

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 556**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2005 E 05751639 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1759214**

54 Título: **Utilización de hormonas cardíacas para diagnosticar el riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de medicamentos cardiotoxicos**

30 Prioridad:

**15.06.2004 EP 04013954**

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

**03.09.2013**

73 Titular/es:

**F.HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**HESS, GEORG y  
HORSCH, ANDREA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 421 556 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Utilización de hormonas cardíacas para diagnosticar el riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de medicamentos cardiotoxicos

5 La presente invención está relacionada con el diagnóstico del riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de medicamentos cardiotoxicos.

10 Un objetivo de la medicina moderna es proporcionar regímenes de tratamiento personalizado o individualizado. Estos regímenes de tratamiento tienen en cuenta las necesidades o riesgos individuales de un paciente. Un riesgo particularmente importante es la presencia de complicaciones cardiovasculares, concretamente una complicación cardiovascular no identificada.

15 Las complicaciones cardiovasculares, concretamente las enfermedades cardíacas, son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el hemisferio occidental. Es conocido que las complicaciones cardiovasculares pueden ocurrir como resultado de ciertas medicaciones, por ejemplo el tratamiento con antraciclina, que posee efectos cardiotoxicos. En muchos casos, el riesgo asociado con los medicamentos cardiotoxicos limita su dosis.

20 La utilización de péptidos natriuréticos como marcadores moleculares o bioquímicos es conocida como tal. En la WO 02/089657, se ha sugerido la determinación del péptido natriurético cerebral (BNP) para diagnosticar el infarto de miocardio. En la WO 02/083913 se ha sugerido utilizar el BNP para predecir la morbilidad o mortalidad a corto plazo en pacientes con fallo cardíaco congestivo, infarto de miocardio, infarto de miocardio con ST elevado, o síndromes coronarios agudos sin ST elevado.

25 Suzuki et al. Han investigado si las antraciclinas pueden influenciar la concentración en plasma de BNP (Suzuki, T., et al. (1998). Elevated B-type natriuretic peptide levels after anthracycline administration. American Heart Journal, vol. 136(2), págs. 362-363.). El estudio sugiere la posible utilización de los niveles de BNP para valorar el estado cardíaco tras la administración de antraciclina. De acuerdo con su interpretación, los niveles de BNP muy probablemente reflejan la tolerancia cardíaca al agente cardiotoxico.

30 Okumura et al. Investigaron si el BNP podía utilizarse como indicador de cardiotoxicidad en pacientes con leucemia aguda tratada con un régimen que contenía daunorubicina (Okumura, H., et al. (2000). Brain natriuretic peptide is a predictor of anthracycline-induced cardiotoxicity. Acta Haematologica, vol. 104, págs. 158-163). Los autores concluyen que sus resultados preliminares sugieren que el BNP puede ser útil como indicador temprano y sensible a la cardiotoxicidad inducida por la antraciclina.

35 Sin embargo, el valor del BNP como marcador diagnóstico en el contexto de la cardiotoxicidad todavía está sujeto a debate. Una revisión reciente cuestiona si el BNP puede utilizarse para monitorizar la cardiotoxicidad relacionada con los fármacos (Mohideen, M.R. (2002), Brain natriuretic peptide is more than a marker. Ceylon Medical Journal, vol. 47(3), págs. 81-82). Otra revisión reciente, publicada tres la revisión anteriormente mencionada, llega a la conclusión de que no existen "datos alentadores" referentes al diagnóstico temprano de la disfunción del ventrículo izquierdo utilizando el BNP para diagnosticar la cardiotoxicidad causada por las antraciclinas (Tsekoura, D.K., et al. (2003). Brain natriuretic peptide. Hellenic Journal of Cardiology, vol. 44, págs. 266-270).

45 El papel del NT-proBNP en el diagnóstico de la cardiotoxicidad mediada por las antraciclinas no se ha sometido a investigación.

Además, las investigaciones previas están relacionadas sólo con la utilización potencial del BNP para monitorizar la cardiotoxicidad, es decir la cardiotoxicidad causada por un fármaco después de que el tratamiento se haya iniciado.

50 Sin embargo, sería preferible si pudiera identificarse el riesgo de los pacientes incluso antes de que recibieran los medicamentos cardiotoxicos. Es importante darse cuenta de que las complicaciones cardiovasculares pueden permanecer de forma asintomática durante largos periodos de tiempo. Por lo tanto, un diagnóstico fiable de la presencia de una complicación cardiovascular es más difícil y con mayor tendencia a los errores de lo que generalmente se cree (Svendstrup Nielsen, L., et al. (2003). N-terminal pro-brain natriuretic peptide for discriminating between cardiac and non-cardiac dyspnoea. The European Journal of Heart Failure).

60 Actualmente, solo los pacientes con un historial previo de enfermedad cardíaca o hipertensión se someten a una mayor monitorización en caso de un tratamiento con medicamentos cardiotoxicos. En particular, los médicos de atención primaria y los no cardiólogos no poseen métodos simples para identificar un problema cardiovascular no identificado previamente.

65 Por lo tanto, existe la necesidad de un método o medio para identificar los pacientes de riesgo antes de que reciban medicamentos cardiotoxicos. Concretamente, existe la necesidad de proporcionar un método de diagnóstico adecuado. Concretamente, existe la necesidad de un método de diagnóstico que permita identificar los pacientes de riesgo que no tienen un historial de complicaciones cardiovasculares. En particular, los métodos diagnósticos deben

ser simples, rápidos, fiables y adaptados a su uso por los médicos de atención primaria y los no cardiólogos. De acuerdo con ello, es el objeto de la presente invención proporcionar tales medios y métodos.

5 El objeto de la invención se alcanzó mediante un método para diagnosticar el riesgo de un paciente de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de medicamentos cardiotoxicos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende los pasos de

a) determinar *in vitro* el nivel de NT-pro BNP del paciente;

10 b) diagnosticar el riesgo del paciente comparando el nivel determinado con los niveles conocidos asociados con los diferentes grados de riesgo en un paciente.

El método también puede comprender el paso de tomar una muestra de un fluido corporal o tejido del paciente.

15 El objeto de la invención también se alcanzó mediante la utilización de medios diagnósticos para la *determinación in vitro* del nivel de NT-pro BNP del paciente para diagnosticar el riesgo del paciente de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de medicamentos cardiotoxicos de acuerdo con la reivindicación 10. Preferiblemente el nivel se determinó en una muestra de fluido corporal o tejido del paciente.

20 La presente invención proporciona métodos simples y económicos de cribar el riesgo de los pacientes, que están recibiendo o van a recibir medicamentos cardiotoxicos, de desarrollar una complicación cardiovascular como consecuencia de dichos medicamentos cardiotoxicos. La presente invención también proporciona los niveles de NT-pro BNP que indican la existencia o gravedad de una complicación cardiovascular en pacientes con o sin síntomas obvios de una complicación cardiovascular.

25 La presente invención también permite adaptar la dosis de un fármaco al riesgo de un paciente. Para muchos fármacos cardiotoxicos, por ejemplo las antraciclinas, es preferible empezar con la dosis más elevada posible. Sin embargo, adaptar la dosis de un fármaco puede ser difícil o incluso imposible una vez se ha iniciado el tratamiento. Por lo tanto, para minimizar el riesgo de complicaciones cardiovasculares, con frecuencia se escoge una dosis del fármaco cardiotoxico que es demasiado baja para obtener el beneficio terapéutico óptimo. Como la presente invención permite el diagnóstico o valoración del riesgo antes de iniciar el tratamiento, la dosis de los medicamentos cardiotoxicos puede optimizarse, concretamente aumentarse, para maximizar el beneficio terapéutico en cada paciente mientras se evitan las complicaciones cardiovasculares.

30 Por lo tanto, la presente invención permite una decisión cuidadosa e informada sobre si se deben utilizar los medicamentos cardiotoxicos, la dosis de los mismos, y/o la organización de un tratamiento acompañante o monitorización adecuados.

