

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 960**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2002 E 02759956 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 1423705**

54 Título: **Análisis conjunto de la expresión de un marcador biológico para diagnosticar el fallo de un órgano**

30 Prioridad:

04.09.2001 US 946171

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.06.2013

73 Titular/es:

**NEXUS DX, INC. (100.0%)
6759 Mesa Ridge Road, Suite 100
San Diego, CA 92121 , US**

72 Inventor/es:

**JACKOWSKI, GEORGE y
STANTON, ERIC, B.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 407 960 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

Análisis conjunto de la expresión de un marcador biológico para diagnosticar el fallo de un órgano.

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere al concepto de la utilización conjunta de marcadores biológicos expresados en respuesta a un cambio anómalo de presión o de volumen, y al estrés de un órgano en concreto (p. ej. ANP N-terminal (pro-ANP) en el tejido cardíaco) junto con la expresión de marcadores biológicos que son indicadores de la lesión de un tejido (p. ej. troponina cardíaca I (cTnI), o marcadores de fibrosis para el tejido cardíaco) como una herramienta de diagnóstico para diagnosticar con precisión y rapidez la condición del órgano enfermo. Aunque este concepto es aplicable a numerosos órganos y sistemas de órganos, esta solicitud ilustrará en particular el concepto de utilización conjunta del marcador en relación con el corazón, específicamente en relación con la insuficiencia cardíaca congestiva.

FUNDAMENTOS DE LA INVENCION

15 La insuficiencia cardíaca congestiva (CHF, por sus siglas en inglés) afecta aproximadamente a 4,8 millones de norteamericanos. Aproximadamente 400.000 nuevos casos se diagnostican anualmente y la enfermedad es responsable de aproximadamente 200.000 muertes por año. Estas estadísticas, junto con aproximadamente 1 millón de hospitalizaciones anuales atribuibles a la CHF, producen un gasto anual del orden de 10 mil millones de dólares.

20 La CHF representa una condición que se presenta cuando la función cardíaca se hace insuficiente para satisfacer las necesidades de los sistemas vitales y los tejidos del cuerpo. La incapacidad del corazón para bombear lo suficiente está correlacionada con la fracción de eyección medida, que es el porcentaje de la sangre bombeada durante cada latido del corazón. Una fracción de eyección de entre el 50% y el 75% se considera normal. Esta incapacidad puede ser causada por la insuficiencia o fallo de uno o más lados del corazón, típicamente el lado izquierdo pero también el lado derecho; dicho fallo puede ser el resultado de la disfunción sistólica o diastólica, y puede ser representado por una fracción de eyección inferior al 50% y un atasco de fluido resultante y la acumulación de líquido en los pulmones. Aunque es menos común, la insuficiencia cardíaca derecha tendrá por resultado la acumulación de líquido que se manifiesta en la hinchazón de las venas y los tejidos circundantes del cuerpo, una inadecuada perfusión de los tejidos, fatiga y escasa tolerancia al ejercicio físico. Además, la insuficiencia cardíaca puede ser resultado de la disfunción diastólica. Esto puede ser resultado de trastornos como la hipertensión, la enfermedad valvular, isquemia transitoria, trastornos infiltrantes o enfermedades congénitas, como la cardiomiopatía hipertrofica. Aunque hay casos de pura disfunción diastólica a partir de trastornos infiltrantes tales como la amiloidosis o fibrosis, los pacientes con insuficiencia cardíaca a menudo tienen una combinación tanto de una disfunción sistólica como de una diastólica que contribuyen a la CHF.

35 Las razones subyacentes de este fallo en la funcionalidad del corazón son variadas. El adelgazamiento y debilitamiento de las paredes del ventrículo dan lugar a la dilatación y a una pérdida de la capacidad de bombeo (disfunción sistólica). Alternativamente, la pérdida de elasticidad da lugar a una rigidez, que puede resultar en una disminución del volumen de las cámaras del corazón y en la pérdida de la capacidad de bombeo (disfunción diastólica) y del caudal cardíaco. Además, las anomalías en el funcionamiento de las válvulas del corazón pueden dar lugar a un gasto cardíaco insuficiente, por el cual el cuerpo trata de compensar haciendo que el corazón aumente su ritmo cardíaco, hipertrofia y/o dilatación. Los mecanismos de compensación utilizados por el cuerpo pueden conducir a cambios de arquitectura, en forma de remodelación (sobre todo después de un MI) o la adaptación del músculo cardíaco, que dan lugar finalmente a la pérdida irreparable de la función. Causas relacionadas con la insuficiencia cardíaca pueden ser una o más condiciones tales como enfermedad de la arteria coronaria, lesiones cardíacas isquémicas, p. ej. lesiones resultantes de un ataque cardíaco, hipertensión no controlada, los efectos directos y/o indirectos de la diabetes en el corazón, enfermedad cardíaca valvular, cardiomiopatía, respuesta autoinmunitaria, enfermedad y abuso por agentes externos como el alcohol, el tabaco, los esteroides anabólicos y similares.

