

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 359**

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

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07114174 .1**
- 96 Fecha de presentación: **10.08.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1890154**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **Troponina cardiaca como marcador de enfermedad arterial coronaria avanzada**

30 Prioridad:  
**16.08.2006 EP 06119017**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.11.2012**

73 Titular/es:  
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
GRENZACHERSTRASSE, 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:  
**HESS, GEORG;  
HORSCH, ANDREA y  
ZDUNEK, DIETMAR**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 390 359 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**

Troponina cardiaca como marcador de enfermedad arterial coronaria avanzada.

5 La presente descripción se refiere a un método para el diagnóstico en un individuo de la situación patológica de enfermedad cardiaca coronaria isquémica avanzada relacionada con una enfermedad arterial coronaria, en particular con una enfermedad coronaria de múltiples vasos. El método comprende las etapas de determinar la cantidad de Troponina cardiaca en una muestra de un individuo y diagnosticar dicha enfermedad cardiaca coronaria, preferentemente la enfermedad arterial coronaria, en particular la enfermedad coronaria de múltiples vasos, comparando la cantidad determinada con cantidades de referencia.

10 Uno de los objetivos de la medicina moderna es proporcionar regímenes terapéuticos personalizados o individualizados. Estos regímenes terapéuticos tienen en cuenta las necesidades o riesgos individuales del paciente. Un riesgo particularmente importante es que se presente una complicación cardiovascular, especialmente una complicación cardiovascular inadvertida o que existan previamente dichas complicaciones cardiovasculares. Las complicaciones cardiovasculares, particularmente las enfermedades cardiacas, son la causa principal de morbilidad y mortalidad en el hemisferio occidental. Las complicaciones cardiovasculares pueden permanecer asintomáticas durante periodos prolongados de tiempo. Por lo tanto, el diagnóstico diferencial de la presencia de complicaciones cardiovasculares es más difícil y sujeto a errores de lo que se cree en general.

15 Específicamente, los pacientes que padecen síntomas de un evento cardiovascular agudo (por ejemplo un infarto de miocardio, MI) tales como dolor torácico se someten en la actualidad a un diagnóstico basado en la Troponina T. Con este fin, se determinan los niveles de Troponina T de los pacientes. Si la cantidad de Troponina T en sangre es elevada, es decir superior a 0,1 ng/ml, se asume la existencia de un evento cardiovascular agudo y se trata el paciente de acuerdo con este diagnóstico.

20 El MI se clasifica dentro de las enfermedades cardiacas coronarias (CHD) y está precedido de otros eventos también clasificados dentro de las CHD, tales como la angina de pecho inestable UAP.

25 Es un síntoma de UAP el dolor torácico que se alivia con la administración de nitroglicerina sublingual. La UAP se produce por una 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 (que es el estado patológico subyacente tras el infarto de miocardio). El MI puede producirse sin síntomas obvios, es decir el individuo no presenta ninguna molestia, ni está precedido de angina de pecho estable o inestable.

30 Sin embargo, la UAP es un evento sintomático que precede al MI. La CHD también puede producirse sin síntomas, es decir el individuo puede no sentir molestias ni mostrar síntomas de CHD tales como dificultad respiratoria, dolor torácico u otros conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, el individuo puede estar enfermo y padecer un mal funcionamiento de sus arterias coronarias que puede dar lugar a un MI y/o a una insuficiencia cardiaca congestiva (CHF), lo que supone que el corazón carece de la capacidad de realizar su función de manera adecuada para garantizar el aporte necesario de sangre al organismo del individuo. Ello puede provocar complicaciones graves, siendo un ejemplo de las mismas la muerte por causas cardiacas.

35 Es conocido que los individuos pertenecientes a grupos de riesgo (por ejemplo, fumadores y/o pacientes con diabetes) tienen mayor tendencia a padecer CHD y CHF que los individuos no expuestos a estos factores de riesgo (individuos sanos). Con frecuencia, se producen formas asintomáticas de CHD/CHF, dando lugar a un estado patológico inadvertido. Se pueden tener indicios de la presencia de CHD a partir de las puntuaciones de Framingham o PROCAM. Hasta la actualidad, las condiciones fisiológicas de las arterias coronarias se evalúan por lo general mediante angiografía coronaria (invasiva o virtual) técnica cara que requiere de procedimientos elaborados y que llevan mucho tiempo. Los individuos sin un alto nivel de sospecha de padecer una complicación arterial coronaria en general no se someterán a angiografía coronaria.

40 El objetivo de la presente descripción es dar a conocer una nueva prueba para determinar la presencia de enfermedad cardiaca coronaria isquémica relacionada con la enfermedad coronaria, en particular con la enfermedad coronaria de múltiples vasos. La prueba debe ser fácil de realizar, no requerir equipamiento o aparatos costosos y, preferentemente no necesitar del conocimiento de un especialista en el campo de las enfermedades cardiovasculares.

45 La presente descripción soluciona este problema mediante un método de diagnóstico de la enfermedad cardiaca coronaria isquémica avanzada que comprende las etapas de:

- 50 a) determinar la cantidad de Troponina cardiaca en una muestra de un individuo;
- b) diagnosticar la enfermedad mediante la comparación de la cantidad determinada en la etapa a) con cantidades de referencia.

La enfermedad cardiaca coronaria isquémica avanzada está en relación a la enfermedad arterial coronaria, particularmente a la enfermedad coronaria de múltiples vasos.

En particular, la enfermedad cardiaca coronaria isquémica avanzada es asintomática.

El método de la presente descripción es un método in vitro. Además, puede comprender etapas adicionales a las explícitamente mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las etapas adicionales pueden referirse a pre-tratamientos de la muestra o a la evaluación de los datos diagnósticos.

5 El término “diagnosticar” tal como se utiliza en la presente descripción se refiere a evaluar la probabilidad de que un individuo padezca una enfermedad cardiaca coronaria isquémica avanzada o cualquier otra enfermedad a la que se hace referencia en la presente invención. Como entenderán los expertos en la técnica, dicha evaluación no se pretende que sea correcta en un 100% de los individuos a diagnosticar. El término requiere, sin embargo, que pueda diagnosticarse en una parte estadísticamente significativa de individuos (por ejemplo una cohorte en un estudio de cohortes) que padecen insuficiencia cardiaca o presentan riesgo de padecer la enfermedad en el futuro. 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.

