentemente, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido comprende la etapa de medir una señal específica de intensidad obtenible a partir del péptido o polipéptido en la muestra. Tal como se ha descrito anteriormente, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada en un m/z variable específico del péptido o polipéptido observado en los espectros de masas o un espectro RMN específico para el péptido o polipéptido.

Determinar la cantidad de péptido o polipéptido puede, preferentemente, comprender las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará un señal de intensidad. La unión, según la presente invención, incluye tanto la unión covalente como la unión no covalente. Un ligando, según la presente invención, puede ser cualquier compuesto, por ejemplo un péptido, polipéptido, ácido nucleico, o molécula pequeña, que se une a los péptidos o polipéptidos descritos en la presente invención. Como ligandos preferentes se incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos, tales como receptores o parejas de unión del péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos que comprende los dominios de unión para los péptidos, y aptámeros, por ejemplo aptámeros de ácidos nucleicos o péptidos. Los métodos para preparar dichos ligando son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los suministradores comerciales también ofrecen la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados. Los expertos en la técnica están familiarizados con los métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. A continuación, puede evaluarse la unión de estos derivados, según procedimientos de cribado conocidos en la técnica, por ejemplo mediante la técnica de expresión en fagos ("phage display"). Los anticuerpos tal como se mencionan en la presente invención incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, como fragmentos Fv, Fab, y F(ab)<sub>2</sub> capaces de unirse a un antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena única y anticuerpos híbridos humanizados en los que secuencias de aminoácidos de anticuerpos dadores no humanos que muestran una especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de aminoácidos de anticuerpos aceptadores humanos. Las secuencias dadoras incluirán habitualmente al menos los residuos de aminoácido que se unen al antígeno del dador pero pueden incluir otros residuos de aminoácido relevantes desde un punto de vista estructural y/o funcional. Dichos híbridos pueden prepararse mediante diversos métodos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el ligando o agente se une de forma específica al péptido o polipéptido. Unión específica, según la presente invención, significa que el ligando o agente no debe unirse substancialmente a (tener "reacción cruzada" con) otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra a analizar. Preferentemente, el péptido o polipéptido unido de forma específica debe unirse con una afinidad al menos 3 veces superior, más preferentemente al menos 10 veces superior, e incluso más preferentemente 50 veces superior que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si sigue pudiendo distinguirse y medirse de forma inequívoca, por ejemplo, según su tamaño en una transferencia Western, o por su relativamente alta abundancia en la muestra. La unión del ligando puede medirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferentemente, dicho método es semi-cuantitativo o cuantitativo. A continuación se describen los métodos adecuados.

En primer lugar, la unión del ligando puede medirse de forma directa, por ejemplo mediante RMN o resonancia de plasmones superficiales.

En segundo lugar, si el ligando también actúa como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse el producto de la reacción enzimática (por ejemplo, la cantidad de una proteasa puede medirse midiendo la cantidad de sustrato escindido en, por ejemplo, una transferencia Western). Alternativamente, el propio ligando puede mostrar propiedades enzimáticas y puede ponerse en contacto el complejo "ligando/ péptido o polipéptido" o el ligando unido por el péptido o polipéptido, respectivamente, con un sustrato adecuado permitiendo la detección a través de la generación de una señal de intensidad. Para la medición de productos de reacciones enzimáticas, preferentemente la cantidad de sustrato es saturante. También puede marcarse el sustrato con un marcador detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un período adecuado de tiempo. Un período adecuado de tiempo significa el tiempo necesario para que se produzca una cantidad de producto detectable, preferentemente medible. En lugar de medir la cantidad de producto, puede medirse el tiempo necesario para la aparición de una cantidad (por ejemplo, detectable) de producto.

En tercer lugar, el ligando puede acoplarse de forma covalente o no covalente a un marcador que permita la detección y medición del ligando. El marcaje puede realizarse mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo supone el acoplamiento del marcador de forma directa (covalente o no covalente) al ligando. El marcaje indirecto supone la unión (covalente o no covalente) al primer ligando de un ligando secundario. El ligando secundario debería unirse de forma específica al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse a un marcador adecuado y/o ser la diana (receptor) de un ligando terciario que se une al ligando secundario. La utilización de ligandos secundarios, terciarios e incluso de un orden superior es utilizada habitualmente para



incrementar la señal. Los ligandos secundarios o de orden superior pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios y el bien conocido sistema estreptavidina-biotina (Vector Laboratories Inc.). El ligando o substrato también puede ser "etiquetado" con una o más etiquetas, tal como se conoce en la técnica. Dichas etiquetas pueden ser entonces dianas para ligandos de orden superior. Como etiquetas adecuadas se incluyen la biotina, la digoxigenina, la His-Tag, la glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, myc-tag, la hemaglutinina del virus de la gripe A (HA), la proteína de unión a maltosa, y similares. En el caso de péptidos o polipéptidos, la etiqueta se sitúa preferentemente en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Es un marcador adecuado cualquier marcador detectable mediante un método de detección adecuado. Como marcadores típicos se incluyen las partículas de oro, perlas de látex, el éster acridinio, el luminio, el rutenio, los marcadores enzimáticamente activos, los marcadores radioactivos, los marcadores magnéticos (por ejemplo "perlas magnéticas", incluyendo los marcadores paramagnéticos y supramagnéticos) y los marcadores fluorescentes. Como marcadores enzimáticamente activos se incluyen por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa, la Luciferasa, y derivados de los mismos. Como substratos adecuados para la detección se incluyen la di-amino-bencidina (DAB), la 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina, el NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como solución madre ya preparada de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación enzima substrato adecuada puede dar lugar a un producto de reacción de color, fluorescencia o quimioluminiscencia, que puede medirse según métodos conocidos en la técnica (por ejemplo utilizando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). Para la medición de una reacción enzimática, se aplican de forma análoga los criterios descritos previamente. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como la GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Rojo Texas, fluoresceína, y los colorantes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Además los marcadores fluorescentes están disponibles, por ejemplo, de Molecular Probes (Oregon). También se contempla la utilización de puntos cuánticos. Como marcadores radioactivos típicos se incluyen el S<sup>35</sup>, el I<sup>125</sup>, el P<sup>32</sup>, el P<sup>33</sup> y similares. Los marcadores radioactivos pueden detectarse mediante cualquier método conocido y adecuado, por ejemplo, una película sensible a la luz o una pantalla de fósforo. También se incluyen como métodos de medición adecuados, según la presente invención, la precipitación (particularmente la inmunoprecipitación), la electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia generada por electricidad), el RIA (radioinmunoensayo), el ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), los ensayos enzimo-inmunológicos tipo sándwich, los inmunoensayos tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), el fluoro-inmunoensayo de disociación potenciado por lantánidos (DELFA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría potenciada por látex, o ensayos inmunológicos en fase sólida. Pueden utilizarse métodos adicionales conocidos en la técnica (como la electroforesis en gel, la electroforesis en gel 2D, la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), la transferencia Western, y la espectrometría de masas) solos o combinados con el marcaje u otros métodos descritos previamente.