45 Históricamente, el diagnóstico preliminar de CHF requiere un historial clínico y un examen físico durante el cual la condición es frecuentemente caracterizada por varios signos y síntomas de sobrecarga de volumen intravascular e intersticial, incluyendo la disnea, ritmo cardíaco irregular, ritmo cardíaco anormal y signos de edema. Para determinar la gravedad y el pronóstico de la CHF y caracterizar con mayor claridad una condición de un paciente particular, se necesitan otras pruebas diagnósticas.

55 Las pruebas que ilustran con más detalle la condición mecánica del corazón son con frecuencia útiles, tales pruebas incluyen, pero no se limitan a ellas, la prueba de esfuerzo, electrocardiograma, angiografía con radionúclidos, ecocardiografía, radiografía de tórax y angiografía. La ecocardiografía se considera actualmente una importante prueba de diagnóstico para la CHF. Mediante el uso de ultrasonidos para proporcionar imágenes de los latidos del corazón en tiempo real, se puede determinar fácilmente la función valvular y el flujo sanguíneo a través del corazón.

La función sistólica y diastólica, o alguna combinación de las mismas, se pueden determinar por medio de una ecocardiografía.

Las pruebas de laboratorio entre las que se incluyen, pero sin limitarse a ellas, análisis de sangre y de orina son con frecuencia de gran ayuda. Estas pueden indicar anomalías en la función hepática, la función renal, los niveles de colesterol, los niveles de azúcar en la sangre, los niveles de hemoglobina, los niveles de hormonas tiroideas y ANP, BNP, pro-ANP, pro-BNP.

Los métodos de diagnóstico para diagnosticar y distinguir la CHF, como se señaló anteriormente, requieren numerosos pasos, una tecnología cara y un personal capacitado para su realización y su posterior análisis. Los pacientes pueden también estar expuestos al riesgo de la radiación procedente de estudios nucleares o procedimientos invasivos, como el cateterismo cardíaco. Si pudiese proporcionarse un método y un dispositivo para distinguir y diagnosticar la CHF mediante una prueba simplificada de un líquido corporal, cuyos resultados pudiesen ser interpretados por un no profesional, se satisfaría una necesidad existente desde hace mucho tiempo.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANTERIOR

En la bibliografía está bien documentado que en la aurícula del corazón humano existen varios péptidos que poseen la capacidad de regular parámetros de los fluidos extracelulares normales, incluyendo el volumen y la presión del líquido en los vasos sanguíneos. Estos péptidos se denominan péptidos natriuréticos auriculares (ANP por sus siglas en inglés). El péptido natriurético cerebral o BNP es un péptido aislado inicialmente del cerebro del cerdo y de ello se deriva el nombre BNP (Sudoh et al., Nature, 332:78-81, 1988). En las personas, este péptido es sintetizado por las células del cerebro y miocárdicas, y circula en el torrente circulatorio ejerciendo profundas influencias en el corazón y los riñones. El péptido BNP está relacionado estructuralmente con la familia ANP de péptidos y está presente en cantidades significativamente menores en la circulación. La aparición de pro-BNP se ha correlacionado con la progresión de la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, la molécula activa es BNP que se ha encontrado que es beneficiosa para el corazón con insuficiencia. Es concebible que el daño al músculo cardíaco puede dar lugar a un procesamiento ineficaz de la pro-BNP inactiva para dar BNP activa (lo que justifica el aumento de la pro-BNP observado). Sin embargo, debido a la incapacidad de los tejidos cardíacos para procesar la pro-BNP dando BNP, no hay ningún efecto beneficioso a menos que la molécula activa (BNP) se administre externamente.

Además de los cambios en pro-BNP/BNP durante la insuficiencia cardíaca, un aumento de la troponina cardíaca I se correlaciona bien con el daño del tejido cardíaco y parece ser un buen factor de predisposición de muerte debida a una insuficiencia cardíaca. Durante el daño celular y la muerte cardíaca, el contenido celular se libera en el torrente circulatorio. Se ha demostrado que la Troponina I cardíaca es un marcador diagnóstico específico del daño de las células cardíacas (Circulation 83, 902-912 (1991); Clin Chem. 40, 1291-1295 (1994); Clin Chem. 41, 312-317 (1995)).

La patente de EE.UU. n° 6.162.902 que lleva el título "Anticuerpos específicos para BNP humana" proporciona reactivos y ensayos para la cuantificación de hBNP en muestras de fluidos biológicos tales como plasma o suero.