20 Diagnosticar según la presente descripción incluye monitorizar, confirmar, sub-clasificar y predecir la enfermedad de interés o síntomas o riesgos de la misma. Monitorizar se refiere a realizar un seguimiento de una enfermedad o complicación ya diagnosticada, por ejemplo analizar la progresión de la enfermedad o la influencia de un tratamiento concreto sobre la progresión de la enfermedad o complicación. Confirmar se refiere a reforzar o sustentar un diagnóstico ya realizado utilizando otros indicadores o marcadores. Sub-clasificar se refiere a definir adicionalmente un diagnóstico según diferentes sub-clases de la enfermedad diagnosticada, por ejemplo definir según formas leves o graves de la enfermedad. En el presente caso, ello se refiere a distinguir la enfermedad coronaria de un solo vaso de la enfermedad coronaria de múltiples vasos.

25 Predecir se refiere a pronosticar una enfermedad o complicación antes de que otros síntomas o marcadores sean evidentes o se alteren de forma significativa.

En concreto, la presente descripción se refiere a monitorizar, confirmar y sub-clasificar.

30 Tal como se ha mencionado anteriormente, la CHD puede producirse de forma asintomática, o el individuo en cuestión puede mostrar síntomas. La presente descripción es apropiada para la identificación de individuos asintomáticos que presentan una CHD. El individuo en general pertenece a grupos de riesgo tales como fumadores, pacientes diabéticos, pacientes obesos, individuos afectados de hiperlipemia, individuos afectados de hipertensión arterial, individuos con historia familiar de enfermedad cardiaca coronaria como, infarto de miocardio, o accidente vascular cerebral, personas con una enfermedad de base asociada con una frecuencia elevada de enfermedad cardiaca coronaria como, por ejemplo, la artritis reumatoide.

35 Preferentemente, el individuo padece una CHD provocada por una enfermedad arterial coronaria. En concreto, la enfermedad arterial coronaria es una enfermedad de múltiples vasos, es decir, provocada por la oclusión parcial de una arteria cardiaca, por, por ejemplo, una placa, trombos y/o espasmos. La oclusión parcial de la arteria da lugar a una isquemia miocárdica que puede generar otras complicaciones que pueden producirse con o sin síntomas. Las arterias coronarias son conocidas por los expertos en la técnica. En el contexto de la presente invención, el término “arterias coronarias” comprende las (tres) arterias coronarias mayores así como las arterias de tamaño medio, y las arterias de tamaño pequeño conectados a los mismos. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, la enfermedad arterial coronaria puede ser debida, por ejemplo, a una macroangiopatía que afecta las arterias coronarias mayores, pero también a una combinación de macro y microangiopatía.

45 En caso de que se produzca una oclusión total de una arteria coronaria, el estado patológico resultante es una necrosis miocárdica que se define como el estado que subyace tras un infarto de miocardio (MI). El estado de la técnica es diagnosticar el MI midiendo la cantidad de Troponina T (referida en los siguiente como TnT) o Troponina I (TnI) cardiaca en un fluido corporal de un individuo. Si el valor está elevado, se sospecha que se ha producido un MI. El método de diagnóstico del MI (que es en sí misma un enfermedad arterial coronaria) no es parte de la presente invención.

50 En el contexto de la presente invención, el término “enfermedad cardiaca coronaria” (CHD) significa cualquier alteración coronaria (estado patológico) debida a la arteriosclerosis coronaria, es decir la oclusión parcial o total de las arterias coronarias. El término CHD incluye una amplia gama de estados patológicos agudos y crónicos que incluyen la angina de pecho estable e inestable (SAP y UAP, respectivamente), disfunción ventricular izquierda (LVD), insuficiencia cardiaca (congestiva) (CHF) y la muerte miocárdica. De forma más general, en el contexto de la presente invención, el término se refiere a la carencia de aporte sanguíneo al miocardio y todos los estados patológicos derivados de la misma.

55 En general, la SAP, la UAP y el MI se consideran estados patológicos o enfermedades agudas mientras que la LVD y la CHF se consideran enfermedades o estados crónicos. La presente descripción es en particular adecuada para

determinar una CHD asintomática. Por lo tanto, la SAP y la UAP, que no son asintomáticas, no se diagnosticarán en general utilizando las enseñanzas de la presente descripción dado que presentan síntomas característicos como el dolor torácico. El diagnóstico de MI no es así mismo un objetivo de la presente invención. La presente descripción se refiere a enfermedades de las arterias cardiacas crónicas que conducen a estados patológicos como, por ejemplo, la LVD y/o la CHF.

En el contexto de la presente descripción “asintomático” significa que el individuo no muestra ningún síntoma obvio de CHD. Son “síntomas obvios” aquellos síntomas que los expertos en la técnica (médicos) reconocen como característicos del estado patológico correspondiente, que en la presente descripción es la CHD o un subgrupo dentro de la CHD. Un paciente asintomático, en el contexto de la presente invención, no muestra limitación de su actividad física, la actividad física habitual no provoca fatiga excesiva, palpitaciones, disnea (dificultad respiratoria), náuseas, vómitos o ansiedad. Obviamente, el individuo no muestra síntomas graves como dolor torácico.

Es evidente a los expertos en la técnica que el término “síntomas obvios” no incluye síntomas que se objetivan tras un examen médico intensivo y/o dirigido como, por ejemplo, la angiografía o el ECG. Debe tenerse en cuenta, que cada estado patológico conlleva síntomas que en general pueden evidenciarse si el examen médico se realiza con el cuidado suficiente (de forma intensiva).

Una enfermedad cardíaca coronaria (CHD) puede dar lugar a un evento cardiovascular agudo, es decir un evento que aparece de forma súbita, es decir sin síntomas o signos clínicos previos, y que afecta gravemente la velocidad de flujo sanguíneo diastólico o sistólico. Histopatológicamente, el evento cardiovascular agudo aquí referido será debido a una isquemia súbita de las células musculares cardiacas acompañado de una necrosis importante de dichas células. Generalmente, el individuo que padece un evento cardiovascular agudo también padecerá los síntomas típicos tales como molestia o dolor torácico, epigástrico, en el brazo, la muñeca o la mandíbula, pudiendo el dolor torácico irradiar al brazo, espalda u hombro. Pueden ser síntomas adicionales de un evento cardiovascular agudo náuseas o vómitos sin causa aparente, dificultad respiratoria persistente, debilidad, vértigo, mareo o síncope así como combinaciones de los mismos. Generalmente, un evento cardiovascular agudo se denomina síndrome coronario agudo (ACS), es decir una angina de pecho inestable (UAP) o un infarto de miocardio (MI). En muchos casos, el evento cardiovascular agudo es un MI incluyendo el MI con elevación del ST y el MI sin elevación del ST. Además, el evento cardiovascular también incluye el accidente vascular cerebral. En Joint European Society of Cardiology / American Society of Cardiology, 2000, J American College of Cardiology, Vol.36, No.3: 959-969.