La cantidad de péptido o polipéptido también puede determinarse, preferentemente, del modo siguiente: (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando del péptido o polipéptido, tal como se ha especificado anteriormente, con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) medir la cantidad de péptido o polipéptido que se une al soporte. El ligando, seleccionado preferentemente del grupo formado por ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está presente preferentemente en el soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para la fabricación de soportes sólidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, materiales en columna, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas de metales coloidales, superficies de vidrio y/o chips de silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, hojas, duracitas, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico etc. El ligando o agente puede unirse a muchos transportadores diferentes. Como ejemplos de transportadores bien conocidos en la técnica se incluyen el vidrio, el poliestireno, el cloruro de polivinilo, el polipropileno, el polietileno, el policarbonato, el dextrano, el nylon, las amilosas, las celulosas naturales y modificadas, las poliacrilamidas, las agarosas, y la magnetita. La naturaleza del transportador puede ser soluble o insoluble para el propósito de la invención. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, sin carácter limitante, interacciones iónicas, hidrofóbicas, covalentes y similares. También se contempla el uso de "matrices en suspensión" como matrices, según la presente invención (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12.) En dichas matrices en suspensión, el transportador, por ejemplo, una microperla o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consta de diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que llevan diferentes ligandos. Los métodos para producir dichas matrices, por ejemplo sobre la base de la química en fase sólida y grupos protectores foto lábiles, son conocidos en general (US 5.744.305).

Preferentemente, la cantidad de mioglobina y la cantidad de H-FABP (si se mide la cantidad de F-HABP) se determinan en una muestra de sangre, por ejemplo, una muestra de suero o plasma, obtenida de un individuo tal como se define en la presente invención. Preferentemente, dicha determinación se realiza mediante ELISA. Dicha determinación mediante ELISA puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando el HBT ELISA Test Kit para la proteína transportadora de ácidos grasos específica de miocardio (HyCult Biotechnology, Uden, Holanda) para la determinación de H-FABP y utilizando el Tina-Quant® Myoglobin Test System (Roche Diagnostics) para la determinación de mioglobina, respectivamente.

El término "cantidad", tal como se utiliza en la presente invención, incluye la cantidad absoluta (por ejemplo, de mioglobina o H-FABP), la cantidad relativa o concentración (por ejemplo, de mioglobina o H-FABP) así como cualquier valor o parámetro que se correlacione con las mismas. Dichos valores o parámetros comprenden los

valores de señal de intensidad de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas de dichos péptidos mediante mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en los espectros de masas o espectros de RMN. Además, se incluyen todos los valores o parámetros que se obtienen mediante las mediciones indirectas especificadas en cualquier parte de la presente invención, por ejemplo, niveles de expresión determinados en sistemas de lectura biológicos en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidas de ligandos unidos de forma específica. Debe entenderse que los valores que se correlacionan con las cantidades o parámetros anteriormente mencionados también pueden obtenerse mediante cualquier operación matemática estándar.

El término "comparación" tal como se utiliza en la presente invención, incluye comparar la cantidad de péptido, polipéptido, o proteína presente en la muestra a analizar con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada en otros apartados de la descripción. Debe entenderse que el término comparación, tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una comparación de los parámetros o valores correspondientes, por ejemplo la cantidad absoluta se compara con la cantidad absoluta de referencia mientras que la concentración se compara con la concentración de referencia o la señal de intensidad obtenida en la muestra a analizar se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación mencionada en la etapa (b) del método de la presente invención puede llevarse a cabo de forma manual o asistida por ordenador. Para las comparaciones asistidas por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse con los valores de referencia adecuados almacenados en una base de datos mediante un programa informático. El programa informático puede además evaluar el resultado de la comparación, es decir, proporcionar automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Sobre la base de la comparación de la cantidad o cantidades determinadas en la etapa a) con el valor o valores de referencia adecuados, es posible diagnosticar un MI en dicho individuo. Debe entenderse que una cantidad de mioglobina tal como se determina en la etapa (a) de los métodos de la presente invención se compara en la etapa (b) con una cantidad de referencia de mioglobina tal como se especifica en otros apartados de la presente solicitud y que una cantidad de H-FABP se compara con una cantidad de referencia de H-FABP.

Por consiguiente, el término "cantidad de referencia" tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una cantidad que, en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo y que presenta un nivel de Troponina cardiaca detectable pero inferior al nivel considerado como indicativo de infarto de miocardio (por lo tanto en un individuo tal como se define en la presente invención), permite confirmar que ha padecido recientemente un MI o a una cantidad que permite descartar que ha padecido recientemente un MI. Haber padecido recientemente en este contexto significa que el MI se ha producido, preferentemente, en un período de 6 horas, más preferentemente en un período de 4 horas, y de forma más preferentemente en un período de 2 horas antes de la obtención de la muestra de dicho individuo. Preferentemente, una cantidad de referencia que confirma un MI puede derivarse de un individuo, tal como se define en la presente, que se sabe que ha padecido un MI, preferentemente en un período de 6 horas, más preferentemente en un período de 4 horas, y de forma más preferentemente en un período de 2 horas antes de la obtención de la muestra. Una cantidad de referencia que descarta la producción reciente de un MI puede derivarse de un individuo, tal como se define en la presente, que se sabe que no ha padecido un MI. Además, una cantidad de referencia que descarta la producción reciente de un MI puede derivarse de un individuo con enfermedad cardíaca coronaria estable que presente un nivel de Troponina cardiaca bajo pero detectable (tal como se ha especificado anteriormente) y que no presente un MI. Una cantidad de mioglobina y, opcionalmente, H-FABP en un individuo, tal como se ha definido en la presente invención, superior a la cantidad que confirma la presencia de un MI debe ser indicativa de que se ha producido recientemente un MI en dicho individuo (y por lo tanto, que la causa del ACS es un MI). Una cantidad de mioglobina y, opcionalmente, H-FABP en un individuo tal como se ha definido en la presente invención, inferior a la cantidad de referencia que descarta la presencia de un MI debe ser indicativa de que no se ha producido recientemente un MI en dicho individuo, preferentemente sufre de UAP (y por lo tanto es un indicador de que la causa del ACS es una UAP). Debe entenderse en el contexto de la presente invención que los individuos, tal como se definen en la presente invención, cuya cantidad de mioglobina se encuentra entre las cantidades de referencia previamente mencionados (la cantidad de referencia que confirma la producción reciente de un MI y la cantidad de referencia que descarta la producción reciente de un MI) pueden requerir ser diagnosticados de nuevo. Preferentemente, ello también se llevará a cabo en el extraño caso de que se determinen la cantidad de mioglobina y H-FABP y que dichas cantidades no coincidan, por ejemplo, una cantidad es superior (o inferior) que la cantidad de referencia correspondiente, y la otra cantidad no es superior (o inferior) a la cantidad de referencia correspondiente. El nuevo diagnóstico se realiza, preferentemente, determinando la cantidad de mioglobina y, opcionalmente, H-FABP en una muestra nueva, y por lo tanto obtenida más tarde, de dicho individuo. La nueva muestra puede obtenerse del individuo, preferentemente 1 hora, 2 horas o 3 horas después de la obtención de la primera muestra. Tras obtener la muestra, puede determinarse la cantidad de mioglobina y, opcionalmente, H-FABP. A continuación, el resultado o resultados así obtenidos pueden compararse con las cantidades de referencia (tal como se han descrito en otras partes de la presente invención). Preferentemente, también se determina en la muestra utilizada para el diagnóstico, la cantidad de Troponina cardiaca. Preferentemente, una cantidad de Troponina cardiaca superior a 0,1 ng/ml seis horas después de la presentación de los síntomas de ACS es indicativa de MI.