La patente de EE.UU. n° 5.795.725 que lleva el título "Métodos para el ensayo de Troponina I y T y selección de autoanticuerpos para su uso en inmunoensayos" describe ensayos y anticuerpos para la detección y cuantificación de la troponina I y troponina T cardíaca específica en los fluidos corporales como indicador del infarto de miocardio.

El autor de la presente invención ha obtenido previamente las patentes de EE.UU. Nos. 5.747.274 y 5.604.105, con el título "Método y dispositivo para diagnosticar y distinguir el dolor en el pecho en el inicio temprano del mismo", cuyo contenido se incorpora como referencia. La patente 5.747.274 enseña una prueba diagnóstica, y un dispositivo para la realización de la prueba, para establecer si el dolor de pecho del paciente tiene un origen cardíaco y para diferenciar entre la angina inestable y el infarto de miocardio como causa de dolor de pecho del paciente. La prueba diagnóstica comprende detectar simultáneamente al menos tres marcadores cardíacos seleccionados con el uso de al menos tres pares diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales, cada miembro de los cuales es complementario para un marcador diferente, que es liberado por el músculo cardíaco en etapas variables después de la aparición del dolor en el pecho y es indicativo de la causa del dolor de pecho. La Troponina-I se describe como un marcador isquémico cardíaco específico.

Además, la patente de EE.UU. n° 5.290.678 de Jackowski que lleva por título "Kit de diagnóstico para diagnosticar y distinguir dolor torácico en el inicio temprano del mismo", el contenido de las cuales se incorpora aquí como referencia, describe un kit de prueba de diagnóstico para evaluar si dolor en el pecho del paciente es de origen cardíaco y para diferenciar entre la angina inestable y el infarto de miocardio en la aparición temprana de dolor en el pecho del paciente. El kit de ensayo comprende un receptáculo para recibir y retener una muestra de sangre o suero del paciente y al menos tres anticuerpos monoclonales o policlonales suspendidos en un soporte. Cada anticuerpo es complementario de una proteína diferente liberada por el músculo cardíaco durante las primeras etapas de un infarto de miocardio y tiene los reactivos correspondientes que responden independientemente a cada anticuerpo

que reacciona a la proteína complementaria. La respuesta combinada de reactivos indica la condición diagnóstica del paciente.

5 Ishii et al., Circulation, vol. 110, nº 18S, 1999, p. 1.679, Res. nº 3579, investigan el significado de cTnT, TnI, ANP y BNP como factores de predicción en la estratificación del riesgo de pacientes que padecen insuficiencia cardiaca congestiva. El estudio sugiere que la combinación de valores de admisión de TnT y BNP es valiosa para evaluar el riesgo en pacientes de CHF.

Tsutamoto et al., Circulation vol. 96/2, 15.7.1997, p. 509-516 investigan la relación entre BNP o ANP y la mortalidad en pacientes que padecen de insuficiencia cardiaca congestiva crónica.

10 La técnica anterior no logra enseñar ni sugiere el uso combinado de un marcador de lesión en las células, p. ej. la troponina I cardiaca y un marcador relacionado con la sobrecarga de volumen o de presión, p. ej. un marcador de adaptación tal como un péptido natriurético, p. ej. pro-ANP, para proporcionar un dispositivo de prueba para predecir y/o distinguir la insuficiencia cardiaca congestiva, ni sugiere que la combinación de estos marcadores biológicos podría proporcionar tanto una herramienta retrospectiva para el diagnóstico del mecanismo subyacente de la insuficiencia cardiaca como un dispositivo analítico para la monitorización de la progresión de la enfermedad y la eficacia de los agentes terapéuticos.

SUMARIO DE LA INVENCION.

20 La presente invención se reduce a practicar el concepto de la utilización conjunta de marcadores que indican cambio de presión, volumen y estrés en un órgano particular (p. ej. pro-ANP en tejido cardiaco) junto con marcadores que son indicadores de daño a los tejidos (p. ej. troponina cardiaca I del tejido cardiaco), así como marcadores de fibrosis, como una herramienta de diagnóstico para diagnosticar con precisión y rapidez la condición del órgano enfermo. Aunque este concepto es aplicable a numerosos órganos y sistemas de órganos, esta solicitud ilustrará el concepto de utilización conjunta de marcadores con respecto al corazón.

25 La troponina I cardiaca y BNP (pro-BNP) han sido utilizados con anterioridad como marcadores indicadores de daños en el tejido cardiaco y sobrecarga de volumen y de presión, y estrés en el corazón, respectivamente. Sin embargo, ni estas moléculas ni ningún otro péptido natriurético, p. ej. pro-ANP, se han utilizado conjuntamente como herramienta de diagnóstico para diagnosticar con precisión y rapidez la condición del corazón enfermo.