En el contexto de la presente invención, una enfermedad cardíaca coronaria en general dará lugar, con o sin pasar previamente por un evento cardiovascular agudo o el estado de LVD, a una insuficiencia cardíaca que se clasifica en varias clases. Los síntomas pueden clasificarse según el sistema de clasificación de la Asociación del Corazón de Nueva York. Los pacientes de la Clase I no presentan síntomas obvios de enfermedad cardiovascular. La actividad física no está limitada y la actividad física habitual no provoca fatiga excesiva, palpitaciones, o disnea (dificultad respiratoria). Los pacientes de clase II presentan una limitación leve de la actividad física. Se encuentran bien en reposo, pero la actividad física provoca fatiga, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase III presentan una limitación marcada de la actividad física. Se encuentran bien en reposo, pero una actividad inferior a la habitual provoca fatiga, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase IV son incapaces de realizar cualquier actividad física sin molestias. Muestran síntomas de insuficiencia cardíaca en reposo. Si llevan a cabo cualquier actividad física, las molestias aumentan. Por consiguiente, los pacientes pueden dividirse en individuos que no muestran síntomas clínicos y aquellos con síntomas (por ejemplo disnea).

En una realización preferente de la presente invención, se mide, además de la Troponina cardíaca T, en concreto TnT, la cantidad de un péptido natriurético seleccionado del grupo formado por ANP, NT-proANP, BNP y NT-proBNP, preferentemente BNP o NT-proBNP, en particular NT-proBNP, o una variante de los péptidos mencionados.

Los péptidos natriuréticos, en particular NT-proBNP, son conocidos como los denominados marcadores neurohumorales indicadores de tensión de la pared del miocardio que puede estar relacionado con, por ejemplo, la insuficiencia cardíaca, la isquemia miocárdica, y/o la necrosis miocárdica.

En el contexto de la presente invención, la determinación de la cantidad de un péptido natriurético o un derivado del mismo, en particular NT-proBNP, permite obtener información adicional sobre el nivel de enfermedad cardíaca coronaria isquémica, en particular si nos hallamos ante una enfermedad coronaria de múltiples vasos del individuo correspondiente.

El término “individuo” tal como se utiliza en la presente descripción se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y, más preferentemente, humanos. Sin embargo, se prevé en la presente descripción que el individuo preferentemente no debe mostrar síntomas de los conocidos como asociados con la CHD o con un evento cardiovascular agudo, es decir, dolor torácico, disnea, y otros descritos anteriormente. Más preferentemente, el individuo no debe mostrar síntomas pertenecientes a las clases II, III o IV de la NYHA. En una realización de la presente invención, el individuo pertenece a la clase I de la NYHA.

La determinación de la cantidad de un péptido natriurético o una Troponina cardíaca según la presente descripción se refiere a la medición de la cantidad o concentración, preferentemente de forma cuantitativa o semi-cuantitativa. La

medición puede realizarse de forma directa o indirecta. La medición directa se refiere a medir la cantidad o concentración de un péptido natriurético o una Troponina cardiaca en base a una señal que se obtiene a partir del propio péptido natriurético o Troponina cardiaca y cuya intensidad se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presente en la muestra. Dicha señal, denominada en ocasiones como señal de intensidad, puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física específica del péptido natriurético o Troponina cardiaca. La medición indirecta incluye medir una señal obtenida a partir de un componente secundario (es decir, un componente que no es el propio péptido natriurético) o un sistema de lectura biológico, por ejemplo, ligandos, marcadores, productos de reacción enzimática o respuestas celulares medibles.

Según la presente invención, determinar la cantidad del péptido natriurético o Troponina cardiaca puede conseguirse mediante todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos y métodos de inmunoensayo que utilizan moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo tipo sándwich, competitivos u otros. Dichos ensayos desarrollarán una señal indicativa de la presencia o ausencia del péptido natriurético o Troponina cardiaca. Además, la potencia de la señal, preferentemente, puede correlacionarse directa o indirectamente (por ejemplo inversamente proporcional) con la cantidad de péptido presente en una muestra. Además los métodos adecuados comprenden medir una propiedad química o física específica del péptido natriurético tal como su masa molecular específica o su espectro RMN. Dichos métodos comprenden, preferentemente, sensores biológicos, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos de análisis tales como espectrómetros de masa, analizadores RMN, o dispositivos de cromatografía. Además, los métodos incluyen métodos de ELISA en microplaca, inmunoensayos robotizados o completamente automatizados (disponibles por ejemplo en los analizadores Elecsys™), CBA (un ensayo de unión en cobalto disponible en los analizadores Roche-Hitachi™) y ensayos de aglutinación en látex (disponibles en los analizadores Roche-Hitachi™). Los métodos y medios de medición también incluyen dispositivos de diagnóstico en el punto de atención tales como el Cardiac Reader™ (disponible de Roche Diagnostics).

Los dispositivos de diagnóstico en el punto de atención se entienden generalmente como dispositivos capaces de realizar mediciones a la cabecera del paciente. Un ejemplo es el Cardiac Reader™ (disponible de Roche Diagnostics), combinado, por ejemplo, con tiras reactivas para NT-proBNP (disponible como "proBNP cardiaca" de Roche Diagnostics). Dicho ensayo puede utilizar dos anticuerpos (preferentemente monoclonales) dirigidos contra el péptido de interés (por ejemplo un péptido tipo BNP). Los anticuerpos pueden ser idénticos a los anticuerpos utilizados, por ejemplo en los ensayos Elecsys™ o Cobas™. Por ejemplo el primer anticuerpo se marca con biotina y el segundo se marca con partículas de oro. El ensayo puede iniciarse añadiendo una pequeña cantidad de (por ejemplo 150 µl) de muestra sanguínea en la tira reactiva (por ejemplo en un pocillo de muestra de la tira reactiva). Los eritrocitos de la muestra pueden separarse del plasma restante antes o después de la adición a la tira reactiva, por ejemplo, si la muestra fluye a través de una felpa adecuada (por ejemplo una felpa de fibra de vidrio). Dichos medios de separación (por ejemplo una felpa) son preferentemente parte de la tira reactiva. Los anticuerpos (preferentemente ya presentes en la tira reactiva) se disuelven en el plasma restante. Los anticuerpos son capaces de unirse al péptido o polipéptido de interés, formando un complejo sándwich de tres elementos. Los anticuerpos (unidos o no Unidos) fluyen a través de la tira dentro de la zona de detección. La zona de detección comprende medios para la detección del complejo unido, por ejemplo puede comprender estreptavidina. Ésta inmoviliza los complejos y visualiza el complejo inmovilizado como una línea púrpura por el anticuerpo marcado con oro. Preferentemente, el anticuerpo marcado con oro libre puede a continuación desplazarse hacia abajo de la tira donde es capturado en una zona que comprende un péptido o polipéptido sintético que comprende el epítipo del péptido tipo BPN a detectar, visualizado como una línea púrpura separada. La presencia de dicha segunda línea puede servir como control porque indica que el flujo de la muestra ha funcionado correctamente y que el anticuerpo está intacto. La tira reactiva puede comprender un marcador que indica qué péptido o polipéptido de interés puede detectarse con la tira. También puede incluir un código de barras u otro código legible por un dispositivo de medición óptica de la cantidad de marcador detectable en la zona de detección. Dicho código de barras puede incluir información que indica qué péptido o polipéptido de interés puede detectarse con la tira. El código de barras también puede incluir información específica de lote sobre la tira reactiva.