Los expertos en la técnica conocen cómo determinar una cantidad de referencia. Se apreciará que la cantidad de referencia también puede seleccionarse según la sensibilidad o especificidad de diagnóstico deseadas. Por lo tanto,

la cantidad de referencia puede ser escogida por las personas expertas en la técnica, de acuerdo con la sensibilidad y especificidad deseadas. Los métodos para determinar cantidades de referencia adecuadas son conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo una cantidad de referencia puede determinarse a partir de curvas de característica operativa del receptor (ROC) según estudios clínicos.

- 5 La cantidad de referencia de mioglobina que confirma la producción reciente de un MI, en un individuo tal como se define en la presente invención, que define un umbral de mioglobina es de 64 ng/ml, o 69 ng/ml y, más preferentemente 77 ng/ml.

Una cantidad de mioglobina superior a la cantidad de referencia de mioglobina que confirma la producción reciente de un MI es, más preferentemente, indicativa de la producción reciente de un MI, particularmente un NSTEMI.

- 10 Además de la mioglobina, se determina en una muestra de un individuo, tal como se define en la presente invención, la cantidad de H-FABP y se compara con una cantidad de referencia, la cantidad de referencia de H-FABP que confirma la producción reciente de un MI que define un umbral de H-FABP es de 4.950 pg/ml, 5.550 pg/ml o 6.000 pg/ml o, más preferentemente, 5.700 pg/ml.

- 15 Una cantidad de H-FABP superior a la cantidad de referencia de H-FABP que confirma la producción reciente de un MI es, más preferentemente, indicativa de la producción reciente de un MI, particularmente un NSTEMI, siempre y cuando la cantidad de mioglobina en la muestra del individuo también sea superior a la cantidad de referencia de mioglobina de confirmación de la producción reciente de un MI.

- 20 Una cantidad de referencia de mioglobina que descarta la producción reciente de un MI en un individuo, según la presente invención, que define un umbral de mioglobina es preferentemente de 28 ng/ml, o 61 ng/ml o más preferentemente 55 ng/ml.

Una cantidad de mioglobina inferior a la cantidad de referencia de mioglobina que descarta la producción reciente de un MI es, más preferentemente, indicativa de que no se ha producido un infarto de miocardio en un individuo, tal como se define en la presente invención. Preferentemente, como consecuencia puede descartarse la producción de un MI y puede asumirse la presencia, por ejemplo, de una UAP.

- 25 Si además de la mioglobina se determina, en una muestra de un individuo, tal como se define en la presente invención, la cantidad de H-FABP y se compara con una cantidad de referencia, la cantidad de referencia de H-FABP que descarta la producción reciente de un MI en un individuo, según la presente invención, que define un umbral de H-FABP es de 2.100 pg/ml o de 2.300 pg/ml o, más preferentemente, de 2.500 pg/ml.

- 30 Una cantidad de H-FABP inferior a la cantidad de referencia que descarta la producción reciente de un MI es, más preferentemente, indicativa de que no se ha producido un infarto de miocardio en un individuo tal como se define en la presente invención, siempre y cuando la cantidad de mioglobina en la muestra del individuo también sea inferior a la cantidad de referencia de mioglobina que confirma la producción reciente de un MI. Preferentemente, como consecuencia puede descartarse la producción de un MI y asumirse la presencia, por ejemplo, de una UAP.

- 35 El término "al menos una cantidad de referencia" significa una o más de una cantidad de referencia, por ejemplo dos cantidades de referencia, por ejemplo la cantidad de referencia que confirma la producción reciente de un MI y la cantidad de referencia que descarta la producción reciente de un MI.

- 40 De forma ventajosa, se ha observado en los estudios en los que se basa la presente invención, que determinar la cantidad de mioglobina en un individuo, tal como se define en la presente invención (y por lo tanto, un individuo afecto de un síndrome coronario agudo que presente un nivel de Troponina cardiaca detectable pero inferior al nivel considerado indicativo de MI) y comparar la cantidad determinada con al menos una cantidad de referencia es necesario para el diagnóstico de MI en dicho individuo. El método mencionado es más fiable que los de la técnica previa y se ha observado que la mioglobina es necesaria para evaluar la presencia de un MI en casos de niveles de Troponina T cardiaca bajos pero detectables (particularmente, superiores a 0,002 ng/ml e inferiores a 0,1 ng/ml)
- 45 poco después del inicio de los síntomas de ACS o de presunto ACS. En estos estudios en los que se basa la presente invención, se determinaron los niveles de mioglobina y TnT en muestras de pacientes que mostraban síntomas de ACS (dentro de las 2 primeras horas después del inicio de los síntomas). El nivel de TnT se determinó utilizando un ensayo de Troponina T altamente sensible con un límite de detección de 0,002 ng/ml. Adicionalmente se determinó el nivel de H-FABP. Se realizaron experimentos control en los que se determinaron los niveles de TnT, mioglobina y H-FABP en pacientes con enfermedad coronaria estable (es decir, pacientes sin un evento agudo)
- 50 aparente). Estos experimentos mostraron que la TnT también puede detectarse en individuos con enfermedad coronaria estable. Un análisis de curvas de característica operativa del receptor (ROC) incluyendo los datos de los estudios previamente mencionados mostró adicionalmente que la mioglobina es un marcador bioquímico fuerte de