30 La presente invención proporciona la base científica para el desarrollo de un ensayo inmunológico que tiene potencial para 1) reemplazar técnicas de diagnóstico por imagen caras y que precisan mucho tiempo de forma que la intervención terapéutica apropiada pueda ser proporcionada al paciente poco tiempo después de haber llegado a urgencias, y 2) proporcionar un medio simplificado para diagnosticar, distinguir y cuantificar el riesgo de mortalidad debido a la insuficiencia cardiaca crónica.

De acuerdo con esta invención, la expresión "daño celular" se define incluyendo cualquier menoscabo transitorio de la función de las células, y/o la muerte celular o necrosis como resultado de la agresión o la apoptosis.

35 De acuerdo con esta invención, la expresión "adaptación del órgano" se refiere a los cambios en el órgano, como consecuencia de o en respuesta a la sobrecarga de presión o volumen, estiramiento, hipertrofia, estrés de la pared, y factores fisiológicos similares como producen tensión en el órgano.

Una remodelación incluyendo fibrosis del miocardio (aumento de cTnI) o adaptación (aumento de péptido natriurético) del músculo del corazón puede acompañar a la progresión de la CHF. Actualmente, todos estos cambios en el corazón son evidentes tan sólo usando costosas técnicas de formación de imágenes del corazón.

40 En consecuencia, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método analítico, bien sea a través de un laboratorio central, o una prueba de ambulatorio, p. ej. un ensayo de formato rápido, realizado sobre un fluido biológico para predecir la mortalidad cardiaca en un paciente de insuficiencia cardiaca congestiva crónica, siendo posible obtener el resultado de dicha prueba sin un adiestramiento especial.

45 Otro objetivo descrito es una prueba capaz de descartar pacientes de alto riesgo con insuficiencia cardiaca congestiva, permitiendo así un uso más eficaz de los recursos médicos.

Método para predecir la mortalidad cardiaca en un paciente con insuficiencia cardiaca congestiva crónica, comprendiendo dicho método las etapas de:

(A) analizar la presencia de un marcador cardiaco de lesión celular en una muestra de fluido corporal extraída de dicho paciente, usando:

un primer anticuerpo que se une específicamente a un marcador cardiaco de lesión celular, en donde dicho marcador cardiaco de lesión celular es Troponina 1 cardiaca; y

(B) analizar la presencia de un marcador de adaptación del órgano en una muestra de fluido corporal extraída de dicho paciente, usando:

5 un segundo anticuerpo que se une específicamente a dicho marcador de adaptación del órgano, en donde dicho marcador de adaptación del órgano es ANP N-terminal,

en donde cuando dicho marcador de lesión celular así como dicho marcador de adaptación del órgano están presentes en dicha muestra en concentraciones significativamente mayores en comparación con las muestras testigo de individuos normales, se predice que dicho paciente tiene un mayor pronóstico de mortalidad cardiaca.

10 Otros objetos y ventajas de esta invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos en los que se exponen, a título de ilustración y ejemplo, ciertas realizaciones de esta invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Durante muchos años se ha sabido que, durante un episodio cardiaco, el tejido del corazón libera ciertas moléculas, típicamente moléculas de proteínas que son características del episodio. Algunas de ellas son liberadas como consecuencia tanto de UA como de MI, otras son liberadas como consecuencia del MI. Se ha sugerido que estos marcadores, que con frecuencia se denominan analitos, sean empleados en reacciones antígeno/anticuerpo para reconocer la causa de un episodio cardiaco.

Sensibilidad y especificidad.

20 "Sensibilidad", como se usa en el presente texto, se refiere a la capacidad de un anticuerpo para reconocer y reaccionar con su antígeno analito cuando el analito está presente a una concentración muy baja en una mezcla, es decir, sangre, suero, plasma u otro preparado sanguíneo cuando esa mezcla contiene un número de otros componentes relativamente grande. La sensibilidad en reacciones antígeno/anticuerpo se consigue principalmente usando anticuerpos con alta afinidad para sus antígenos.

25 "Especificidad" como se usa en el presente texto se refiere (a) a la especificidad de un anticuerpo para un analito, es decir, no hay reacción cruzada, o hay una reacción mínima, del anticuerpo con otros materiales presentes en la muestra sometida a la prueba, y (b) a la especificidad de la fuente del anticuerpo, es decir, se originó en el tejido cardiaco o en algún otro tejido y por consiguiente facilita el diagnóstico.

30 Estos tipos diferentes de sensibilidad se denominarán en el presente texto como "sensibilidad a la lesión celular", es decir, los anticuerpos reconocen marcadores de lesiones de células, y "sensibilidad a la adaptación del órgano", es decir, los anticuerpos se originan a partir de un tejido específico y por consiguiente permiten un diagnóstico correcto y rápido. En otras palabras, son específicos del tejido. Si se originan solamente a partir de tejido del corazón, son específicos cardíacos.