Los ensayos adecuados para ser utilizados en la presente descripción poseen una elevada sensibilidad para la detección de una Troponina cardiaca, en particular Troponina T y/o Troponina I. Los ensayos correspondientes permiten la medición de Troponina T a una concentración con un límite inferior de aproximadamente 0,001 ng/ml o incluso inferior. Una concentración de aproximadamente 0,01 ng/ml puede determinarse con una reproducibilidad del 99% o más. Los valores correspondientes se aplican a otras Troponinas cardiacas como la Troponina I, y estos valores son conocidos por los expertos en la técnica o son deducibles de los valores publicados en la literatura.

Los ensayos de elevada sensibilidad se basan esencialmente en los mismos reactivos y componentes de los ensayos de la generación anterior. La sensibilidad se ha aumentado modificando la geometría o el tiempo de incubación.

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

En una realización preferente, el método para determinar la cantidad de un péptido natriurético o de una Troponina cardiaca comprende las etapas de (a) poner en contacto una célula capaz de generar una respuesta celular cuya intensidad es indicativa de la cantidad de péptido con el péptido durante un período adecuado de tiempo, (b) medir la respuesta celular.

5 Para medir respuestas celulares, la muestra o la muestra procesada se añade, preferentemente, 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, un polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia debe generar una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad del péptido.

10 En otra realización preferente, el método para determinar la cantidad de un péptido natriurético o Troponina cardiaca comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica obtenible a partir del péptido natriurético o Troponina cardiaca en la muestra.

Tal como se ha descrito anteriormente, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada en una variable m/z específica del péptido natriurético o Troponina cardiaca observados en los espectros de masa o el espectro RMN específico del péptido natriurético o de la Troponina cardiaca.

15 En otra realización preferente, el método de determinación de la cantidad de un péptido natriurético comprende las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido o, (c) medir la cantidad de ligando unido.

20 El ligando unido generará una señal de intensidad. La unión según la presente descripción incluye tanto unión covalente como no covalente. Un ligando según la presente descripción puede ser cualquier componente, por ejemplo un péptido, polipéptido, ácido nucleico, o molécula pequeña, que se une a los péptidos natriuréticos o Troponinas cardiacas descritos en la presente invención. Como ligandos preferentes se incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos tales como receptores de los péptidos natriuréticos o parejas de unión de las Troponinas cardiacas y fragmentos de los mismos que incluyen los dominios de unión a los péptidos, y aptámeros, por ejemplo, aptámeros de ácidos nucleicos o péptidos. Los métodos para la preparación de dichos ligandos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la identificación o producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también la ofrecen suministradores comerciales. Los expertos en la técnica están familiarizados con los métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos con afinidad o especificidad más elevada. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorizadas dentro de los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. A continuación pueden analizarse la capacidad de unión de estos derivados según procedimientos de cribado conocidos en la técnica, por ejemplo expresión en fagos. Los anticuerpos tal como se refieren en la presente descripción incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos tales como, fragmentos Fv, Fab, F(ab)<sub>2</sub> que son capaces de unirse al antígeno o hapteno. La presente descripción también incluye anticuerpos híbridos humanizados en los que se combinan secuencias de aminoácidos de un anticuerpo dador no humano que muestra una especificidad de antígeno deseada con secuencias de un anticuerpo aceptador humano. Las secuencias dadoras incluirán habitualmente al menos los residuos de aminoácidos que se unen al antígeno del dador pero también pueden incluir otros residuos de aminoácidos relevantes desde el 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 natriurético. La unión específica según la presente descripción significa que el ligando o agente debería substancialmente no unirse ("tener reacción cruzada" con) otros péptidos, polipéptidos o sustancias presentes en la muestra a analizar. Preferentemente, el péptido natriurético unido de forma específica debería unirse con una afinidad al menos 3 veces superior, más preferentemente al menos 10 veces superior, e incluso más preferentemente al menos 50 veces superior a cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si puede distinguirse y medirse de forma inequívoca, por ejemplo según su tamaño en una transferencia Western, o su abundancia relativa 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 métodos adecuados. En primer lugar, la unión de un ligando pueden medirse de forma directa, por ejemplo mediante RMN o resonancia de plasmones superficiales. En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse un producto de una reacción enzimática (por ejemplo puede medirse la cantidad de una proteasa midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo una transferencia Western). Alternativamente, el ligando puede mostrar él mismo propiedades enzimáticas y puede ponerse en contacto el complejo ligando/péptido natriurético o ligando/Troponina cardiaca o el ligando unido al péptido natriurético o a la Troponina cardiaca, respectivamente, con un sustrato adecuado que permita la detección mediante la generación de una señal de intensidad. Para la medición de productos de reacción enzimática, preferentemente la cantidad de sustrato es saturante. El sustrato también puede marcarse 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 que aparezca una cantidad de producto determinada (por ejemplo detectable).

60 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 directamente (de forma covalente o no covalente) al ligando. El marcaje indirecto supone la

unión (de forma covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con 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 superiores se utiliza 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 sustrato también puede "etiquetado" con una o más etiquetas tal como se conoce en la técnica. Dichas etiquetas pueden ser entonces dianas para otros ligandos superiores. Como etiquetas adecuadas se incluyen la biotina, la digoxigenina, el His-Tag, la glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, mycTag, la hemaglutinina del virus de la gripe A (HA), la proteína de unión a la maltosa, y similares. En el caso de péptidos o polipéptidos, la etiqueta se sitúa preferentemente en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Son marcadores adecuados 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 sustratos adecuados para la detección se incluyen la di-amino-benzidina (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), y ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación enzima sustrato 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 (DELFLIA), 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.

En otra realización preferente, el método para determinar la cantidad de una Troponina cardiaca o un péptido natriurético comprende (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando del péptido natriurético o la Troponina cardiaca, tal como se ha especificado anteriormente, con una muestra que comprende el péptido natriurético o la Troponina cardiaca y (b) medir la cantidad de péptido natriurético o Troponina 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 y chips de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, hojas, duracitas, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico etc. disponibles comercialmente. 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 descripción (Nolan JP, Sklar LA. (2002) Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. ("Tecnología de las matrices en suspensión: evolución del paradigma de la matriz plana"), 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 los grupos protectores fotolábiles, son conocidos en general (US 5.744.305).