infarto de miocardio (figura 2). Particularmente, una cantidad de mioglobina en un individuo, tal como se define en la presente invención, superior a 77 ng/ml indica la producción reciente de un MI (confirma), mientras que una cantidad inferior a 55 ng/ml (indica que no se ha producido recientemente un MI (descarta). Además, la sensibilidad y especificidad del diagnóstico basado en la determinación de la mioglobina en una muestra de un individuo, tal como se define en la presente invención, se incrementa aún más cuando además de la cantidad de mioglobina se determina la cantidad de H-FABP en una muestra de dicho individuo y se compara con al menos una cantidad de referencia de H-FABP. Particularmente, una cantidad de H-FABP en un individuo tal como se define en la presente invención, superior a 5.700 pg/ml indica la producción reciente de un MI (confirma), mientras que una cantidad inferior a 2.500 pg/ml indica que no se ha producido recientemente un MI (descarta), ver la figura 1. Gracias a este aspecto de la presente invención, puede realizarse de forma más fiable el diagnóstico de MI en pacientes con ACS o presunto ACS con un nivel de troponina cardiaca bajo pero detectable (detectable pero inferior al nivel considerado indicativo de MI). Los descubrimientos del estudio en el que se basa la presente invención pueden ser particularmente ventajosos para el diagnóstico de a) individuos que ya presentan un nivel bajo pero detectable de Troponina cardiaca debido a la presencia previa de una enfermedad cardiaca coronaria que muestran síntomas de ACS y b) individuos con ACS con un nivel de Troponina cardiaca bajo pero detectable en el momento de la obtención de la muestra para la determinación de la Troponina cardiaca (por ejemplo porque la muestra se obtuvo demasiado temprano) pero en los que se ha producido un MI. En ambos casos a) y b), la determinación de mioglobina y, opcionalmente, de H-FABP será una herramienta valiosa para el diagnóstico, particularmente para diferenciar entre UAP y MI. Tras realizar un diagnóstico, el individuo puede ser tratado según proceda. Sin la determinación de mioglobina y, opcionalmente, de H-FABP, el diagnóstico puede ser incorrecto dando lugar a un tratamiento potencialmente erróneo, perjudicial y/o retrasado de los individuos mencionados.

En una realización preferente del método de la presente invención el método permite diferenciar entre un infarto de miocardio (MI) y una angina de pecho inestable (UAP) en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo que presente un nivel de Troponina detectable, pero inferior al nivel considerado indicativo de infarto de miocardio (MI).

Por consiguiente, el método de la presente invención es, en una realización, un método para diferenciar entre infarto de miocardio y angina de pecho inestable en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo que presente un nivel de Troponina detectable, pero inferior al nivel considerado indicativo de infarto de miocardio (MI) que comprende:

- a) determinar la cantidad de mioglobina en una muestra de dicho individuo, y
- b) comparar la cantidad de mioglobina determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
- c) diferenciar entre infarto de miocardio y angina de pecho inestable en base a la información obtenida en las etapas a) y b).

Se contempla particularmente que el individuo presente unos niveles de Troponina cardiaca bajos, pero detectables (por lo tanto, detectables pero inferiores al nivel considerado indicativo de MI) al inicio de los síntomas de ACS (y por lo tanto, deberá presentar dichos niveles citados antes del ACS). Preferentemente, dichos niveles detectables son debidos a una enfermedad cardiaca coronaria. Tal como se ha mencionado anteriormente, en el caso de un ACS es difícil decidir si los niveles detectables son debidos a la enfermedad coronaria existente o a la presencia de un ACS.

Por lo tanto, en una realización preferente del método de la presente invención, el método es para diagnosticar un infarto de miocardio en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo que presenta un nivel de Troponina cardiaca detectable, pero inferior al considerado indicativo de infarto de miocardio (MI), y que presenta unos niveles bajos, pero detectables de Troponina cardiaca al inicio de los síntomas de ACS.

Por consiguiente, el método de la presente invención es, en una realización, un método para diagnosticar un infarto de miocardio en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo que presenta un nivel de Troponina cardiaca detectable, pero inferior al considerado indicativo de infarto de miocardio (MI), y que presenta unos niveles bajos, pero detectables de Troponina cardiaca ya al inicio de los síntomas de ACS (y, por lo tanto, poco antes del inicio) que comprende las etapas de:

- a) determinar la cantidad de mioglobina en una muestra de dicho individuo, y
- b) comparar la cantidad de mioglobina determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
- c) diagnosticar el infarto de miocardio en base a la información obtenida en las etapas a) y b).

De acuerdo con lo anterior, la presente invención también puede utilizarse para confirmar/descartar un MI en un individuo afecto de un ACS.

Por lo tanto, en otra realización preferente del método de la presente invención el método es para descartar un

5 infarto de miocardio en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo que presenta un nivel de Troponina cardiaca detectable, pero inferior al considerado indicativo de infarto de miocardio (MI) y que ya posee un nivel de Troponina cardiaca detectable, pero inferior al considerado indicativo de infarto de miocardio ya al inicio de los síntomas de ACS ( y por lo tanto, también poco antes del inicio de los síntomas). Preferentemente, el MI se descarta si el nivel de mioglobina es inferior a la cantidad de referencia que descarta el MI. Si se determinan tanto la H-FABP como la mioglobina, el MI se descarta, preferentemente, si ambos marcadores son inferiores a las cantidades de referencia correspondientes que descartan un MI.

10 Por consiguiente, el método de la presente invención es, en una realización, un método para descartar un infarto de miocardio en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo que presenta un nivel de Troponina cardiaca detectable, pero inferior al considerado indicativo de infarto de miocardio (MI), y que, preferentemente, presenta unos niveles bajos, pero detectables de Troponina cardiaca ya al inicio de los síntomas de ACS que comprende:

- 15 a) determinar la cantidad de mioglobina en una muestra de dicho individuo, y  
 b) comparar la cantidad de mioglobina determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia que descarta el infarto de miocardio, y  
 c) descartar el infarto de miocardio, si la cantidad de mioglobina es inferior a la cantidad de referencia que descarta el infarto de miocardio.