35 Se conocen muchos marcadores para los cuales se han producido o se pueden producir anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, por procedimientos bien conocidos por un profesional experto en la técnica. Muchos de ellos no son específicos del tejido. Se originan no solo en el tejido del corazón, sino también en el músculo o en otro tejido del cuerpo. Su sensibilidad al tejido no es sensibilidad cardiaca.

40 Los ensayos de acuerdo con la invención se pueden llevar a cabo en ambulatorio por personal capacitado médicamente. Por ejemplo, los trabajadores de servicios médicos de urgencia pueden llevar a cabo un ensayo de la invención en el sitio de una urgencia médica o en la ambulancia camino al hospital. De un modo similar, el personal médico de la sala de urgencias, de las instalaciones de atención cardiaca o de otro punto ambulatorio de un hospital pueden realizar por sí mismos una prueba de la presente invención. Naturalmente y cuando sea apropiado clínicamente, puede ser proporcionada la muestra del paciente, tal como sangre o cualquier hemoderivado, plasma o suero, u orina a un laboratorio del hospital para realizar la prueba.

45 La invención se extiende al uso de materiales de ensayo incluyendo los reactivos en forma de estuche o kit para la práctica del método de la invención. Los materiales comprenden los materiales compañeros de unión que son específicos para los marcadores sometidos a detección, y en una realización, comprenden el anticuerpo o los anticuerpos, cada uno de los cuales es específico para cada uno de los marcadores, cuya presencia se ha de determinar.

50 En una realización ilustrativa, un anticuerpo de cada par específico para un marcador en concreto es inmovilizado de forma irreversible sobre un soporte sólido; en adelante este anticuerpo se denomina alternativamente como

anticuerpo de captura. El otro anticuerpo específico para el mismo marcador está etiquetado, y es capaz de moverse con una muestra hasta la localización en el soporte sólido del anticuerpo de captura. Este anticuerpo se denomina a veces en el presente texto como anticuerpo de detección.

5 La solicitud se extiende en correspondencia a dispositivos para llevar a cabo los ensayos, es decir, un dispositivo para la determinación temprana del riesgo de mortalidad cardiaca. El dispositivo comprende un estuche que contiene una unidad de membrana o sección, con una sección de detector y una sección de captura, preferiblemente con una sección de filtro. La sección de detector contiene al menos un anticuerpo detector específico para un epítipo en cada uno de los marcadores que se han de ensayar en una muestra de sangre, suero o plasma del paciente. La sección de captura contiene al menos un anticuerpo de captura específico para otro epítipo de cada uno de los marcadores que se han de detectar. La sección de captura está situada en posición distal a la posición de la sección de detector, en donde los anticuerpos de captura están inmovilizados irreversiblemente en la sección de captura, los anticuerpos detectores están inmovilizados reversiblemente en la sección de detector y migran con la muestra a la sección de captura, cuando se está usando el dispositivo. Los anticuerpos detectores pueden ser etiquetados adecuadamente para dar una reacción medible cuando el marcador está presente y está unido de acuerdo con el procedimiento de esta invención.

La unión del compañero de unión o anticuerpo a su antígeno cognado, el marcador, en una muestra se puede detectar por otros medios de detección, tales como la detección óptica, los biosensores, los formatos de inmunoensayo homogéneos, y similares. Sistemas de sensores ópticos particulares y los correspondientes dispositivos se contemplan y se discuten en la patente de EE.UU. n. 5.290.678.

20 Como se utiliza en el presente texto, el término "marcador" se refiere a una proteína u otra molécula que es liberada de un órgano durante un episodio de lesión celular o un episodio de adaptación del órgano. Tales marcadores incluyen, pero sin limitarse a ellos, proteínas o isoformas de proteínas que son exclusivas para el músculo del corazón, y/o proteínas o isoformas de las mismas que se encuentran en otros tejidos distintos del músculo cardiaco.

25 Los marcadores de la presente invención son liberados en la sangre. Así pues, la invención contempla la evaluación del nivel de los marcadores en la sangre, o cualquier producto hemoderivado que los contiene, tales como, pero sin limitarse a ellos, plasma, suero, sangre citolisada (p. ej. por tratamiento con tampón hipotónico o detergentes; véase, p. ej., la publicación de Patente Internacional N ° WO 92/08981, publicada el 29 de mayo 1992), y diluciones y preparados de los mismos.

30 El término "superior al normal" o "por encima del umbral" se usa en el presente texto para referirse a un nivel de un marcador que es mayor que el nivel del marcador observado en individuos normales. Para algunos marcadores, pueden no estar presentes niveles de los marcadores, o que estos niveles sean infinitesimalmente bajos. Para otros marcadores, se pueden presentar normalmente niveles detectables en la sangre. Así, los términos contemplan además un nivel que está significativamente por encima del nivel encontrado en los pacientes. El término "significativamente" se refiere a significación estadística, y generalmente quiere decir que está presente al menos un nivel dos veces mayor de marcador. Sin embargo, la diferencia significativa entre los niveles de los marcadores depende de la sensibilidad del ensayo empleado, y debe tenerse en cuenta para cada ensayo de marcador.