35 La presente invención es ventajosa concretamente para los médicos de atención primaria, los especialistas y los consultes especializadas, departamentos o clínicas que frecuentemente no tienen acceso a los exámenes extensivos cardiológicos de un cardiólogo. La presente invención proporciona los medios y métodos para estos no cardiólogos para un cribado simple y fiable de los pacientes, en aquellos pacientes que están en riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de medicamentos cardiotoxicos.

40 La invención toma ventaja de ciertos marcadores bioquímicos o moleculares. Los términos "marcador bioquímico" y "marcador molecular" son conocidos para los expertos en la materia. En particular, son marcadores bioquímicos o moleculares los productos de expresión génica que se expresan de forma diferencial (es decir, suprarregulado o infraregulado) en presencia o ausencia de cierto estado, enfermedad o complicación. Normalmente, un marcador molecular se define como un ácido nucleico (como un mRNA), mientras un marcador bioquímico es una proteína o péptido. El nivel de un marcador bioquímico o molecular adecuado puede indicar la presencia o ausencia del estado, enfermedad o complicación, y por lo tanto permite el diagnóstico.

45 La presente invención toma ventaja concretamente de las hormonas cardíacas, más concretamente la NT-pro BNP, como marcadores bioquímicos. También se considera en el contexto de la presente solicitud tomar ventaja de las combinaciones de cualquiera de las hormonas cardíacas como marcadores bioquímicos.

50 Las hormonas cardíacas de acuerdo con la presente solicitud comprenden la NT-pro BNP y la urotensina.

55 El prepropeptido (134 aminoácidos en el caso del preproBNP) comprende un péptido señal corto, que se elimina por escisión enzimática para liberar el propeptido (108 aminoácidos en el caso del proBNP). El propeptido además se escinde en un propeptido N-terminal (NT-propeptido, 76 aminoácidos en el caso del NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso del BNP, 28 aminoácidos en el caso del ANP).

60 El término "variantes" en este contexto está relacionado con los péptidos sustancialmente similares a dichos péptidos. El término "sustancialmente similar" es bien entendido por los expertos en la materia. En particular, una variante puede ser una isoforma o alelo que posee intercambios de aminoácidos comparado con la secuencia de

- aminoácidos de la isoforma más prevalente del péptido en la población humana. Preferiblemente, tal péptido sustancialmente similar posee una similitud de secuencia con la isoforma más prevalente del péptido de al menos el 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, y lo más preferiblemente de al menos un 95%. También son sustancialmente similares los productos de degradación, por ejemplo los productos de degradación proteolíticos, que siguen siendo reconocidos por el método diagnóstico o por los ligandos dirigidos frente al respectivo péptido completo. El término "variantes" también pretende estar relacionado con las variantes de corte y empalme.
- El término "variante" también está relacionado con un péptido modificado a nivel post-traducciona, como un péptido glucosilado. Una "variante" también es un péptido que se ha modificado tras la recogida de la muestra, por ejemplo, mediante la unión covalente o no covalente de un marcaje, concretamente una señal radiactiva o fluorescente, al péptido.
- Son conocidos los ejemplos de variantes y métodos particulares para su determinación (véase por ejemplo Ala-Kopsala, M., Magga, J., Peuhkurinen, K. et al. (2004): Molecular heterogeneity has a major impact on the measurement of circulating N-terminal fragments of A-type y B-type natriuretic peptides. *Clinical Chemistry*, vol. 50(9), 1576-1588).
- Otras realizaciones de la solicitud incluyen la determinación de diferentes marcadores en combinación, simultáneamente o no simultáneamente. Un ejemplo es la determinación del NT-proBNP, en combinación con un marcador de necrosis cardiaca como la troponina-T, CK-MB o la mioglobina.
- El diagnóstico de acuerdo con la presente invención incluye la determinación, monitorización, confirmación, subclasificación y predicción de una enfermedad, complicación o riesgo relevantes. La determinación está relacionada con ser consciente de una enfermedad, complicación o riesgo. La monitorización está relacionada con el seguimiento de una enfermedad ya diagnosticada o una complicación, por ejemplo para analizar la progresión de la enfermedad o la influencia de un tratamiento particular sobre la progresión de la enfermedad o complicación. La confirmación está relacionada con el refuerzo o establecimiento de un diagnóstico que se ha realizado previamente utilizando otros indicadores o marcadores. La subclasificación está relacionada además con la definición de un diagnóstico de acuerdo con diferentes subclases de la enfermedad diagnosticada, por ejemplo la definición de acuerdo con las formas leves y graves de la enfermedad. La predicción está relacionada con el pronóstico de una enfermedad o complicación antes de que otros síntomas o marcadores sean evidentes o se hayan alterado de forma significativa.
- Los individuos que sufren enfermedades cardiovasculares pueden ser individuos que sufren de angina de pecho estable (APS) e individuos con síndrome coronario agudo (SCA). Los pacientes de SCA pueden mostrar angina de pecho no estable (APNE) o estos individuos han sufrido ya un infarto de miocardio (IM). El IM puede ser un IM con ST elevado o un IM con ST no elevado. La aparición de un IM puede ir seguida de la disfunción ventricular izquierda (DVI). Finalmente, los pacientes con DVI sufren fallo cardiaco congestivo (FCC) con una tasa de mortalidad de aproximadamente un 15 %.
- Las enfermedades cardiovasculares se han clasificado en un sistema de clasificación funcional de acuerdo con la New York Heart Association (NYHA). Los pacientes de clase I no muestran síntomas obvios de enfermedad cardiovascular. La actividad física no está limitada, y una actividad física normal no causa una fatiga indebida, palpitación o disnea (falta de aire). Los pacientes de clase II muestran una ligera limitación de su actividad física. Se sienten cómodos en estado de reposo, pero una actividad física normal resulta en fatiga, palpitación o disnea. Los pacientes de clase III muestran una limitación marcada de la actividad física. Se sienten cómodos en estado de reposo, pero una actividad física inferior a la normal les causa fatiga, palpitación o disnea. Los pacientes de clase IV son incapaces de realizar ninguna actividad física sin malestar. Estos muestran síntomas de insuficiencia cardiaca en reposo. Si se lleva a cabo cualquier actividad física, el malestar aumenta.
- De acuerdo con ello, los pacientes pueden estratificarse en individuos que no muestran síntomas clínicos y aquellos con síntomas (por ejemplo disnea).
- Otra característica de las enfermedades cardiovasculares puede ser la "fracción de eyección ventricular izquierda" (FEVI) que también se conoce como "fracción de eyección". La gente con un corazón sano normalmente posee una FEVI correcta, que se describe generalmente como superior a un 50 %. La mayoría de la gente con una enfermedad cardiaca sistólica que es sintomática generalmente posee una FEVI del 40 % o inferior.
- La presente invención está relacionada con las "complicaciones cardiovasculares" que se desarrollan como consecuencia de los medicamentos cardiotóxicos.
- Una "complicación cardiovascular" de acuerdo con la presente invención está relacionada con cualquier enfermedad o evento cardiovascular. En la medida que la enfermedad o evento cardiovascular causa una complicación secundaria, por ejemplo congestión pulmonar o pulmón congestionado (que puede resultar por ejemplo de una

insuficiencia ventricular izquierda), se entiende que también la complicación secundaria se incluye en el término "complicación cardiovascular".

5 Concretamente, una "complicación cardiovascular" está relacionada con una enfermedad coronaria cardíaca, APS, SCA, APNE, IM, IM con ST elevado, IM con ST no elevado, DVI o FCC.

More concretamente, "complicación cardiovascular" está relacionada con SCA, APNE, IM, IM con ST elevado, IM con ST no elevado, DVI o FCC.

10 Una complicación cardiovascular de acuerdo con la presente invención puede causar síntomas, concretamente síntomas de acuerdo con las clases II-IV de la NYHA, más concretamente de acuerdo con las clases III-IV de la NYHA.