El término "cantidad" tal como se utiliza en la presente descripción incluye la cantidad absoluta de los péptidos natriuréticos o Troponinas cardiacas, la cantidad relativa de los péptidos natriuréticos o Troponinas cardiacas así como cualquier valor o parámetro que se correlacione con las mismas. Dichos valores o parámetros incluyen valores de señal de intensidad a partir de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas a partir de dichos péptidos mediante mediciones directas, por ejemplo valores de intensidad en espectros de masa o espectros de RMN. Además, se incluyen todos los valores o parámetros que se obtienen mediante mediciones indirectas especificadas en cualquier otro parte de esta descripción, por ejemplo, niveles de expresión determinados a partir de sistemas de lectura biológicos

en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidas a partir de ligandos unidos de forma específica. Debe entenderse que también pueden obtenerse valores que se correlacionan con las cantidades o parámetros previamente mencionados mediante todas las operaciones matemáticas estándar.

5 El término "Troponina cardíaca" se refiere a todas las isoformas de Troponina expresadas en células del corazón y, preferentemente, las células subendocardiales. Estas isoformas están bien caracterizadas en la técnica tal como 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.

10 En el contexto de la presente invención, generalmente se prefiere la Troponina T a la Troponina I. Sin embargo, los expertos en la técnica son conscientes de que en muchos o la mayoría de casos la información obtenida de la medición de la cantidad de Troponina es tan valiosa como la información obtenida de la medición de Troponina T, emanando ambos péptidos de las células musculares cardíacas, es decir el miocardio, y liberándose ante los mismos eventos (es decir el daño celular).

15 Por consiguiente, en el método de la presente descripción pueden determinarse ambas Troponinas de forma conjunta, es decir de forma simultánea o secuencial, o de forma individual, es decir sin determinar en ningún caso la otra isoforma.

20 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 que las Troponinas cardíacas específicas. 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 mediante 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  
25 la presente invención, deberá poseer una secuencia de aminoácidos que difiera como consecuencia de al menos la sustitución, deleción 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 descripción incluyen fragmentos de las Troponinas cardíacas específicas o de los tipos de variantes previamente mencionados  
30 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.

35 El término "péptido natriurético" incluye los péptidos tipo péptido natriurético atrial (ANP) y péptido natriurético cerebral (BNP) y variantes de los mismos que poseen el mismo potencial predictivo. Los péptidos natriuréticos según la presente descripción incluyen péptidos tipo ANP y tipo BNP y variantes de los mismos (ver, por ejemplo, Bonow, R.O. (1996). *New insights into the cardiac natriuretic peptides* ("Nuevos conocimientos sobre los péptidos natriuréticos cardíacos"). *Circulation* 93: 1946-1950).

40 Los péptidos tipo ANP incluyen pre-proANP, proANP, NT-proANP, y ANP.

Los péptidos tipo BNP incluyen pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP, y BNP.

45 El pre-pro-péptido (134 aminoácidos en el caso de pre-proBNP) comprende un péptido señal corto, que se escinde enzimáticamente liberando el pro-péptido (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El pro-péptido se escinde adicionalmente en un pro-péptido N-terminal (NT-pro-péptido-, 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de BNP, 28 aminoácidos en el caso de ANP).

50 Los péptidos natriuréticos preferentes según la presente descripción son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP, y variantes de los mismos. ANP y BNP son las hormonas activas y poseen una vida media más corta que los péptidos inactivos correspondientes, NT-proANP y NT-proBNP. BNP se metaboliza en el torrente circulatorio, mientras que NT-proBNP circula en forma de molécula intacta y se elimina como tal por vía renal. La vida media in vico de NT-proBNP es 120 minutos mayor que la de BNP, que es de 20 minutos (Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. *Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase* ("El retraso del metabolismo del peptide natriurético cerebral refleja la Resistencia a la endopeptidasa neutra"). *J Endocrinol.* 2000; 167: 239-46.).

55 Los requisitos preanalíticos de NT-proBNP son más robustos, lo que permite un transporte más fácil a un laboratorio central (Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. *Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples* ("Estabilidad a largo plazo



del péptido natriurético cerebral (BNP) y del proBNP aminoterminal (NT-proBNP) en muestras de plasma congelado”). Clin Chem Lab Med 2004; 42: 942-4.). Las muestras sanguíneas pueden almacenarse a temperatura ambiente o pueden ser enviadas por correo o transportadas sin pérdidas de recuperación. Por el contrario, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C supone una pérdida de concentración de al menos el 20% (Mueller T, Gegenhuber A, et al., Clin Chem Lab Med 2004; 42: 942-4, ver más arriba; Wu AH, Packer M, Smith A, Bijou R, Fink D, Mair J, Wallentin L, Johnston N, Feldcamp CS, Haverstick DM, Ahnadi CE, Grant A, Despres N, Bluestein B, Ghani F. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study. (“Evaluación clínica y analítica del ensayo del péptido natriurético tipo B automatizado Bayer ADVIA Centaur en pacientes con insuficiencia cardiaca: estudio multicéntrico”). Clin Chem 2004; 50: 867-73.) Por lo tanto, dependiendo del curso temporal o propiedades de interés, puede ser ventajosa la medición de las formas activa o inactiva del péptido natriurético.

Los péptidos natriuréticos más preferentes, según la presente descripción, son NT-proBNP y variantes del mismo. Tal como se ha comentado brevemente con anterioridad, el NT-proBNP humano al que se refiere la presente descripción es un polipéptido que posee, preferentemente, una longitud de 76 aminoácidos que corresponden a la parte N-terminal de la molécula NT-proBNP humana. Las estructuras del BNP y el NT-proBNP ya han sido descritas en detalle en la técnica previa, por ejemplo en WO 02/089657, WO 02/083913, Bonow 1996, New Insights into the cardiac natriuretic peptides (“Nuevos conocimientos sobre los péptidos natriuréticos cardiacos”). Circulation 93: 1946-1950. Preferentemente, NT-proBNP humano tal como se utiliza en la presente descripción es el NT-proBNP tal como se da a conocer en la patente EP 0 648 228 B1.