40 Los marcadores que pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención son moléculas, típicamente proteínas, que atraviesan las células del órgano a medida que las células se van dañando o que tiene lugar una adaptación, como se define en las reivindicaciones anexas. Estas proteínas pueden estar en forma nativa o bien pueden ser fragmentos de la proteína detectables inmunológicamente, resultando, p. ej., de la digestión fotolítica de la proteína. Cuando se usan los términos "marcador" o "analito", se entiende que incluyen fragmentos del mismo que pueden ser detectados inmunológicamente. Por "detectable inmunológicamente" se entiende que los fragmentos de proteína contienen un epítipo que es reconocido específicamente por un anticuerpo cognado.

A continuación se exponen en la Tabla 1 ejemplos de marcadores de lesión celular/necrosis.

45 TABLA 1

- Troponina-T
- Troponina-I
- MLC-1
- MLC-2
- 50 Glucógeno fosforilasa BB
- Ca ATP-asa
- Fosfolamban
- Cadena pesada de miosina
- Actina
- 55 Tropomiosina

- Calmodulina
- Caldesmon
- Fosfolamban fosfatasa
- Calsecuestrina
- 5 Adenosina de bombeo de Ca⁺⁺ trifosfatasa
- ATP-asa de transporte de Ca⁺⁺
- Adenilato ciclasa
- Proteína cinasa
- 10 Proteína de unión de calcio rica en histidina
- Proteína fosfatasa
- Proteína fosfatasa 2C
- Proteína de unión de calcio de alta afinidad
- Unión de lipoproteínas de baja densidad
- 15 proteína del retículo sarcoplásmico
- proteasa que requiere Ca⁺⁺ (m-calpaína)
- Piruvato deshidrogenada

Ejemplo

20 La troponina cardiaca I (cTnI) ha sido validada como marcador sensible y específico de daño a los miocitos y como factor de predicción de episodios adversos en síndromes coronarios agudos. También se ha publicado que la cTnI es elevada en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva. Del mismo modo, se ha publicado que la pro-ANP es alta en pacientes con CHF. La insuficiencia cardiaca congestiva se caracteriza por respuestas hemodinámicas y neurohumorales a lesiones que resultan en remodelación cardiaca progresiva, fibrosis y apoptosis. Sin embargo, en 25 pacientes con insuficiencia cardiaca crónica, no está claro si hay una relación entre unos niveles elevados de cTnI solos o en combinación con niveles elevados de pro-ANP, y la supervivencia. Así pues los autores de la presente invención evaluaron si unos niveles detectables de cTnI estaban asociados con la supervivencia en 221 pacientes con insuficiencia cardiaca crónica. Además, los autores de la presente invención evaluaron si los niveles de cTnI conjuntamente con los niveles de pro-ANP eran más predictivos de supervivencia que cada marcador individualmente. Estos pacientes fueron clasificados como Clase III o Clase IV mediante las normas NYHA. Los 30 criterios para la inclusión en el estudio fueron: insuficiencia cardiaca sintomática de la New York Heart Association (NYHA) clase III y IV; fracción de eyección ventricular izquierda ≤ 35% mediante ventriculografía con radionúclidos o ecocardiografía, tratamiento con digital, diuréticos e inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina ≤ 60 días; y el consentimiento informado. Los criterios para la exclusión fueron: miocardiopatía restrictiva, enfermedad cardiaca valvular primaria, consideración para trasplante de corazón, historial de infarto de miocardio agudo, cirugía de injerto de by-pass de arteria coronaria u otra cirugía cardiaca ≤ 60 días, angina inestable limitante de síntomas o ataque de angina ≥ 3 por semana, e historia de arritmias ventriculares sintomáticas. Otros criterios de exclusión fueron la terapia antiarrítmica de tipo I en curso, el uso concomitante de bloqueantes del canal del calcio o hidralazina, el uso de β-agonistas inhalados ≥ a una vez por semana, el uso de inotrópicos no digitálicos orales o intravenosos más de una semana antes de la evaluación de base, enfermedades pulmonares o sistémicas graves, 40 enzimas hepáticas más de 2 veces el límite superior de lo normal, y una creatinina en suero ≥ 270 μmol/L. El análisis conjunto de cTnI y pro-ANP dio los resultados que siguen.