15 Una complicación cardiovascular puede estar asociada con una FEVI del 40% o inferior.

Una complicación cardiovascular puede estar "compensada" o "descompensada". Compensada significa que la necesidad regular de oxígeno del organismo sigue pudiendo satisfacerse, mientras que descompensada significa que la necesidad regular de oxígeno del organismo ya no se satisface.

20 "Sufrir una complicación cardiovascular" de acuerdo con la presente invención también incluye el deterioro de una complicación cardiovascular preexistente.

25 El término "paciente" de acuerdo con la presente invención está relacionado con un individuo sano, un individuo aparentemente sano o concretamente, un individuo que sufre una enfermedad. Concretamente, el paciente sufre o está en tratamiento para el SIDA, cáncer (por ejemplo sarcoma de Kaposi, cáncer de mama, cáncer de próstata o leucemia), o un trastorno neurológico (por ejemplo esclerosis múltiple o depresión). Aún más concretamente, el paciente no posee un historial conocido de complicación cardiovascular, y/o no muestran o muestra ligeros síntomas (clase I o II de la NYHA) de una complicación cardiovascular, y/o no está en tratamiento para una complicación cardiovascular.

30 Preferiblemente, el paciente es un paciente que está recibiendo o a punto de recibir medicamentos cardiotóxicos.

35 Los medicamentos cardiotóxicos son conocidos por el experto en la materia. Los medicamentos cardiotóxicos están relacionados con cualquier tipo de tratamiento farmacológico que pueda resultar en una complicación cardiovascular. Concretamente, los medicamentos cardiotóxicos pueden causar daños en las células cardíacas (por ejemplo mediante la inducción de apoptosis), daño tisular o puede afectar el sistema de conducción cardíaca.

40 Ejemplos de medicamentos cardiotóxicos de acuerdo con la presente invención incluyen fármacos antineoplásicos (quimioterapéuticos), antidepresivos tricíclicos, esclerosis múltiple, anestésicos locales, interferón alfa, cocaína, hormonas sexuales como los andrógenos o anabolizantes, y fármacos antivirales contra el VIH.

45 Ejemplos de antineoplásicos de acuerdo con la presente invención incluyen las antraciclinas (por ejemplo daunorubicina, idarubicina, doxorubicina (adriamicina), y epirubicina), los derivados de la antraquinona (por ejemplo mitoxantrona), derivados de la acridina (por ejemplo amsacrina), trióxido de arsénico, y anticuerpos para la terapia contra el cáncer (concretamente anticuerpos frente a HER2 y HER3, como el trastuzumab (Herceptin)).

El antineoplásico mitoxantrona también se utiliza en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

50 Ejemplos de antidepresivos tricíclicos de acuerdo con la presente invención incluyen la amitriptilina, amoxapina, clomipramina, desipramina, doxepina, imipramina, nortriptilina, protriptilina y trimipramina.

55 Ejemplos de anestésicos locales de acuerdo con la presente invención incluyen la cocaína y sus derivados, incluyendo la benzocaína, procaína, tetracaína, lidocaína, etidocaína, prilocaína, mepivacaína, bupivacaína, ropivacaína, s-ropivacaína, articaína y fomocaína.

60 También se entenderá que las modificaciones de los fármacos anteriormente definidos se consideran medicamentos cardiotóxicos de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de tales modificaciones incluyen las pegilaciones o formulaciones liposomales, incluyendo los denominados "liposomas furtivos". Ejemplos particulares son los liposomas con doxorubicina (por ejemplo D-99), liposomas de doxorubicina pegilada (por ejemplo Caelyx, Doxil) y la daunorubicina liposomal (por ejemplo Daunoxome).

Ejemplos de andrógenos son la testosterona, 5-alfa-dihidrotestosterona, metiltestosterona, propionato de testosterona, undecanoato de testosterona, enantato de testosterona, fluoximesterona y mesterolona.

65 Los anabolizantes incluyen los andrógenos que se han modificado para reducir el efecto androgénico de los andrógenos e incrementar su efecto estimulante de la formación de proteínas. Ejemplos de anabolizantes son el

decanoato de nandrolona, acetato de clostebol y acetato de metenolona, inhibidores de la aromatasa y beta-sinpaticomiméticos (por ejemplo clenbuterol)

5 Ejemplos de fármacos antivirales contra el VIH son los inhibidores de la proteasa del VIH (por ejemplo amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir), inhibidores de la transcriptasa reversa nucleosídicos (ITRN, por ejemplo zidovudina (AZT), abacavir, didanosina, lamivudina, estavudina, zalcitabina), e inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleosídicos (ITRNN, por ejemplo delavirdina, efavirenz, nevirapina).

10 Los fármacos antivirales contra el VIH también están incluidos en los regímenes de TARAA (terapia antiretroviral altamente activa). Los regímenes clásicos de TARAA comprenden el tratamiento simultáneo con dos ITRN y un inhibidor de la proteasa del VIH.

15 Un listado detallado de los fármacos cardiotoxicos utilizados para el tratamiento del VIH se proporciona en la Tabla 2 en la página 1424 de Barbaro, G., (2002). Cardiovascular Manifestations of HIV Infection. Circulation, vol. 106, págs.1420-1425.

20 También se consideran medicamentos cardiotoxicos las combinaciones de los fármacos mencionados con otros fármacos, por ejemplo, los quimioterapéuticos pueden combinarse con antidepresivos tricíclicos, anestésicos locales, interferón alfa o andrógenos. Como ejemplo adicional, los fármacos para la esclerosis múltiple pueden combinarse con antidepresivos tricíclicos o interferones.

25 Como conocerá el experto en la materia, ciertas combinaciones o modificaciones muestran menos efectos cardiotoxicos y se presentan como una opción de tratamiento, si la presente invención indica un riesgo aumentado o altamente aumentado de complicación cardiovascular. Por ejemplo, los fármacos pegilados o las formulaciones liposomales anteriormente mencionadas se han desarrollado con el propósito de reducir la cardiotoxicidad.

30 La cocaína y los andrógenos también son conocidos como fármacos de abuso. Por ejemplo, muchos pacientes de VIH también son toxicómanos e iniciar un tratamiento con fármacos antivirales contra el VIH puede disparar una complicación cardiovascular. De forma similar, los atletas frecuentemente utilizan cocaína y/o andrógenos para aumentar su rendimiento. De nuevo, medicamentos cardiotoxicos adicionales pueden disparar una complicación cardiovascular. Por lo tanto, la presente invención también está relacionada con el diagnóstico del riesgo de tales pacientes de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de medicamentos cardiotoxicos adicionales.

35 Son conocidas para el experto en la materia las circunstancias bajo las cuales una complicación cardiovascular puede considerarse que aparece "como consecuencia" de los medicamentos cardiotoxicos. Concretamente, una complicación cardiovascular se considera que ha aparecido como consecuencia de los medicamentos cardiotoxicos, si ocurre dentro de un mes, concretamente una semana, más concretamente un día, tras el inicio del tratamiento con los medicamentos cardiotoxicos.

40 El diagnóstico de acuerdo con la presente invención se realiza preferiblemente mediante la utilización de un método diagnóstico. Un método diagnóstico es cualquier método que permite medir el nivel, cantidad o concentración de una sustancia de interés, concretamente un péptido o polipéptido de interés, más concretamente el NT-proBNP.

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

50 Además, el experto en la materia estará familiarizado con los diferentes métodos de determinación del nivel de un péptido o polipéptido. El término "nivel" está relacionado con la cantidad o concentración de un péptido o polipéptido en un paciente o una muestra tomada de un paciente.

55 El término "determinar" de acuerdo con la presente invención está relacionado con la determinación de la cantidad o concentración, preferiblemente de forma semicuantitativa o cuantitativa, del ácido nucleico, péptido, polipéptido u otra sustancia de interés. La determinación puede realizarse directamente o indirectamente. La determinación indirecta incluye la determinación de las respuestas celulares, ligandos unidos, marcajes o productos de reacción enzimática.