20 En otra realización preferente del método de la presente invención, el método es para confirmar un infarto de miocardio en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo que presenta un nivel de Troponina cardiaca detectable, pero inferior al considerado indicativo de infarto de miocardio (MI) y que, preferentemente, presenta unos niveles bajos, pero detectables de Troponina cardiaca ya al inicio de los síntomas de ACS. Preferentemente, el MI se confirma si el nivel de mioglobina es superior a la cantidad de referencia que confirma el MI. Si se determinan tanto la H-FABP como la mioglobina, el MI se confirma, preferentemente, si ambos marcadores son superiores a las cantidades de referencia correspondientes que confirman un MI.

25 Pueden hallarse las explicaciones sobre los términos utilizados en los métodos mencionados anteriormente en otros apartados de la presente invención. Preferentemente, también comprenden la determinación de H-FABP y su comparación con una cantidad de referencia.

30 Debe entenderse que, según el método de la presente invención descrito anteriormente y a continuación, pueden utilizarse la cantidad de mioglobina y, preferentemente de forma adicional, la cantidad de H-FABP o los medios para su determinación, para la fabricación de una composición diagnóstica para el diagnóstico de MI en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo que presenta un nivel de Troponina cardiaca detectable, pero inferior al considerado indicativo de infarto de miocardio.

35 La presente invención se refiere además a un método para identificar un individuo susceptible de ser sometido a una intervención cardiaca, en el que dicho individuo está afecto de un síndrome coronario agudo y presenta un nivel de Troponina cardiaca detectable, pero inferior al considerado indicativo de infarto de miocardio, que comprende llevar a cabo las etapas a) y b), y, opcionalmente, las etapas aa) y bb) tal como se expone en cualquiera de los métodos previamente mencionados, y c) identificar un individuo susceptible de ser sometido a una intervención cardiaca.

40 Gracias al método previamente mencionado, puede realizarse fácilmente una estratificación del riesgo/éxito antes de someter al paciente a una intervención cardiaca. En caso de que resulte de que el paciente no es susceptible de intervención cardiaca, puede evitarse dicho tratamiento peligroso e intensivo desde un punto de vista de tiempo y costes. Por lo tanto, además de evitar al individuo efectos secundarios adversos y graves, el método de la presente invención será beneficioso para el sistema sanitario al ahorrar recursos.

45 Debe entenderse en el contexto del método de la presente invención anteriormente mencionado que un individuo diagnosticado de padecer un MI, y por lo tanto un individuo en el que se ha producido recientemente un MI, es susceptible de ser sometido a una intervención cardiaca.

50 El término "identificar", tal como se utiliza en la presente invención, significa evaluar si un individuo será susceptible o no de ser sometido a una intervención cardiaca. Como entenderán los expertos en la técnica, no se pretende que dicha evaluación sea correcta en todos los individuos a identificar (es decir, en el 100%). El término requiere, sin embargo, que pueda identificarse una proporción estadísticamente significativa de los individuos a identificar (es decir, una cohorte en un estudio de cohortes). Si una proporción es estadísticamente significativa puede determinarse sin más por los expertos en la técnica utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, la prueba de la T de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles pueden encontrarse en Dowdy y Wearden, Statistics for Research ("Estadística para investigación"), John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son de al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. Los valores p son, preferentemente 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más preferentemente, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de los individuos de la población pueden ser identificados adecuadamente

mediante el método de la presente invención.

El término "intervención cardiaca" incluye aquellos regímenes terapéuticos considerados adecuados para el MI por los expertos en la técnica. El término incluye intervenciones de cirugía, microcirugía u otras terapias invasivas que afectan al sistema cardiovascular y, preferentemente, el corazón, así como métodos de tratamiento conservadores (no quirúrgicos). Los métodos conservadores son conocidos en la técnica e incluyen métodos no farmacológicos y farmacológicos. Los métodos farmacológicos se refieren a la administración de fármacos (tales como la heparina, el ácido acetilsalicílico, el clopidogrel) en cantidades terapéuticamente efectivas. Preferentemente, intervenciones cardiacas, tales como las que se utilizan en la presente invención, son regímenes terapéuticos que pretenden restaurar un suministro de oxígeno adecuado al corazón. Ello se consigue, preferentemente, restaurando el flujo sanguíneo a través de los vasos sanguíneos que van al corazón, es decir los vasos sanguíneos coronarios. Estos vasos pueden estar dañados debido, por ejemplo, a placas tromboticas o ateroscleróticas. Por consiguiente, la intervenciones cardiacas deberán, preferentemente, comprender la destrucción y/o la eliminación de dichas placas y la restauración del vaso, si es necesario. Las intervenciones cardiacas preferentemente, según la presente invención, se seleccionan del grupo formado por la angioplastia coronaria percutánea, la angioplastia transluminal coronaria percutánea con balón, la angioplastia con láser, la implantación de implantes intraluminales (stents) coronarios, la realización de bypass o técnicas intraluminales que tienen como objetivo restaurar el flujo sanguíneo, la permeabilidad del vaso, la estabilización de la placa y/o la reducción de la carga de trombos coronarios.

Además, la presente invención se refiere a un método para decidir sobre el posible tratamiento de un individuo afecto de un síndrome coronario agudo que presenta un nivel de Troponina cardiaca detectable, pero inferior al considerado indicativo de infarto de miocardio, que comprende

- a) determinar la cantidad de mioglobina en una muestra de dicho individuo, y
- b) comparar la cantidad de mioglobina determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
- c) recomendar el inicio de una intervención cardiaca o abstenerse de dicha intervención, en base a la información obtenida en las etapas a) y b).

En una realización del método previamente mencionado de la presente invención, se determina adicionalmente en una muestra de un individuo, en la etapa a), la cantidad de proteína transportadora de ácidos grasos miocárdica (H-FABP, también denominada frecuentemente proteína transportadora de ácidos grasos específica de miocardio) y se compara con al menos una cantidad de referencia de H-FABP en la etapa b). Por consiguiente, en la etapa c) la recomendación del inicio o abstención de una intervención cardiaca se realiza sobre la base de las cantidades determinadas de mioglobina y H-FABP y la comparación de la cantidad de mioglobina con al menos una cantidad de referencia de mioglobina y la comparación de la H-FABP con al menos una cantidad de referencia de H-FABP.

Además, se incluye en la presente invención un kit o dispositivo para llevar a cabo los métodos de la presente invención que comprende medios para determinar la cantidad de mioglobina y, opcionalmente, de H-FABP en una muestra de un individuo y medios para comparar dicha cantidad con al menos una cantidad de referencia.