Insuficiencia Cardiaca Congestiva¹: Tasas de mortalidad cardiaca basadas en los niveles de ANP² y cTnI³

	* ANP + ve	cTnI + ve	** ANP -ve/cTnI-ve
Fallecidos	18 (29%)	10 (38%)	18 (13%)
Vivos	44 (71%)	16 (62%)	124 (87%)

45 Estadística:

- 1. ANP + ve vs. ANP - ve/cTnI-ve chi-cuadrado de Pearson = 7,944 p = 0,0048 RR = 1,91 (CI 1,262 - 2,887)
- 2. cTnI + ve vs. ANP - ve/cTnI-ve chi-cuadrado de Pearson = 10,52 p = 0,0011 RR = 3,13 (CI 1,586 - 6,1558)
- 3. cTnI + ve vs. ANP + ve chi-cuadrado de Pearson = 1,818 p = 0,1775

	* ANP + ve / cTnI + ve	** ANP-ve / cTnI-ve	ANP + ve / cTnI-ve	ANP-ve / cTnI + ve
Fallecidos	5 (55%)	18 (13%)	13 (24%)	5 (29%)
Vivos	4 (45%)	124 (87%)	40 (76%)	12 (71%)

*ANP \geq 3000 pmol / L cTnI + ve - \geq 0,1 μ g / L
 **ANP < 3000 pmol / L cTnI-ve - < 0,1 μ g / L

- 5 ¹ Insuficiencia cardiaca Clase III y IV
 ² Péptido natriurético auricular N-terminal
 ³ Troponina I cardiaca

Estadísticas:

- 10 1. ANP + ve / cTnI + ve vs. ANP -ve/cTnI-ve chi-cuadrado de Pearson = 12,052 p = 0,0005 RR = 6,96 (CI 2,018 – 23,981)
 2. ANP + ve / cTnI + ve vs. ANP+ ve / cTnI-ve chi-cuadrado de Pearson = 3,59 p = 0,0579 RR = 3,06 (CI 0,925 – 10,094)
 3. ANP + ve / cTnI + ve vs. ANP -ve/cTnI + ve chi-cuadrado de Pearson = 1,699 p = 0,1923
 4. ANP + ve / cTnI-ve vs. ANP -ve/cTnI-ve chi-cuadrado de Pearson = 4,055 p = 0,0440 RR = 1,72 (CI 1,0489 - 2,818)
 15 5. ANP -ve/cTnI + ve vs. ANP -ve/cTnI-ve chi-cuadrado de Pearson = 3,437 p = 0,0637 RR = 2,46 (CI 0,9881 – 6,3393)

20 Los autores de la presente invención han realizado un análisis de regresión lineal simple de los niveles de cTnI en los niveles de pro-ANP. Encontraron que el valor de R2 para dos experimentos distintos y su combinación era 0,0002. La relación F para el modelo fue 0,06. La probabilidad asociada con el modelo fue 0,80. Así pues, los autores de la presente invención no encontraron ninguna evidencia de que los niveles de cTnI fueran dependientes significativamente de los niveles de pro-AN P.

Así pues, se considera que los niveles de cTnI y pro-ANP son independientes entre sí en la predicción de las tasas de mortalidad según el análisis de regresión lineal, y se llega a la conclusión de que puede obtenerse más información pronóstica relacionada con la CHF observando los marcadores conjuntamente y no individualmente.

25 Como se usa en el presente texto, el término anticuerpo incluye anticuerpos policlonales y monoclonales de cualquier isotipo (IgA, IgG, IgE, IgD, IgM), o una porción de unión con antígeno del mismo, incluyendo pero sin limitarse a ellos fragmentos F(ab) y Fv, anticuerpos de cadena individual, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y una genoteca de expresión de Fab.

30 Los anticuerpos útiles como anticuerpos detectores y de captura en la presente invención, se pueden preparar mediante métodos estándar bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos se pueden utilizar en cualquier tipo de inmunoensayo. Esto incluye tanto el ensayo en sándwich de dos lados y el inmunoensayo de lado único del tipo no competitivo, así como en ensayos de unión competitiva tradicionales.

35 Particularmente preferido, por su facilidad y simplicidad de detección, y su naturaleza cuantitativa, es el ensayo en sándwich o de doble anticuerpo del cual existen algunas variantes, todas las cuales están contempladas por la presente invención. Por ejemplo, en un ensayo en sándwich típico, el anticuerpo no marcado se inmoviliza sobre una fase sólida, p. ej. una placa de microtítulo, y se añade la muestra que se ha de ensayar. Después de un cierto período de incubación para permitir la formación de un complejo anticuerpo-antígeno, se añade un segundo anticuerpo, marcado con una molécula informadora capaz de inducir una señal detectable, y se continúa la incubación para permitir un tiempo suficiente para la unión con el antígeno en un sitio diferente, resultando con una formación de un complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. La presencia del antígeno se determina mediante la observación de una señal que se puede cuantificar mediante la comparación con muestras testigo que contienen cantidades conocidas de antígeno.