60 En el contexto de la presente invención, la cantidad también está relacionada con la concentración. Es evidente, que de la cantidad total de una sustancia de interés en una muestra de tamaño conocido, puede calcularse la concentración de la sustancia y viceversa.

65 La determinación puede realizarse de acuerdo con cualquier método conocido en la materia. Los métodos preferibles se describen a continuación.

- 5 En una realización preferible, el método para la determinación del nivel de un péptido o polipéptido de interés, concretamente el NT-proBNP, comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula capaz de desarrollar una respuesta celular frente al péptido o polipéptido con el péptido o polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, (b) determinar la respuesta celular.
- 10 En otra realización preferible, el método para la determinación del nivel de un péptido o polipéptido de interés, concretamente el NT-proBNP, comprende los pasos de (a) poner en contacto un péptido o polipéptido con un sustrato adecuado durante un periodo de tiempo adecuado, (b) determinar la cantidad de producto.
- 15 En otra realización preferible, el método para la determinación del nivel de un péptido o polipéptido de interés, concretamente el NT-proBNP, comprende los pasos de (a) poner en contacto un péptido o polipéptido con un ligando de unión específica, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, (c) determinar la cantidad de ligando unido.
- 20 Preferiblemente, el péptido o polipéptido está incluido en una muestra, concretamente una muestra de fluido corporal o tejido, y se determina la cantidad del péptido o polipéptido en la muestra.
- Los péptidos y polipéptidos (proteínas) pueden determinarse en muestras de tejido, células y fluidos corporales, es decir, preferiblemente *in vitro*. Preferiblemente, el péptido o polipéptido de interés se determina en una muestra de fluido corporal.
- 25 Una muestra de tejido de acuerdo con la presente invención se refiere a cualquier tipo de tejido obtenido del cuerpo de un humano o animal, vivo o muerto. Las muestras de tejido pueden obtenerse mediante cualquier método conocido para el experto en la materia, por ejemplo mediante biopsia o curetaje.
- 30 Los fluidos corporales de acuerdo con la presente invención pueden incluir la sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, linfa, líquido cerebral, saliva y orina. Concretamente, los fluidos corporales incluyen la sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo y orina. Las muestras de fluidos corporales pueden obtenerse mediante cualquier método conocido en la materia.
- 35 Los métodos para obtener muestras de células incluyen la preparación directa de células únicas o pequeños grupos celulares, disociando tejido (por ejemplo utilizando tripsina), y separando las células de los fluidos corporales, por ejemplo mediante filtración o centrifugación. Las células de acuerdo con la presente invención comprenden también las plaquetas y otras células anucleadas, por ejemplo los eritrocitos.
- 40 Si es necesario, las muestras pueden procesarse posteriormente. Concretamente, pueden purificarse ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos a partir de la muestra de acuerdo con los métodos conocidos en la materia, incluyendo métodos de filtración, centrifugación o extracción como la extracción con cloroformo/fenol.
- 45 Para la determinación de las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade a un cultivo celular y se determina una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión de un gen marcador o la secreción de una sustancia, por ejemplo un péptido, polipéptido o una molécula pequeña.
- Otros métodos preferibles para la determinación pueden incluir la determinación de la cantidad de un ligando que se une específicamente al péptido o polipéptido de interés. La unión de acuerdo con la presente invención incluye tanto la unión covalente como la no covalente.
- 50 Un ligando de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier péptido, polipéptido, ácido nucleico u otra sustancia que se une al péptido o polipéptido de interés. Es bien conocido que los péptidos o polipéptidos, si se obtienen o purifican a partir del cuerpo de un humano o animal, pueden modificarse, por ejemplo mediante glucosilación. Un ligando adecuado de acuerdo con la presente invención puede unirse al péptido o polipéptido también a través de tales puntos.
- 55 Preferiblemente, el ligando debe unirse específicamente al péptido o polipéptido a determinar. La "unión específica" de acuerdo con la presente invención significa que el ligando no debe unirse sustancialmente a ("reaccionar de forma cruzada" con) otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra en investigación. Preferiblemente, la proteína o isoforma unida específicamente debe unirse con una afinidad al menos 3 veces mayor, más preferiblemente al menos 10 veces mayor e incluso más preferiblemente al menos 50 veces mayor que cualquier otro péptido o polipéptido relevante.
- 60 La unión no específica puede ser tolerable, concretamente si el péptido o polipéptido investigado todavía puede distinguirse y determinarse de forma inequívoca, por ejemplo de acuerdo con su tamaño en una transferencia Western, o mediante su abundancia relativamente elevada en la muestra.
- 65

La unión del ligando puede medirse mediante cualquier método conocido en la materia. Preferiblemente, el método es semicuantitativo o cuantitativo. Los métodos adecuados se describen a continuación.

5 En primer lugar, la unión de un ligando puede medirse directamente, por ejemplo mediante NMR o resonancia del plasmón en superficie.

10 En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de la actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse un producto de la reacción enzimática (por ejemplo, la cantidad de una proteasa puede medirse determinando la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo en una transferencia Western).

15 Para medir los productos de la reacción enzimática, preferiblemente la cantidad de sustrato está a saturación. El sustrato también puede estar previamente marcado con un marcaje detectable a la reacción. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca una cantidad detectable, preferiblemente medible de producto. En lugar de determinar la cantidad de producto, puede medirse el tiempo necesario para que aparezca una cantidad dada (por ejemplo detectable) de producto.

20 En tercer lugar, el ligando puede estar acoplado de forma covalente o no covalente con un marcaje que permita la detección y la medida del ligando.

25 El marcaje puede realizarse mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo involucra el acoplamiento del marcaje directamente (covalentemente o no covalentemente) al ligando. El marcaje indirecto involucra la unión (covalentemente o no covalentemente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede estar acoplado a un marcaje adecuado y/o ser la diana (receptor) de un ligando terciario que se une al ligando secundario. La utilización de ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior a menudo se utiliza para aumentar la señal. Los ligandos secundarios y de orden superior adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios y el sistema bien conocido estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.)

30 El ligando o sustrato también puede estar "etiquetado" con una o más etiquetas, como se conocen en la materia. Tales etiquetas pueden después ser las dianas de ligandos de orden superior. Las etiquetas adecuadas incluyen la biotina, digoxigenina, etiqueta de His, Glutation-S-Transferasa, FLAG, GFP, etiqueta de myc, hemaglutinina del virus de la influenza A (HA), proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta es preferiblemente en el extremo N-terminal y/o C-terminal.

35 Los marcajes adecuados son cualquier marcaje detectable mediante un método de detección apropiado. Los marcajes típicos incluyen las partículas de oro, cuentas de látex, éster de acridan, luminol, rutenio, marcajes activos enzimáticamente, marcajes radiactivos, marcajes magnéticos ("por ejemplo cuentas magnéticas", lo que incluye los marcajes paramagnéticos y superparamagnéticos), y los marcajes fluorescentes.

40 Los marcajes activos enzimáticamente incluyen por ejemplo la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa, y derivados de los mismos. Los sustratos adecuados para la detección incluyen la di-amino-benzidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como una solución de reserva lista para su uso de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación de enzima-sustrato adecuada puede resultar en un producto de reacción coloreado, fluorescente o quimioluminiscente, que puede medirse de acuerdo con métodos conocidos en la materia (por ejemplo utilizando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). Como para la determinación de la reacción enzimática, los criterios que se han proporcionado anteriormente se aplican de forma análoga.

50 Los marcajes fluorescentes típicos incluyen las proteínas fluorescentes (como la GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo Texas, fluoresceína, y los colorantes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Otros marcajes fluorescentes están disponibles por ejemplo de Molecular Probes (Oregon). También se contempla la utilización de puntos cuánticos como marcajes fluorescentes.

55 Los marcajes radiactivos típicos incluyen el <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y similares. Un marcaje radiactivo puede detectarse mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo una película sensible a la luz o un Phosphor-imager.