El término "kit" tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un conjunto de los medios previamente mencionados, proporcionados por separado o en un solo contenedor. El kit puede comprender además medios para determinar la cantidad de una Troponina cardiaca. Opcionalmente, el kit puede comprender además un manual de usuario para interpretar los resultado de cualquiera de las mediciones en cuanto al diagnóstico de MI en un individuo, tal como se define en la presente invención. En particular, dicho manual puede incluir información sobre qué cantidades determinadas corresponden a qué tipo de diagnóstico. Ello se ha definido en detalle en otros apartados de la presente invención. Además, dicho manual de usuario puede proporcionar instrucciones sobre la correcta utilización de los componentes del kit para determinar la cantidad de los marcadores biológicos correspondientes.

El término "dispositivo" tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un sistema de medios que comprende al menos los medios previamente mencionados unidos operativamente entre sí de manera que permiten el diagnóstico de un MI o la identificación de un individuo susceptible de ser sometido a una intervención cardiaca. El dispositivo de la invención puede además comprender medios para determinar la cantidad de una Troponina cardiaca. Los medios preferentes para la determinación de mioglobina y H-FABP y los medios para llevar a cabo la comparación se han dado a conocer anteriormente en relación con el método de la invención. Cómo unir los medios de manera operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplican medios para la determinación automática de los péptidos, los datos obtenidos por dichos medios que funcionan automáticamente pueden ser procesados, por ejemplo, por un programa informático para obtener los resultados deseados. Preferentemente, en tal caso los medios están formados por un solo dispositivo. Dicho dispositivo puede por consiguiente incluir una unidad de análisis para la medición de la cantidad de los péptidos o polipéptidos en una muestra aplicada y una unidad informática para procesar los datos resultantes para la evaluación. Alternativamente, cuando se utilizan medios tales como tiras reactivas para determinar la cantidad de los péptidos o polipéptidos, los medios para la comparación pueden comprender tiras control o tablas para situar la cantidad determinada respecto a

una cantidad de referencia. Las tiras reactivas se acoplan, preferentemente, a un ligando que se une específicamente a los péptidos o polipéptidos mencionados a los que se refiere la presente invención. La tira o dispositivo, comprende medios para la detección de la unión de dichos péptidos o polipéptidos a dicho ligando. Los medios preferentes para la detección se han dado a conocer anteriormente en relación con las realizaciones referentes al método de la presente invención. En dicho caso, los medios se unen operativamente de manera que el usuario del sistema reúne el resultado de la determinación de la cantidad y el valor diagnóstico o pronóstico del mismo, según las instrucciones e interpretaciones ofrecidas por un manual. En una realización de este tipo, los medios pueden presentarse como dispositivos separados y, preferentemente, empaquetados conjuntamente en un kit. Los expertos en la técnica se darán cuenta de cómo unir los medios sin mayores explicaciones. Son dispositivos preferentes aquellos que pueden aplicarse sin el conocimiento particular de un facultativo especializado, por ejemplo, tiras reactivas o dispositivos electrónicos que requieren meramente de la aplicación de una muestra. Los resultados pueden darse como una salida de datos no procesados que necesitan la interpretación del facultativo. Preferentemente, sin embargo, la salida del dispositivo procesa, es decir evalúa, los datos no procesados de manera que su interpretación no requiere de un facultativo. Además, los dispositivos preferentes comprenden unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo biosensores, matrices, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen específicamente la mioglobina o la H-FABP, dispositivos de resonancia de plasmones superficiales, espectrómetros de RNM, espectrómetros de masa, etc.) o unidades/dispositivos de evaluación mencionados anteriormente, según el método de la presente invención.

La presente invención también se refiere a la utilización de la mioglobina y, opcionalmente, la H-FABP y/o medios para determinar la cantidad de mioglobina y, opcionalmente, de H-FABP y/o medios para comparar la cantidad de mioglobina y, opcionalmente, de H-FABP con al menos una cantidad de referencia para producir una composición diagnóstica para el diagnóstico del infarto de miocardio en un individuo.

Las figuras muestran:

Figura 1: Curva de característica operativa del receptor (ROC) de H-FABP.

Se realizó el análisis de la curva ROC para determinar la precisión diagnóstica mediante el cálculo de la sensibilidad diagnóstica vs. (1 – especificidad) para un parámetro diagnóstico determinado (H-FABP) según el resultado clínico (no conversor a infarto de miocardio (MI) vs. conversor a infarto de miocardio (MI)). En esta curva ROC se incluyen los datos obtenidos en pacientes con enfermedad cardiaca coronaria estable y ACS (ver ejemplos). El valor de punto de corte para el resultado clínico de MI es de 4.950 pg/ml de H-FABP. (ROC-AUC: área bajo la curva de característica operativa del receptor; C. O punto de corte).

Figura 2: Curva de característica operativa del receptor (ROC) de mioglobina.

Se realizó el análisis de la curva ROC para determinar la precisión diagnóstica mediante el cálculo de la sensibilidad diagnóstica vs. (1 – especificidad) para un parámetro diagnóstico determinado (mioglobina) según el resultado clínico (no conversor a infarto de miocardio (MI) vs. conversor a infarto de miocardio (MI)). En esta curva ROC se incluyen los datos obtenidos en pacientes con enfermedad cardiaca coronaria estable y ACS (ver ejemplos). El valor de punto de corte para el resultado clínico de MI es de 61 ng/ml de mioglobina. (ROC-AUC: área bajo la curva de característica operativa del receptor; C. O punto de corte).

Los ejemplos siguientes deben simplemente ilustrar la presente invención. No se interpretarán en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

**Ejemplo 1:** Mioglobina, H-FABP y Troponina T en pacientes con síndrome coronario agudo.

Se examinaron 69 pacientes que mostraban síntomas característicos de ACS (por ejemplo, dolor torácico). Se obtuvieron muestras sanguíneas dentro de las primeras dos horas tras el inicio de los síntomas. Para el diagnóstico de los pacientes con un MI con elevación del ST, los pacientes se examinaron mediante electrocardiografía. Además, se determinó la concentración de Troponina T con un ensayo de Troponina T con un límite de detección de 0,01 ng/ml. Se obtuvieron muestras adicionales de sangre de pacientes en los que no pudo establecerse un diagnóstico de STEMI o NSTEMI (concentración de TnT superior a 0,01 ng/ml pero inferior a 0,1 ng/ml, por lo tanto niveles que indican necrosis). Un nivel de Troponina T superior a 0,1 ng/ml en una muestra obtenida al menos 6 horas después del inicio de los síntomas se consideró indicativa de la producción reciente de un MI (conversor a MI), en el caso contrario se diagnosticó una UAP (no conversor a MI).