El NT-proBNP al que se refiere la presente descripción incluye además variantes alélicas y otras variantes de dicha secuencia específica del NT-proBNP humano descrita anteriormente. Específicamente, se prevén polipéptidos variantes que son a nivel de la secuencia de aminoácidos idénticos al menos en un 60%, más preferentemente en al menos un 70%, al menos en un 80%, al menos en un 90%, al menos en un 95%, al menos en un 98%, al menos en un 99%, a NT-proBNP humano. De forma substancialmente similar y también previstos están los productos de degradación proteolítica que siguen siendo reconocidos mediante medios diagnósticos o mediante ligandos dirigidos contra el péptido completo correspondiente. También se prevén polipéptidos variantes que poseen deleciones, sustituciones, y/o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia del NT-proBNP humano siempre y cuando dichos polipéptidos posean propiedades de NT-proBNP. Siendo las propiedades de NT-proBNP aquí referidas propiedades inmunológicas y/o biológicas. Preferentemente, las variantes de NT-proBNP poseen propiedades inmunológicas (es decir composición de los epítomos) comparables a las del NT-proBNP. Por lo tanto, la variantes deben ser reconocibles por los medios o ligandos previamente mencionados utilizados para la determinación de la cantidad de péptidos natriuréticos. Las propiedades biológicas y/o inmunológicas de NT-proBNP pueden detectarse mediante el ensayo descrito en Karl y otros (Karl 1999. Development of a novel, N-Terminal-proBNP (NT-proBNP) assay with a low detection limit (“Desarrollo de un ensayo novedoso para proBNP-N-terminal (NT-proBNP) con un límite de detección bajo”). Scand J Clin Invest 59:177-181), Yeo y otros (Yeo 2003. Multicenter evaluation of the Roche NT-proBNP assay and comparison to the Biosite Triage assay (“Evaluación multicéntrica del ensayo NT-proBNP de Roche y su comparación con el ensayo Biosite Triage”). Clinica Chimica Acta 338:107-115), y en el Ejemplo 1 descrito más adelante. Las variantes también incluyen péptidos modificados post-traducción como los péptidos glicosilados.

Una variante según la presente descripción es también un péptido o polipéptido que ha sido modificado tras la recogida de la muestra, por ejemplo mediante la unión covalente o no covalente de un marcador al péptido, particularmente un marcador radioactivo o fluorescente.

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. 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 descripción (es decir. Péptidos natriuréticos o Troponina cardiaca).

El término comparar tal como se utiliza en la presente descripción incluye comparar la cantidad de péptido natriurético o Troponina cardiaca existente en la muestra a analizar con una fuente de referencia adecuada especificada en otras partes de la presente descripción. Debe entenderse que el término comparar tal como se utiliza en la presente descripción se refiere a una comparación de parámetros o valores correspondientes, por ejemplo la cantidad absoluta se compara con una cantidad de referencia absoluta, mientras que la concentración se compara con una concentración de referencia o una señal de intensidad obtenida de una muestra de ensayo 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 descripción 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 correspondientes a referencias adecuadas almacenadas en una base de datos mediante un programa informático. El programa informático puede además evaluar el resultado de la comparación, es decir, proporcionar automáticamente el diagnóstico deseado en un formato de salida adecuado.

5 El término “cantidad de referencia” tal como se utiliza en la presente descripción se refiere a una cantidad que permite evaluar si un individuo padece una enfermedad cardíaca isquémica avanzada, que es preferentemente asintomática, u otra enfermedad a la que se haga referencia en la presente descripción mediante una comparación tal como se ha descrito previamente. Por consiguiente, la referencia puede derivarse de un individuo perteneciente a un grupo de riesgo, tal como se ha definido anteriormente, y/o de un individuo sano al menos en cuanto a la presencia de enfermedad cardíaca isquémica avanzada. La cantidad de referencia aplicable a un individuo puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos tales como la edad, el sexo, o la sub-población. Por lo tanto, puede determinarse una cantidad de referencia adecuada mediante el método de la presente descripción a partir de una muestra de referencia que será analizada conjuntamente, es decir de forma simultánea o subsiguiente, con la muestra problema. En principio, se ha hallado que según la presente descripción durante la progresión de la enfermedad cardíaca isquémica la cantidad de Troponinas cardíacas que se hallará, por ejemplo, en plasma, también aumentará. Además, cuanto más grave se haga la enfermedad cardíaca isquémica, mayor será la cantidad de péptidos natriuréticos en plasma.

15 Por lo tanto, con respecto a un individuo sano, niveles elevados de Troponina cardíaca y péptido natriurético deben asociarse a una mayor probabilidad de padecer un evento cardiovascular agudo o formas más graves de insuficiencia cardíaca crónica. Más preferentemente, se ha hallado, según la presente invención, que una cantidad de referencia de Troponina cardíaca de al menos 0,003 ng/ml, preferentemente 0,1 ng/ml, en particular 0,5 ng/ml es indicativa de enfermedad cardíaca coronaria avanzada. Además, una cantidad de referencia de Troponina cardíaca tal como se ha descrito anteriormente combinada con una cantidad de referencia de péptido natriurético de al menos 150 pg/ml, preferentemente 350 pg/ml, en particular 500 pg/ml es también indicativa de (es decir se asocia a una mayor probabilidad de desarrollar) una enfermedad cardíaca coronaria avanzada.

Las definiciones y explicaciones de los términos realizadas previamente y a continuación se aplican de forma correspondiente a todas las reivindicaciones descritas en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas.

25 De lo anterior se infiere que en una realización preferente del método de la presente invención, una cantidad de referencia de Troponina cardíaca de al menos 0,003 ng/ml, opcionalmente combinada con cualquier cantidad de referencia citada de péptido natriurético es indicativa de enfermedad cardíaca coronaria avanzada.

En una realización preferente, la presente descripción permite diferenciar entre una enfermedad cardíaca coronaria de un solo vaso de una enfermedad cardíaca coronaria de múltiples vasos.

30 En el contexto de la presente invención, el término “enfermedad cardíaca coronaria de múltiples vasos” indica una oclusión arterial que es mayor a una “enfermedad cardíaca coronaria de un solo vaso”.

El término “diferenciar” tal como se utiliza en la presente descripción significa distinguir entre un individuo que padece una enfermedad cardíaca coronaria de un solo vaso de un individuo que padece una enfermedad cardíaca coronaria de múltiples vasos.

35 El término “insuficiencia cardíaca crónica” tal como se utiliza en la presente descripción se refiere a una insuficiencia cardíaca crónica, es decir permanente. La insuficiencia cardíaca se caracteriza por una alteración de la velocidad del flujo sanguíneo diastólica o sistólica y, por lo tanto, por una alteración de la función cardíaca. Sin embargo, más que mostrar una isquemia súbita acompañada de necrosis severa de las células musculares cardíacas, la insuficiencia cardíaca crónica tal como se refiere en la presente invención, se acompaña, preferentemente, de eventos necróticos continuados de las células musculares cardíacas que dan lugar a una alteración de la función cardíaca que evoluciona de forma continuada.