60 Los métodos de medida adecuados de acuerdo con la presente invención también incluyen la precipitación (concretamente la inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo inmuno sorvente acoplado a enzima), inmunoensayos enzimáticos en sandwich, inmunoensayos de electroquimioluminiscencia en sandwich (ECLIA), fluoroinmunoensayo de lantanidos potenciado por disociación (DELFI), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría potenciada con látex, inmunoensayos en fase sólida, y espectrometría de masas como SELDI-TOF, MALDI-TOF o electroforesis capilar - espectrometría de masas (CE-MS). Otros métodos conocidos en la materia (como la electroforesis en gel, la electroforesis en gel 2D, electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS

(SDS-PAGE) y la transferencia Western), pueden utilizarse solos o en combinación con otros métodos de marcaje o detección como los descritos anteriormente.

Los ligandos preferibles incluyen los anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos y aptámeros, por ejemplo aptámeros de ácido nucleico o péptidos. Los métodos para estos ligandos son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también la ofrecen algunos distribuidores comerciales. El experto en la materia estará familiarizado con los métodos para desarrollar los derivados de tales ligandos con una mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, las mutaciones al azar pueden introducirse en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Con estos derivados luego puede analizarse su unión de acuerdo con los procedimientos de cribado conocidos en la materia, por ejemplo la exposición en fagos.

El término "anticuerpo" como se utiliza aquí incluye tanto los anticuerpos policlonales y monoclonales, así como los fragmentos de los mismos, como los fragmentos Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub> que son capaces de unirse al antígeno o hapteno.

En otra realización preferible, el ligando, que preferiblemente se escoge de entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, más preferiblemente del grupo que consiste en ácidos nucleicos, anticuerpos o aptámeros, está presente en un chip.

Dicho chip contiene al menos un ligando adicional, que puede estar dirigido contra un péptido, polipéptido o ácido nucleico de interés. Dicho ligando adicional también puede estar dirigido contra un péptido, polipéptido o ácido nucleico sin interés particular en el contexto de la presente invención. Preferiblemente, el chip contiene los ligandos de al menos tres, preferiblemente al menos cinco, más preferiblemente al menos ocho péptidos o polipéptidos de interés en el contexto de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, el término "chip" se refiere a una fase sólida o transportador de tipo gel en el que al menos dos compuestos están unidos o ligados en una disposición en una, dos o tres dimensiones. Tales chips (lo que incluye los "chips genéticos", "chips de proteínas", chips de anticuerpos y similares) generalmente son conocidos para el experto en la materia y normalmente se generan sobre portaobjetos de vidrio de microscopio, especialmente portaobjetos de vidrio recubiertos como los portaobjetos recubiertos de policaciones, nitrocelulosa o biotina, cubreobjetos y membranas como, por ejemplo, membranas basadas en nitrocelulosa o nilón.

El chip puede incluir un ligando unido o al menos dos células que expresan cada una de ellas al menos un ligando.

También se contempla utilizar los "chips en suspensión" como los chips de acuerdo con la presente invención (Nolan JP, Sklar LA. (2002). Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. Trends Biotechnol. 20(1):9-12). En tales chips en suspensión, el transportador, por ejemplo una microcuenta o microesfera, está presente en suspensión. El chip consiste en diferentes microcuentas o microesferas, posiblemente marcadas, que son portadoras de diferentes ligandos.

La aplicación también está relacionada con un método para producir chips como los que se han definido anteriormente, en los que al menos un ligando está unido al material transportador además de otros ligandos.

Los métodos para producir tales chips, por ejemplo los basados en la química de fase sólida y los grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (US 5.744.305). Tales chips también pueden ponerse en contacto con sustancias o bibliotecas de sustancias y analizar su interacción, por ejemplo su unión o cambio de conformación. Por lo tanto, los chips que comprenden un péptido o polipéptido como el definido anteriormente pueden utilizarse para identificar los ligandos que se unen específicamente a dichos péptidos o polipéptidos.

El método de acuerdo con la presente invención comprende el paso de diagnosticar el riesgo del paciente mediante la comparación de un nivel determinado con los niveles conocidos asociados con diferentes grados de riesgo en un paciente.

El experto en la materia es capaz de determinar los niveles conocidos de NT-proBNP que están asociados con diferentes grados de riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de los medicamentos cardiotóxicos.

De acuerdo con la presente invención, el término "riesgo" está relacionado con la probabilidad de que ocurra un incidente particular, más concretamente una complicación cardiovascular. El grado de riesgo puede aumentar, aumentar fuertemente o aumentar muy fuertemente. El grado de riesgo también puede no incrementarse. "Riesgo no aumentado" significa que aparentemente no existe riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de los medicamentos cardiotóxicos.

Puede elaborarse una guía sobre cuáles son los niveles que están asociados con cada grado de riesgo a partir de los niveles de NT-proBNP que se sabe están asociados con la presencia o gravedad de una enfermedad cardiovascular. Por ejemplo, en base al percentil 97,5 obtenido en individuos con una edad inferior a los 50, un nivel en plasma de 125 pg/ml de NT-proBNP se consideró un nivel normal (véase el Ejemplo 3). Niveles superiores de

NT-proBNP se correlacionan por ejemplo con el nivel de síntomas de acuerdo con la clasificación de la NYHA y con el nivel de trastorno de la FEVI. El término "nivel en plasma" está relacionado con los niveles de NT-proBNP medidos en plasma sanguíneo.

5 A continuación, se proporcionan los niveles en plasma de NT-proBNP que normalmente se considera que están asociados con los grados indicados de riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de los medicamentos cardiotoxicos.

10 Es evidente, que los niveles que se proporcionan a continuación pueden servir sólo como clasificación inicial del riesgo de un paciente. Por ejemplo, el riesgo también depende de la capacidad de bombeo extra del corazón de un paciente concreto.

15 El valor del nivel conocido también puede escogerse de acuerdo con la sensibilidad o especificidad deseadas para el diagnóstico. Cuanto mayor sea la sensibilidad deseada, menor será la especificidad del diagnóstico y viceversa. Por ejemplo, cuanto mayor sea el nivel conocido de NT-proBNP que se escoja para definir el riesgo, mayor será la especificidad del diagnóstico. Sin embargo, la sensibilidad del diagnóstico será menor.

20 Además, el experto en la materia es capaz de determinar otros niveles relevantes de los Ejemplos que también se muestran a continuación, concretamente los niveles que son relevantes en ciertas poblaciones de pacientes, como los pacientes ancianos o los pacientes con niveles aumentados o reducidos de marcadores para la función tiroidea (por ejemplo TSH o FT4).

25 Normalmente, un nivel en plasma inferior a 50 pg/ml de NT-proBNP está asociado con la ausencia de riesgo aumentado de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de los medicamentos cardiotoxicos. Concretamente, en los pacientes varones un nivel en plasma inferior a aproximadamente 60 - 100 pg/ml está asociado con ausencia de riesgo aumentado, mientras en las pacientes mujeres un nivel en plasma inferior a aproximadamente 120 - 150 pg/ml está asociado con ausencia de riesgo aumentado. El valor promedio es de 125 pg/ml.

30 Normalmente, un nivel en plasma superior al nivel en plasma de ausencia de riesgo aumentado pero inferior a 1000 pg/ml de NT-proBNP está asociado con un riesgo aumentado de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de los medicamentos cardiotoxicos.

35 Normalmente, un nivel en plasma entre 1000 y 5000 pg/ml de NT-proBNP está asociado con un riesgo altamente aumentado de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de los medicamentos cardiotoxicos.

Normalmente, un nivel en plasma superior a 5000 pg/ml de NT-proBNP está asociado con un riesgo muy altamente aumentado de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de los medicamentos cardiotoxicos.

40 Una vez se ha diagnosticado en riesgo en un paciente, puede tener consecuencias para el subsiguiente tratamiento como se describe a continuación. Los grados de riesgo mencionados a continuación concretamente se refieren a los grados de riesgo asociados con los niveles descritos anteriormente de NT-proBNP.