En un análisis posterior, se determinaron las concentraciones de TnT, mioglobina y H-FABP en muestras de pacientes en los que no pudo establecerse un diagnóstico de STEMI o NSTEMI (concentración de TnT en una primera muestra detectable, superior a 0,01 ng/ml pero inferior a 0,1 ng/ml) utilizando, respectivamente, un ensayo de alta sensibilidad de TnT con un límite de detección de 0,002 ng/ml, el Tina-Quant® Myoglobin Test System (Roche Diagnostics) y el H-FABP ELISA Test Kit (Kit de análisis ELISA HBT para la proteína transportadora de ácidos grasos específica de miocardio, HyCult Biotechnology, Uden, Holanda). Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla:** Concentraciones de Troponina T, H-FABP y mioglobina (medianas) en pacientes con síndrome coronario agudo conversores a MI y no conversores a MI

	Troponina T altamente sensible [pg/ml]		Proteína que se une a ácidos grasos H [pg/ml]		Mioglobina [ng/ml]	
	No-MI	MI	No-MI	MI	No-MI	MI
N	42	27	42	27	42	27
Mediana	4,35	22,75	2.896,39	8.114,01	36,89	76,76

**Ejemplo 2:** Mioglobina, H-FABP y Troponina T en pacientes con enfermedad cardiaca coronaria estable.

5 Se determinó la mioglobina, la H-FABP y la Troponina T sensible en muestras sanguíneas de un total de 234 pacientes con enfermedad cardiaca coronaria estable. Los pacientes no padecían aparentemente de un evento coronario agudo. La H-FABP se determinó tal como se ha especificado anteriormente. La Troponina T se determinó con un ensayo de Troponina altamente sensible con un límite de detección de 0,002 ng/ml. Se sometieron los 10 pacientes a una investigación cardiológica pormenorizada incluyendo ecocardiografía y angioplastia coronaria. La enfermedad cardiaca coronaria se subclasificó en enfermedad de 1, 2 o 3 vasos, debiendo existir una estenosis superior al 50% por vaso. Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Tabla: Cuartiles de H-FABP en pacientes con enfermedad cardiaca coronaria documentada

	<b>H-FABP [pg/ml] N = 234</b>			
	Cuartil 1	Cuartil 2	Cuartil 3	Cuartil 4
N	60	55	59	60
Mediana de H-FABP pg/ml	1132,1	1870,0	2636,5	4086,8
Intervalo	0-1550	1565-2208	2223-3337	3357-46370
Edad, mediana	61	64	66	71
Enfermedad arterial coronaria				
enfermedad de 1 vaso	22	9	10	10
enfermedad de 2 vasos	15	10	19	16
enfermedad de 3 vasos	15	25	23	29
Mediana de NT-proBNP pg/ml	123,0	163,6	354,8	835,3
Intervalo	11,2-35802	5,0-5514	6,9-13583	29,6-14953
Mediana de Hs-TnT ng/ml	0,003	0,005	0,007	0,014
Intervalo	0,0-0,113	0,0-0,553	0,0-0,600	0,0-0,708

Tabla: Cuartiles de mioglobina en pacientes con enfermedad cardiaca coronaria documentada

	<b>mioglobina [ng/ml] N = 264</b>			
	Grupo diagnóstico I: Enfermedad arterial coronaria estable			
	Cuartil 1	Cuartil 2	Cuartil 3	Cuartil 4
Mediana de mioglobina ng/ml	22,87	29,22	37,74	48,84
Intervalo	20,00-25,91	25,98-32,73	32,79-42,29	42,50-538,24
Edad, mediana	67	65	67	65
Enfermedad arterial coronaria				
enfermedad de 1 vaso	22	20	28	28
enfermedad de 2 vasos	2	1	4	4
enfermedad de 3 vasos	0	0	0	0
Mediana de NT-proBNP pg/ml	154,0	241,8	330,6	606,5
Intervalo	17,7-35802	5,0-6431	6,9-14953	27,1-9582
Mediana de Hs-TnT ng/ml	0,005	0,005	0,007	0,013
Intervalo	0,0-0,600	0,0-0,553	0,0-0,500	0,0-0,708
Mediana de H-FABP pg/ml	1518	1861	2498	3585
Intervalo	3,5-7524	0,0-4463	742-6778	1933-46370