40 De forma ventajosa, la presente descripción – al dar a conocer el método previamente citado para el diagnóstico diferencial de los eventos cardiovasculares agudos y la insuficiencia cardíaca crónica – permite distinguir de forma fiable y rentable tanto económica como temporalmente entre dichas enfermedades. Por lo tanto, los individuos afectados por dichas enfermedades pueden ser tratados de forma inmediata con tratamientos específicos y efectivos en lugar de serlo con tratamientos no específicos e ineficaces.

50 Los individuos en los que se encuentre una Troponina T elevada pero no presentan síntomas serán sometidos a un diagnóstico más intenso, en particular una angiografía mediante catéter, o una angiografía virtual utilizando medio de contraste en conexión con una tomografía computarizada, para identificar constricciones que puedan ser abiertas, según sea el caso, mediante dilatación con balón o con un implante intraluminal (stent). De este modo puede evitarse que se produzca un MI, y puede mantenerse la función cardíaca.

Los individuos en los que se encuentre una Troponina T elevada pero no presenten síntomas también pueden ser sometidos a tratamientos para disminuir la presión sobre el interior de las paredes del miocardio disminuyendo de este modo la probabilidad de que se produzca necrosis.

Específicamente, realizaciones preferentes del método de la presente descripción se definen como sigue:

5 En una realización preferente del método de la presente invención, una cantidad de referencia de Troponina cardiaca de al menos 0,003 ng/ml y una cantidad de referencia de péptido natriurético de al menos 150 pg/ml son indicativas de una enfermedad arterial coronaria avanzada grave. En una realización más preferente, la cantidad de referencia de la Troponina cardiaca es de al menos 0,1 ng/ml y la cantidad de referencia del péptido natriurético es de al menos 350 pg/ml. En una realización particularmente preferente, la cantidad de referencia de la Troponina cardiaca es de al menos 0,5 ng/ml y la cantidad de referencia del péptido natriurético es de al menos 500 pg/ml.

En una realización preferente del método de la presente invención, el péptido natriurético es BNP, más preferentemente NT-proBNP.

10 En una realización adicionalmente preferente del método de la presente invención, el péptido natriurético es ANP, más preferentemente NT-proANP.

En aún otra realización adicionalmente preferente del método de la presente invención, dicha Troponina cardiaca es la Troponina T y/o la Troponina I.

También, en una realización adicionalmente preferente del método de la presente invención, dicho individuo es un humano.

15 La presente descripción se refiere, además, a un dispositivo de diagnóstico en una enfermedad cardiaca coronaria isquémica avanzada que comprende:

- a) medios para determinar la cantidad de una Troponina cardiaca en un individuo;
- b) opcionalmente, medios para determinar la cantidad de un péptido natriurético en una muestra.

20 El término "dispositivo" tal como se utiliza en la presente descripción se refiere a un sistema de medios que comprende al menos los medios previamente mencionados unidos operativamente entre sí para permitir la predicción. Los medios preferentes para determinar la cantidad de los péptidos natriuréticos o las Troponinas cardiacas y los medios para llevar a cabo la comparación se han dado a conocer anteriormente en relación con el método de la presente invención. Cómo unir los medios de forma operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplican medios para la determinación automática de la cantidad de péptidos, los datos obtenidos por dichos medios de funcionamiento automático pueden procesarse, por ejemplo, mediante un programa informático para diagnosticar un evento cardiovascular agudo u otra de las enfermedades referidas en la presente invención. Preferentemente, los medios se incluyen en un solo dispositivo. Dicho dispositivo puede incluir una unidad de análisis para la medición de la cantidad de los péptidos en una muestra y una unidad informática para el procesamiento de los datos resultantes para realizar el diagnóstico diferencial. Alternativamente, cuando se utilicen medios tales como tiras reactivas para la determinación de la cantidad de péptidos, los medios para el diagnóstico pueden incluir tiras control o tablas para situar la cantidad determinada respecto a una cantidad que se sabe que se asocia a un evento cardiovascular agudo u otra de las enfermedades referidas en la presente descripción o a una cantidad conocida como indicadora de que el individuo está sano. Las tiras reactivas se acoplan, preferentemente, a un ligando que se une específicamente al péptido natriurético o la Troponina cardiaca. La tira o dispositivo comprende, preferentemente, medios para la detección de la unión de dichos péptidos 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 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, se empaquetan conjuntamente en un kit.

45 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 es en forma de datos diagnósticos ya procesados cuya interpretación no requiere de un facultativo, es decir, debería ser inevitablemente claro a partir de la salida si el individuo padece una insuficiencia cardiaca leve o moderada. Además, los dispositivos preferentes comprenden unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo sensores biológicos, matrices, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen específicamente el péptido natriurético, 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.

50 Además, la presente descripción comprende también la utilización de un dispositivo que comprende:

- a) medios para determinar la cantidad de una Troponina cardiaca en una muestra de un individuo;
- b) opcionalmente, medios para determinar la cantidad de un péptido natriurético en una muestra, para diagnosticar en un individuo una enfermedad cardiaca coronaria avanzada, que es preferentemente asintomática.

Finalmente, la presente descripción se refiere a un kit para llevar a cabo el método de la presente descripción que comprende:

- a) medios para determinar la cantidad de una Troponina cardiaca en una muestra de un individuo;
- b) opcionalmente, medios para determinar la cantidad de un péptido natriurético en una muestra.

5 El término "kit" tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un conjunto de los medios previamente mencionados, proporcionados, preferentemente, por separado o en un solo contenedor. El contenedor también comprende, preferentemente, instrucciones para llevar a cabo el método de la presente invención.

10 Opcionalmente, el kit puede comprender además un manual de usuario para interpretar los resultados de cualquiera de las mediciones en cuanto al diagnóstico de una enfermedad cardiaca coronaria avanzada y/o sus complicaciones. En particular, dicho manual puede incluir información sobre qué nivel determinado corresponde a qué nivel de riesgo. 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 el nivel o niveles de los marcadores biológicos correspondientes.

Los ejemplos siguientes deben simplemente ilustrar la presente invención.

15 Ejemplos

Ejemplo 1:

Se realizó un ECG, una ecografía así como una angiografía coronaria a un total de 235 individuos asintomáticos con sospecha de riesgo de arterioesclerosis.

20 De acuerdo con los resultados de la ecografía se diagnosticó la presencia de disfunción diastólica si el LVEF era inferior al 40%. Se consideró que los pacientes con una LEVF superior al 60% no presentaban disfunción sistólica, los pacientes con una LEVF entre el 40% y el 60% se consideraron como indeterminados en cuanto a la presencia de disfunción sistólica. Además se midieron el tamaño de la aurícula izquierda y el grosor del tabique.