45 Si un método de acuerdo con la presente invención indica ausencia de riesgo aumentado, entonces el tratamiento puede continuarse como se había planeado.

50 Si un método de acuerdo con la presente invención indica un riesgo aumentado, entonces el tratamiento puede adaptarse. Preferiblemente, el tratamiento se acompañará de una determinación posterior del nivel de NT-proBNP de la invención y un posterior diagnóstico, como la electrocardiografía, ecocardiografía o cualquier otro método adecuado conocido para el cardiólogo experto. Las dosis de medicamentos cardiotoxicos pueden reducirse y/o puede escogerse un tipo de medicación menos cardiotoxica para el tratamiento. Además, la adaptación del tratamiento puede incluir medidas como la restricción de ingesta de sal, ejercicio regular moderado, evitar los agentes antiinflamatorios no esteroideos, proporcionar inmunizaciones para influenza y neumococo, administrar fármacos como los diuréticos (incluyendo la coadministración de más de un diurético), inhibidores ACE, bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, bloqueadores del receptor de la angiotensina, digitalis y cualquiera del resto de medidas conocidas y que se consideren apropiadas por el experto en la materia. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para tratar un paciente que está recibiendo o va a recibir medicamentos cardiotoxicos.

60 Si un método de acuerdo con la presente invención indica un riesgo altamente aumentado, entonces el tratamiento puede adaptarse como se describe para el riesgo aumentado. Sin embargo, también se puede reconsiderar si alguno de los medicamentos cardiotoxicos puede ser tolerado.

65 Si un método de acuerdo con la presente invención indica un riesgo muy altamente aumentado, entonces el tratamiento puede adaptarse como se describe para el riesgo altamente aumentado. Sin embargo, también puede considerarse la hospitalización inmediata y/o el tratamiento cardiaco intensivo.

En otra realización, la presente invención está relacionada con un método para decidir sobre el tratamiento de un paciente con medicamentos cardiotoxicos de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende los pasos de (a) determinar *in vitro* del nivel de NT-proBNP, (b) diagnosticar del riesgo del paciente de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia del tratamiento planeado comparando el nivel determinado de NT-proBNP con los niveles conocidos asociados con diferentes grados de riesgo en un paciente, (c) opcionalmente iniciar un examen del paciente por un cardiólogo, (d) recomendar la iniciación del tratamiento o frenar el tratamiento, opcionalmente, considerando los resultados del examen del paciente por el cardiólogo. Preferiblemente, la iniciación de un examen por un cardiólogo y/o el frenado del tratamiento se recomienda si el método indica la presencia de riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares como consecuencia de los medicamentos cardiotoxicos. Es evidente que el método puede adaptarse de acuerdo con todas las realizaciones o aspectos preferibles de la invención mencionados en esta especificación.

Leyenda de las figuras

Fig. 1 Frecuencia de distribución de los niveles de NT-proBNP (mediana) en donantes de sangre (n = 2948) de 18-65 años de edad (18-29 años, 30-39 años, 40-49 años, 50-59 años, 60-65 años). V, varones; M, mujeres.

Fig. 2 Niveles de NT-proBNP en donantes de sangre y la relación con los niveles de hemoglobina. v, varones (diamantes); m, mujeres (cuadrados), t, total (triángulos).

Fig. 3 Niveles de NT-proBNP en varones de acuerdo con la FEVI.

Fig. 4 Niveles de NT-proBNP en mujeres de acuerdo con la FEVI.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Medida de NT-proBNP:

Se determine el NT-proBNP mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (inmunoensayo en sándwich Elecsys proBNP; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un Elecsys 2010. El ensayo funciona de acuerdo con el principio de un inmunoensayo en sándwich de electroquimioluminiscencia. En un primer paso, se incuban un anticuerpo de captura IgG (1-21) marcado con biotina, un anticuerpo señal F(ab')<sub>2</sub> (39-50) marcado con rutenio y 20 microlitros de muestra a 37°C durante 9 minutos. A continuación, se añaden micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina y la mezcla se incuba durante 9 minutos adicionales. Tras la segunda incubación, la mezcla de reacción se transfiere a la célula de determinación del sistema donde las cuentas son capturadas por medios magnéticos en la superficie de un electrodo. Los marcajes no unidos se eliminan mediante un lavado de la célula de determinación con tampón.

En el último paso, se aplica voltaje al electrodo en presencia de un tampón que contiene tripropilamina y la señal electroquimioluminiscente resultante se registra con un fotomultiplicador. Todos los reactivos y muestras se manipulan de forma totalmente automatizada mediante el instrumento Elecsys®. Los resultados se determinan mediante una curva de calibración que se genera específicamente para el instrumento mediante dos puntos de calibración y una curva maestra proporcionada mediante el código de barras del reactivo. El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2

Análisis:

Se recogió la sangre para el análisis hormonal en tubos con EDTA que contenían 5000 U de aprotinina (Trasylol, Beyer, Alemania) y tubos con litio-heparina (para la química clínica), según fuera apropiado. Las muestras de sangre y orina se centrifugaron inmediatamente durante 10 min. a 3400 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Determinación de NT-proANP: Se determinó el NT-proANP mediante un radioinmunoensayo de unión competitiva con una técnica con fase sólida magnética en la modificación de Sundsfjord, J.A., Thibault, G., et al. (1988). Identification and plasma concentrations of the N-terminal fragment of proatrial natriuretic factor in man. J Clin Endocrinol Metab 66:605-10., utilizando el mismo suero policlonal de conejo anti-proANP de rata, proANP (1-30) humano de Peninsula Lab (Bachem Ltd, St. Helene, UK) como estándar, y proANP 1-30 yodado purificado por HPLC para radiomarcaje. Para alcanzar una elevada sensibilidad y una buena precisión, se utilizaron Dynabeads M280 con IgG de oveja anti-conejo (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) como fase sólida y segundo anticuerpo. El coeficiente de variación, a 425, 1163 y 2490 pmol\* 1<sup>-1</sup> fue de 7,5, 3,7 y 3,4 %, respectivamente. El límite de detección fue de 30 pmol/l.

## Determinación of NT-proBNP:

5 Se determinó el NT-proBNP mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (inmunoensayo en sándwich proBNP de Elecsys; Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) en un Elecsys 2010 (Mueller, T., Gegenhuber, A. (2003). Comparison of the Biomedica NT-proBNP enzyme immuno assay and the Roche NT-proBNP chemiluminescence immuno assay: implications for the prediction of symptomatic and asymptomatic structural heart disease. Clin. Chem. 49:976-9), véase también el Ejemplo 1. La varianza media intraensayo fue del 4,3 % (rango: de 2,7 a 5,9 % para las muestras de plasma con una concentración entre 7,6 y 2732 pmol \*1<sup>-1</sup> con una varianza interensayo del 3,2 %. El límite inferior de detección fue de 0,6 pmol \*1<sup>-1</sup>.

## Ejemplo 3

15 Estudio de los niveles de NT-proBNP en sangre de donantes:

Un total de 1981 donantes de sangre se reclutaron del servicio de transfusión sanguínea de la Universidad de Mainz, Alemania. La mayoría de los donantes de sangre eran donantes de repetición y estos donantes de repetición reciben un examen físico con una periodicidad anual. En base a este examen todos los donantes de sangre incluidos en el estudio se consideraron clínicamente sanos. En el momento de la donación de sangre se analizaron los niveles de hemoglobina así como los niveles de creatinina. Todas las determinaciones se realizaron antes de la donación de sangre. El estudio se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki y fue aprobado por un comité ético local.

25 Como se ilustra en la Fig. 1 los valores de NT-proBNP individuales se representan en relación a la edad y sexo. Como es evidente por la Fig. 7, los niveles de NT-proBNP (mediana) fueron superiores en las mujeres que en los hombres. Los valores atípicos se observaron más frecuentemente en individuos ancianos (con una edad por encima de los 50 años) mientras en individuos más jóvenes (por debajo de 50 años de edad) las determinaciones individuales se encontraron agrupadas. Los valores de referencia relacionados con la edad y el sexo basados en el percentil 97,5 se calcularon y resultaron ser de 84,2 pg/ml para los varones y de 146,2 pg/ml para las mujeres respectivamente a una edad inferior a los 50 años (Tabla 1).