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para el diagnóstico del infarto de miocardio en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo (ACS) y que presenta una Troponina cardiaca superior a 0,005 ng/ml pero inferior a 0,1 ng/ml, que comprende
  - a. determinar la cantidad de mioglobina en una muestra de dicho individuo,
  - b. comparar la cantidad de mioglobina determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia que confirma y con una cantidad de referencia que descarta el infarto de miocardio (MI), y
  - c. diagnosticar el infarto de miocardio en base a la información obtenida en las etapas a) y b).
- 10 2. Método, según la reivindicación 1, en el que la muestra se obtuvo dentro de las 4 horas después del inicio de los síntomas de ACS.
- 15 3. Método, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la muestra se obtuvo dentro de las 2 horas después del inicio de los síntomas de ACS.
- 20 4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho individuo ya posee un nivel de Troponina cardiaca superior a 0,005 ng/ml pero inferior a 0,1 ng/ml al inicio de los síntomas de ACS.
- 25 5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cantidad de referencia que confirma la producción reciente de un MI es de 77 ng/ml, y en el que una cantidad de mioglobina superior al límite de referencia que confirma la producción reciente de un MI es indicativa de que se ha producido recientemente un MI.
- 30 6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cantidad de referencia que descarta la producción reciente de un MI es de 55 ng/ml, y en el que una cantidad de mioglobina inferior al límite de referencia que descarta la producción reciente de un MI es indicativa de que no se ha producido un MI.
- 35 7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se lleva a cabo adicionalmente una etapa aa), en la que se determina la cantidad de proteína transportadora de ácido grasos específica de miocardio (H-FABP) y en el que en una etapa adicional bb) la cantidad determinada de H-FABP se compara con al menos una cantidad de referencia de H-FABP.
- 40 8. Método, según la reivindicación 7, en el que la cantidad de mioglobina y la cantidad de H-FABP se comparan con una cantidad de referencia de mioglobina y una cantidad de referencia de H-FABP que descarta la producción reciente de un MI y/o con una cantidad de referencia de mioglobina y una cantidad de referencia de H-FABP que confirma la producción reciente de un MI.
- 45 9. Método, según la reivindicación 8, en el que la cantidad de referencia que confirma la producción reciente de un MI es de 77 ng/ml de mioglobina y 5.700 pg/ml de H-FABP y en el que una cantidad de mioglobina y H-FABP superior a las cantidades de referencia que confirman la producción reciente de un MI es indicativa de que se ha producido recientemente un MI.
- 50 10. Método, según la reivindicación 9, en el que la cantidad de referencia que descarta la producción reciente de un MI es de 55 ng/ml de mioglobina y 2.500 pg/ml de H-FABP y en el que una cantidad de mioglobina inferior a la cantidad de referencia que descartan la producción reciente de un MI es indicativa de que no se ha producido un MI.
- 55 11. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la Troponina cardiaca es la Troponina T.
- 60 12. Método para identificar un individuo susceptible de ser sometido a una intervención cardiaca, en el que el individuo está afecto de un síndrome coronario agudo y presenta un nivel de Troponina cardiaca superior a 0,005 ng/ml pero inferior a 0,1 ng/ml, que comprende llevar a cabo las etapas a) y b), y, opcionalmente, las etapas aa) y bb), tal como se han descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y c) identificar un individuo susceptible de ser sometido a una intervención cardiaca en base a la información así obtenida.
- 65 13. Método de decisión sobre el tratamiento posible de un individuo afecto de un síndrome coronario agudo y presenta un nivel de Troponina cardiaca superior a 0,005 ng/ml pero inferior a 0,1 ng/ml, que comprende llevar a cabo las etapas a) y b), y, opcionalmente, las etapas aa) y bb) tal como se han descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y c) recomendar el inicio o la abstención de una intervención cardiaca en base a la información así obtenida.
- 70 14. Utilización de un kit o dispositivo en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, comprendiendo el kit o dispositivo medios para determinar la cantidad de mioglobina en la muestra de un individuo y, opcionalmente, medios para determinar la cantidad de H-FABP en la muestra de un individuo y medios para comparar la cantidad de mioglobina y, opcionalmente, la cantidad de H-FABP con al menos una cantidad de referencia.
- 75 15. Utilización, según la reivindicación 14, en la que el kit o dispositivo comprende medios para determinar la

cantidad de una Troponina cardiaca.

- 5 16. Método para descartar un infarto de miocardio en un individuo afecto de un síndrome coronario agudo y que presenta un nivel de Troponina cardiaca superior a 0,005 ng/ml pero inferior a 0,1 ng/ml, que comprende
- a. determinar la cantidad de mioglobina en una muestra de dicho individuo, y
  - b. comparar la cantidad de mioglobina determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia que descarta el infarto de miocardio, y
  - c. descartar el infarto de miocardio si la cantidad de mioglobina es inferior a la cantidad de referencia que descarta el infarto de miocardio, en el que dicha muestra se obtiene dentro de las cuatro horas
- 10 posteriores al inicio de los síntomas de ACS.
17. Método, según la reivindicación 16, en el que dicho individuo ya posee un nivel de Troponina cardiaca superior a 0,005 ng/ml pero inferior a 0,1 ng/ml al inicio de los síntomas de ACS.

Figura 1

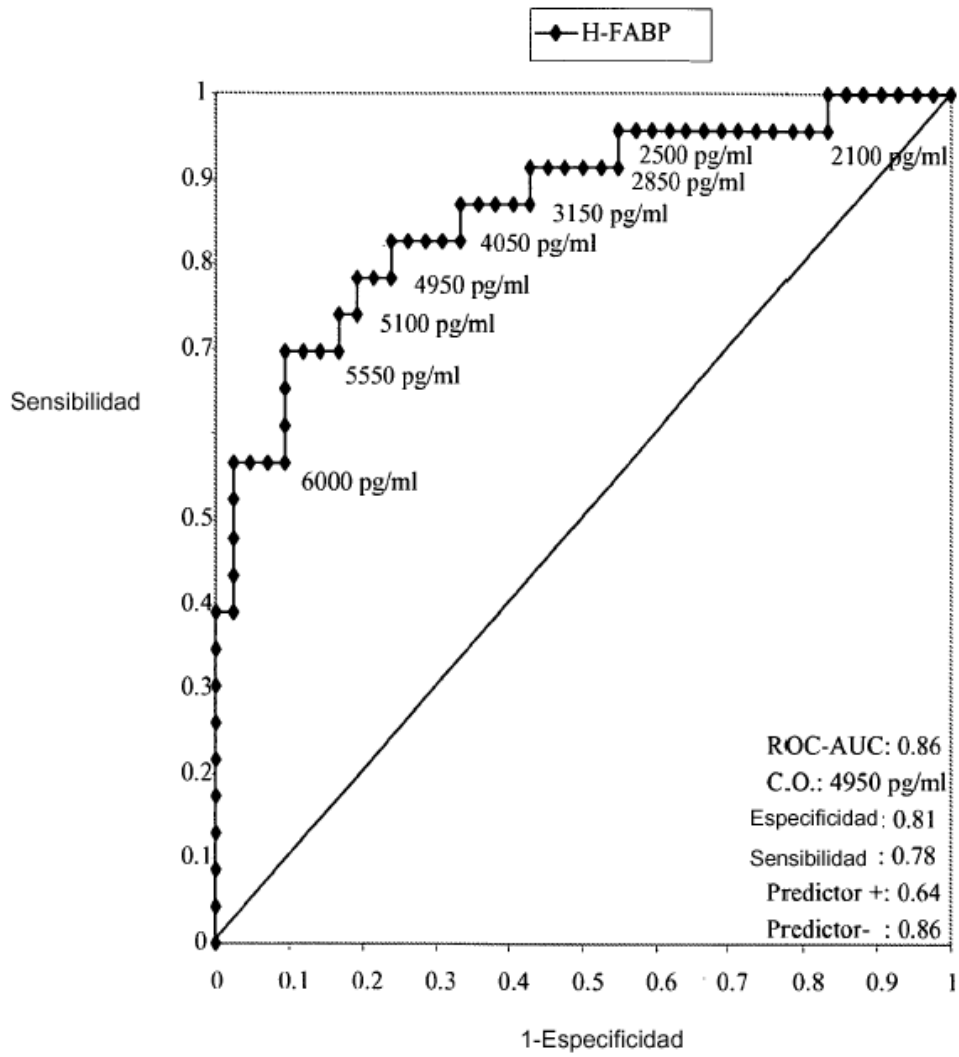


Figura 2