La enfermedad arterial coronaria se clasificó en enfermedad de uno, dos o tres vasos. Se asumió la presencia de enfermedad del vaso si existía una o más estenosis del vaso que disminuían el volumen del mismo al menos un 50%.

25 Además de estas pruebas, se realizó un historial clínico referente a los comportamientos de riesgo que incluía el tabaquismo, la diabetes, la hipertensión arterial, la presencia de infarto de miocardio previo así como las alteraciones lipídicas, específicamente los niveles de colesterol, los niveles de colesterol LDL y los niveles de triglicéridos.

30 La Troponina T sensible se determinó mediante un ensayo de Troponina T sensible de nuevo desarrollo (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), también se midió el NT-proBNP mediante inmunoensayo (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), se determinó el Ligando CD40 en muestras de plasma utilizando un inmunoensayo de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania y se determinó el NT-proANP mediante inmunoensayo en placa de microtitulación fabricado por Biomedica, Viena, Austria.

Todos los ensayos se realizaron según las instrucciones del fabricante.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Cuartiles de TnT altamente sensible en pacientes con enfermedad arterial coronaria documentada

	Hs-TnT [ng/ml] N = 235			
	Grupo diagnóstico I			
	Cuartil 1	Cuartil 2	Cuartil 3	Cuartil 4
N	49	59	58	69
Mediana de Hs-TnT	0	0,00292	0,00954	0,05022
rango	0-0,00069	0,0008-0,00541	0,00555-0,0176	0,0183-0,7079
Edad, mediana	64	67	67	69

ES 2 390 359 T3

Hombres (n)	22	37	31	51
Mujeres (n)	27	22	17	18
Altura (m), mediana	1.69	1.70	1.69	1.70
Peso (kg)	75.5	77.0	82.0	82.0
LEVF (%)				
> 60%	42	51	38	21
40-60%	2	3	3	15
<60%	5	5	17	33
	p<0,0001***			
LA (mm), mediana	39,0	40,0	41,0	40,0
SEP (mm) mediana	12,0	12,0	13,0	12,0
Enfermedad arterial coronaria				
Enfermedad de 1 vaso	8	11	7	14
Enfermedad de 2 vasos	15	12	12	11
Enfermedad de 3 vasos	9	14	26	27
	p<0,0290*			
Fumador (n)	16	32	28	39
	p<0,05 (n.s.)			
Diabetes (n)	9	10	23	25
Hipertensión arterial (n)	34	43	44	43
Frecuencia cardiaca	67	62	70	73
MI previo (n)	9	14	24	38
ECG (n)	47	53	54	61
Colesterol mg/dl, mediana	233,0	229,0	224,0	214,0
Colesterol LDL mg/dl, mediana	149,9	138,6	145,6	133,0
Triglicéridos mg/dl, mediana	143,5	156,0	169,0	151,0
	p<0,0001			
NT-proBNP pg/ml, mediana	116,8	175,6	359,7	1046,0
rango	5,0-5942	11,2-12703	5,0-14953	16,3-21116
	p<0,0001			
NT-proANP pg/ml, mediana	2016,0	2555,9	3485,0	5364,2
rango	540-11640	901-9536	1189-11955	1185-27978
	p<0,05 (n.s.)			
sCD40L ng/ml, mediana	1,155	1,023	1,104	1,550
rango	0,212-5,818	0,184-3,621	0,009-7,454	0,080-5,482

Ejemplo 2:

5 Un hombre de 57 años de edad con historia de diabetes tipo 2 presente episodios repetidos de dolor torácico de corta duración predominantemente no relacionados con el ejercicio. Se realiza una coronariografía para una mejor clasificación que no halla cambios patológicos. La Troponina T es  $< 0,01$ , el NT-proBNP es de 92 pg/ml.

Ejemplo 3:

10 Un hombre de 42 años de edad con historia familiar de infarto de miocardio y un buen estado de salud accede a realizarse un chequeo médico. En la ecocardiografía se halló una LEVF disminuida del 25%, la coronariografía muestra una enfermedad de tres vasos con dos estenosis  $\geq 90\%$  que se tratan mediante la implantación de implantes intraluminales (stents). La Troponina T es 0,04, el NT-proBNP es de 920 pg/ml.

Ejemplo 4:

15 Se siguieron un total de 26 pacientes con enfermedad cardiovascular avanzada y Troponina T sensible detectable durante un período de 12 meses. Tras el período de 12 meses de observación todos los pacientes seguían presentando una Troponina T positiva y no presentaron síntomas antes de la evaluación. La mediana inicial de los niveles de TNT era  $< 0,009$  ng/ml y se mantuvo a 0,009 ng/ml tras los 12 meses. Los datos indican que la positividad de la Troponina T es un hallazgo que permanece estable permitiendo una asociación adecuada a los grupos de riesgo definidos independiente del punto temporal de la extracción de sangre.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para el diagnóstico de una enfermedad cardíaca coronaria isquémica avanzada provocada por una enfermedad de las arterias coronarias en un paciente asintomático perteneciente a un grupo de riesgo seleccionado del grupo formado por fumadores, pacientes con diabetes, pacientes obesos, individuos afectados de hiperlipemia, individuos afectados de hipertensión arterial, individuos con historia familiar de enfermedad cardíaca coronaria, infarto de miocardio o accidente vascular cerebral, y personas afectas de artritis reumatoide que comprende las etapas de:
- a) determinar la cantidad de una Troponina cardíaca en una muestra de un individuo;
- b) diagnosticar la enfermedad comparando la cantidad determinada en la etapa a) con cantidades de referencia
- 10 y en el que un aumento de la cantidad de la troponina cardíaca por encima de la cantidad de referencia de 0,003 ng/ml es indicativa de enfermedad arterial coronaria avanzada.
2. Método, según la reivindicación 1, en el que la enfermedad cardíaca coronaria relacionada con una enfermedad arterial coronaria, en particular con una enfermedad de múltiples vasos.
3. Método, según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad cardíaca coronaria isquémica avanzada es asintomática.
- 15 4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha Troponina cardíaca es Troponina T y/o I.
5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se mide la cantidad de un péptido natriurético además de la Troponina cardíaca
6. Método, según la reivindicación 5, en el que el péptido natriurético es BNP.
- 20 7. Método, según la reivindicación 6, en el que BNP es NT-proBNP.
8. Método, según la reivindicación 7, en el que el péptido natriurético es ANP.
9. Método, según la reivindicación 8, en el que ANP es NT-proANP.
10. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho individuo es un humano.
- 25 11. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que una cantidad de referencia del péptido natriurético de al menos 150 pg/ml, preferentemente 350 pg/ml, es indicativa en enfermedad arterial coronaria avanzada grave.