Tabla 1: Niveles de NT-proBNP en donantes de sangre clasificados por grupos de edad y específicos de género. N, número de donantes de sangre, v, varones, m, mujeres.

Edad (años)	18-49	18-49	18-29	18-29	30-39	30-39	40-49	40-49	50-59	50-59	> 60	> 60
Género	v	m	v	m	m	v	v	m	v	m	v	m
N	964	574	232	379	194	307	148	211	94	110	28	28
Mediana	20,0	39,3	20,0	20,0	36,9	20,0	49,8	27,4	65,8	42,0	61,4	61,4
Percentil 97,5%	84,2	146,2	64,7	88,1	132,2	94,6	230,7	178,5	270,3	278,0	261,7	261,7

Se recogió una segunda muestra en un intervalo de aproximadamente 12 meses de todos los individuos que estaban fuera del anterior rango, y como puede verse en la Tabla 2, la mayoría de las muestras permaneció fuera del respectivo rango de referencia, lo que sugería que estos valores elevados eran hallazgos constantes. Un pequeño grupo de individuos con valores iniciales fuera del rango descrito en la segunda muestra mostraron valores que se consideró que estaban dentro de los rangos de referencia definidos.

Para valorar si los valores de NT-proBNP eran independientes de los niveles de hemoglobina, se determinaron las concentraciones de hemoglobina en varones y mujeres, y se encontró que eran de promedio 1,5 g/ml inferiores en mujeres que en varones (Tabla 2). Los niveles de hemoglobina no dependían de la edad.

Tabla 2: Seguimiento (12 meses) de N=48 donantes de sangre con niveles elevados de NT-proBNP.

	NT-proBNP vuelve a niveles normales	NT-proBNP permanece elevado
N varones	7	14
N mujeres	7	20
N total	14	34

Cuando los valores de NT-proBNP se compararon entre varones y mujeres con los mismos niveles de hemoglobina y en grupos de la misma edad seguía existiendo una diferencia entre varones y mujeres en términos de niveles de NT-proBNP, lo que sugería que los niveles de hemoglobina no explicaban las diferentes concentraciones de NT-proBNP encontradas entre varones y mujeres. También se hizo aparente que los niveles de NT-proBNP eran de hecho dependientes de los de hemoglobina, los niveles de NT-proBNP aumentaron al reducirse la concentración de hemoglobina (Fig. 2).

En un grupo de individuos, se compararon los niveles de creatinina con los niveles de NT-proBNP. En el grupo estudiado los niveles de creatinina estaban en el rango normal en todos los individuos analizados. Los niveles de creatinina no aumentaban con la edad, y por el contrario, los niveles de NT-proBNP aumentaban con la edad, lo que sugería que la función renal puede no estar relacionada con que se dispare un aumento de NT-proBNP al aumentar la edad (Tabla 3).

Tabla 3: Niveles de NT-proBNP agrupados por edad y específicos de género (mediana) en donantes de sangre en relación con los niveles de creatinina. Crea, creatinina; N, número de donantes de sangre.

Distribución de edad	N	Crea [mg/dL] mediana	NT-proBNP [pg/ml] mediana	N	Crea [mg/dL] mediana	NT-proBNP [pg/ml] mediana	N	Crea [mg/dL] mediana	NT-proBNP [pg/ml] mediana
	total			varones			mujeres		
total	880	0,79	25,3	528	0,80	20,0	352	0,66	47,0
≤20	7	0,81	20,0	2	0,90	20,0	5	0,72	20,0
21-30	192	0,78	20,0	109	0,87	20,0	83	0,66	43,4
31-40	264	0,78	22,0	155	0,80	20,0	109	0,66	37,2
41-50	205	0,79	25,5	121	0,89	20,0	84	0,66	53,2
51-60	157	0,80	37,6	100	0,83	25,3	57	0,67	61,4
61-65	55	0,79	43,7	41	0,83	41,6	14	0,63	72,3

El estudio se inició determinando los valores normales y de referencia de NT-proBNP en una población aparentemente sana. Como se muestra, los niveles de NT-proBNP individuales estaban agrupados hasta la edad de 50 años con sólo unos pocos valores atípicos. Este hallazgo es consistente con la asunción de que las enfermedades cardíacas y específicamente cardiovasculares son raras en este grupo de edad, por lo tanto los valores obtenidos en individuos por debajo de los 50 se consideraron en base al percentil 97.5 como valores normales. También se encontró que estos valores eran diferentes entre varones y mujeres. También pudo demostrarse que de hecho los niveles de hemoglobina afectaban al nivel de NT-proBNP, y aquellos individuos con hemoglobina menor mostraron niveles más elevados de NT-proBNP. Cuando se analizan a los mismos niveles de hemoglobina, seguían existiendo diferencias entre hombre y mujeres. Por lo tanto, los niveles de hemoglobina no explicaron las diferencias en los niveles de NT-proBNP observadas entre ambos sexos.

Este estudio mostró que un número sustancial de individuos poseían niveles de NT-proBNP que excedían el percentil 97,5 de los individuos de edad inferior a 50. El número de estos valores atípicos aumentó con la edad. LA determinación de los niveles de NT-proBNP se realizó mediante el inmunoensayo Elecsys® como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4

Un estudio de los niveles de NT-proBNP en pacientes de los que se sospecha presentan trastornos cardiacos:

Se reclutaron para el estudio un total de 473 pacientes que se presentaron ante 18 cardiólogos. Estos recibieron un historial médico, un examen físico y un ecocardiograma en el que se registró la fracción de eyección ventricular izquierda. Además, se extrajeron 10 ml de sangre, se centrifugaron y almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las principales variables demográficas de los pacientes incluidas en este estudio se indican en la Tabla 4. El estudio fue aprobado por un comité ético local y se llevó a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki.

Tabla 4: Características de la población de estudio de los pacientes que se sospecha que presentan trastornos cardiacos. t, total; v, varones; m, mujeres.

Pacientes	t	v	m
N	473	258	215
Edad [media]	66,0	64,5	68,0
Síntomas e indicación	N	N	N
Hipertensión arterial	280	144	136
Presión sanguínea, sistólica	182	96	86
Presión sanguínea, diastólica	78	34	44
Disnea	208	102	106
Edema	45	20	25
Arritmia	32	16	16
Angina de pecho	122	64	58
Anamnesis AIM	165	59	106
Clasificación	N	N	N
NYHA I	308	176	132
NYHA II	112	52	60
NYHA III	50	27	23
NYHA IV	3	3	0
NYHA II-IV	165	82	83
FEVI < 30%	27	18	9
FEVI 30-50%	86	56	30
FEVI > 50%	360	184	176

Los siguientes análisis se realizaron en todos o la mayoría de los pacientes: niveles de creatinina, TSH, FT4 y NT-proBNP. Los análisis se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El NT-proBNP se analizó utilizando un inmunoensayo recién desarrollado (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) utilizando un instrumento Elecsys® 2010 (véase el Ejemplo 1).

La significación se calculó en base al método de la puntuación de Wilcoxon y el test de Pearson Chi cuadrado: se consideró que existe significación a valores de  $p < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $*** P < 0,001$ . La probabilidad de error no debe exceder el 5 %.

Los pacientes se separaron en tres grupos de acuerdo con la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI), es decir por debajo del 30 % de FEVI, 30-50 % de FEVI, y por encima del 50 % de FEVI. Los pacientes también se agruparon de acuerdo con la clasificación NYHA en grados I-IV.