45 Los ensayos pueden ser ensayos competitivos, ensayos en sándwich, y el marcador puede ser elegido entre el grupo de marcadores bien conocidos tales como la tecnología de radioinmunoensayo, inmunoensayo fluorescente o de quimioluminiscencia, o immuno PCR. No se requiere aquí una extensa discusión de las técnicas de inmunoensayo conocidas, ya que estas son conocidas por los expertos en la técnica. Véase Takahashi et al. (Clin Chem 1999, 45 (8): 1307) para el ensayo de S100B.

Aun sin desear limitarse a ninguna forma de realización particular, se conoce el formato de panel ejemplificado en el presente texto y es comercialmente disponible. El formato de panel es similar a un formato que actualmente se está usando en asociación con la prueba de embarazo y está disponible comercialmente bajo la marca comercial BIOSIGN.

- 5 Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta memoria descriptiva son indicadoras de los niveles de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

- 10 Se ha de entender que, aun cuando se ilustra una cierta forma de la invención, ésta no se ha de limitar a la forma específica o la disposición que se describe y se muestra en el presente texto. Será evidente para los expertos en la técnica que pueden hacerse varios cambios sin apartarse del alcance de la invención como se define mediante las reivindicaciones anexas, y la invención no ha de considerarse limitada a lo que se muestra y se describe en la memoria descriptiva.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la mortalidad cardiaca en un paciente con insuficiencia cardiaca congestiva crónica, comprendiendo dicho método las etapas de:

5 (A) analizar la presencia de un marcador cardiaco de lesión celular en una muestra de fluido corporal extraída de dicho paciente, usando:

un primer anticuerpo que se une específicamente a un marcador cardiaco de lesión celular, en donde dicho marcador cardiaco de lesión celular es Troponina-I cardiaca; y

(B) analizar la presencia de un marcador de adaptación del órgano en una muestra de fluido corporal extraída de dicho paciente, usando:

10 un segundo anticuerpo que se une específicamente a dicho marcador de adaptación del órgano, en donde dicho marcador de adaptación del órgano es ANP N-terminal,

en donde cuando dicho marcador de lesión celular así como dicho marcador de adaptación del órgano están presentes en dicha muestra en concentraciones significativamente mayores en comparación con las muestras testigo de individuos normales, se predice que dicho paciente tiene un mayor pronóstico de mortalidad cardiaca.

15 2. El método según la reivindicación 1, en donde dicho fluido corporal se elige entre el grupo consistente en sangre, un hemoderivado, plasma o suero.

3. El método según la reivindicación 2, en donde dicho fluido corporal es suero o plasma.

20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichos ambos ensayos, para la presencia de un marcador cardiaco y para la presencia de un marcador de adaptación del órgano, comprenden las etapas de:

(a) depositar dicha muestra en una ventana de muestras de un kit para ensayo de diagnóstico,

25 en donde dicho kit para ensayo comprende un panel frontal que comprende la ventana de muestra y una ventana de presentación; un panel posterior; y una membrana química seca fijada entre los paneles frontal y posterior situada para la presentación en al menos la ventana de presentación, en donde dicha membrana comprende:

una región de muestra situada para recibir la muestra de la ventana de muestra,

una región de control, y

al menos un primer par de anticuerpos y un segundo par de anticuerpos situado en posiciones discretas junto con dicha membrana entre la región de muestra y región de control,

30 comprendiendo cada uno de dichos pares de anticuerpos un miembro de reactivo de anticuerpo y un miembro de anticuerpo de captura inmovilizado, estando situado cada miembro de anticuerpo de captura en dicha membrana más cerca de la región de control que el correspondiente miembro de anticuerpo de captura, teniendo cada miembro de reactivo de anticuerpo un resto medible u observable marcado o unido químicamente al mismo, en donde el miembro de reactivo de anticuerpo de dicho primer par de anticuerpos es dicho primer anticuerpo que se une específicamente a un marcador cardiaco de lesión celular, y el miembro de reactivo de anticuerpo de dicho segundo par de anticuerpos es dicho segundo anticuerpo que se une específicamente a un marcador de adaptación del órgano,

40 de forma que el marcador cardiaco de lesión celular y el marcador de adaptación del órgano presentes en la muestra migrarán hacia la región de control, se unen al par de anticuerpos cognados y producen una señal proporcional a la concentración de cada marcador en la muestra, y

(b) visualizar o medir el resto marcado o unido químicamente a dicho primer anticuerpo y dicho segundo anticuerpo para detectar la presencia de cada marcador en dicha muestra.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho marcador cardiaco de lesión celular y dicho marcador de adaptación del órgano están presentes en dicha muestra a niveles que son dos veces mayores que las muestras de control.

5 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las etapas (A) y (B) se llevan a cabo al mismo tiempo.