Como se indica en la Tabla 5, los niveles de NT-proBNP se registraron en base al nivel de fracción de eyección ventricular izquierda y en base a los síntomas. La mayoría de individuos mostró niveles aumentados de NT-proBNP si se utilizaba un umbral de 84 pg/ml para los varones y 146 pg/ml para las mujeres, que discrimina entre función cardiaca normal y anormal (véase el Ejemplo 1). Los niveles medios de NT-proBNP aumentaron con el nivel de síntomas valorados mediante la clasificación de la NYHA y con el nivel de alteración de la fracción de eyección medida mediante eco. La dependencia del NT-proBNP de la fracción de eyección ventricular izquierda también se resume en las Fig. 3 y 4 para varones y mujeres respectivamente. Como puede verse en las figuras, los niveles de NTproBNP (mediana) aumentaron con la reducción de la fracción de eyección.

Tabla 5: Niveles de NT-proBNP en pacientes de acuerdo con la FEVI y la clasificación de la NYHA.

	FEVI	≤30%	30-50%	>50%
NYHA	N, total	27	86	361
I	N	2	27	280
	NT-proBNP [pg/ml] media	2848,8	506,4	302,1
II	N	6	36	70
	NT-proBNP [pg/ml] media	1896,5	862,5	488,5
III	N	16	23	11
	NT-proBNP [pg/ml] media	2467,9	1946,3	698,4
IV	N	3	0	0
	NT-proBNP [pg/ml] media	16223,2	0	0

Como se muestra en la Tabla 6, sólo una minoría de individuos reclutados para el estudio en los centros cardiológicos mostró niveles normales de NT-proBNP en base a los umbrales obtenidos en el estudio en donantes de sangre con edades por debajo de los 50 (véase el Ejemplo 3). Los valores normales de NT-proBNP se agruparon en individuos con una fracción ventricular izquierda inalterada y sin síntomas, sólo se identificaron algunos valores atípicos.

5

Tabla 6: Pacientes con niveles de NT-proBNP por debajo del umbral (varones: 84 pg/ml; mujeres: 155 pg/ml) con FEVI reducida.

	FEVI	< 30%		30-50%		>50%	
	N, total	27		86		361	
NYHA		varones	mujeres	varones	mujeres	varones	mujeres
I	N	0	0	2	0	29	11
II	N	0	0	0	3	1	5
III	N	0	0	0	0	0	0
IV	N	0	0	0	0	0	0

10 Un total de 32 individuos mostraron fibrilación atrial según indicaba un electrocardiograma (ECG) aunque la mayoría de individuos no mostraban evidencias de fibrilación atrial. Como puede observarse en la Tabla 7, los valores mediana en el grupo de fibrilación atrial fueron superiores que en el grupo de fibrilación no atrial. Se indican las principales variables demográficas para este grupo de pacientes. Los individuos que no mostraron fibrilación atrial presentaban con mayor frecuencia un historial de infarto de miocardio y angina de pecho. Los datos sugieren que la fibrilación atrial representa una contribución independiente a los niveles aumentados de NT-proBNP (P: 0,0002).

15

Tabla 7: Niveles de NT-proBNP en pacientes con fibrilación atrial comparados con los de pacientes sin fibrilación atrial.

	Fibrilación atrial		Sin fibrilación atrial		Valor de p
N, total	32		442		
Edad [mediana]	68,0		66,0		
NT-proBNP [pgml] mediana	1055,0		401,7		0,0002 ***
	N	%	N	%	
NYHA I	22	68,8 %	287	64,9 %	>= 0,05
NYHA II	6	18,8 %	106	24,0 %	>= 0,05
NYHA III	4	12,5 %	46	10,4 %	>= 0,05
NYHA IV	0	0	3	0,7 %	>= 0,05
FEVI < 30%	0	0	27	6,1 %	>= 0,05
FEVI 30-50%	6	18,8 %	80	18,1 %	>= 0,05
FEVI > 50%	26	81,3 %	335	75,8 %	>= 0,05
Hipertensión arterial	13	40,6 %	267	60,4 %	>= 0,05
Presión sanguínea, sistólica	12	37,5 %	170	38,5 %	>= 0,05
Presión sanguínea, diastólica	7	21,9 %	71	16,1 %	>= 0,05
Disnea	13	40,6 %	195	44,1 %	>= 0,05
Edema	3	9,4 %	42	9,5 %	>= 0,05
Angina de pecho	6	18,8 %	116	26,2 %	>= 0,05
Arritmia	0	0	78	17,6 %	0,0154*

20 Un total de 78 individuos poseían un historial de infarto de miocardio (IM) mientras la mayoría no poseían un historial de IM. Los individuos con historial de infarto de miocardio mostraron niveles de NT-proBNP superiores que los que no poseían historia de IM (Tabla 8).

25 Tabla 8: Niveles de NT-proBNP en pacientes con anamnesis de infarto de miocardio (AIM) comparado con los pacientes sin anamnesis AIM.

	AIM		No AIM		Valor de p
N, total	78		381		
Edad [mediana]	67,5		66,0		
NT-proBNP [pgml] mediana	797,0		370,8		0,0001 ***
	N	%	N	%	
NYHA I	33	42,3 %	266	69,8 %	0,001 **
NYHA II	31	39,7 %	79	20,7 %	0,001 **
NYHA III	14	17,9 %	33	8,7 %	0,001 **
NYHA IV	0	0	3	0,8 %	0,001 **
FEVI < 30%	7	9,0 %	19	5,0 %	0,001 **
FEVI 30-50%	37	47,4 %	47	12,3 %	0,001 **
FEVI > 50%	34	43,6 %	315	82,7 %	0,001 **
Hipertensión arterial	45	57,7 %	234	61,4 %	>= 0,05

Presión sanguínea, sistólica	21	26,9 %	154	40,4 %	>= 0,05
Presión sanguínea, diastólica	4	5,1 %	72	18,9 %	>= 0,05
Disnea	51	65,4 %	156	40,9 %	0,0001 ***
Edema	10	12,8 %	35	9,2%	>= 0,05
Angina de pecho	32	41,0 %	89	23,4 %	0,0015**
Arritmia	0	0	27	7,1%	0,0154*

Los valores de NT-proBNP fueron superiores en los individuos con un historial de angina de pecho que en aquellos que no poseían un historial de angina de pecho (Tabla 9). Los pacientes con historial de angina de pecho frecuentemente no eran sintomáticos, mostraban con mayor frecuencia enfermedades cardíacas y con mayor frecuencia un historial de infarto de miocardio (Tabla 8).

5

Tabla 9: Niveles de NT-proBNP en pacientes con angina de pecho comparados con los de pacientes sin angina de pecho.

	Angina de pecho		No Angina de pecho		Valor de p
N	122		335		
Edad [mediana]	69,5		64,0		
NT-proBNP [pg/ml] mediana	589,5		369,3		0,009**
	N	%	N	%	
NYHA I	55	45,1 %	242	72,2 %	0,00001 ***
NYHA II	50	41,0 %	60	17,9 %	0,00001 ***
NYHA III	16	13,1 %	31	9,3 %	0,00001 ***
NYHA IV	1	0,8 %	2	0,6 %	0,00001 ***
FEVI < 30%	6	4,9 %	12	3,6 %	>=0,05
FEVI 30-50%	30	24,6 %	62	18,5 %	>=0,05
FEVI > 50%	86	70,5 %	261	77,9 %	>=0,05
Hipertensión arterial	87	71,3 %	191	57,0 %	0,0056*
Presión sanguínea, sistólica	45	36,9 %	129	38,5 %	>=0,05
Presión sanguínea, diastólica	18	14,8 %	57	17,0 %	>=0,05
Disnea	81	66,4 %	125	37,3 %	0,001***
Edema	20	16,4 %	25	7,5 %	0,0042**
Anamnesis AIM	32	26,2 %	46	13,7 %	0,0015**
Arritmia	6	4,9 %	21	6,3 %	>=0,05

10 La creatinina se determinó en 470 individuos. Sólo 152 individuos mostraron niveles de creatinina en el rango normal, 318 estaban fuera del rango normal. Los individuos con niveles elevados de creatinina poseían niveles superiores de NT-proBNP que los que mostraban niveles normales de creatinina. Las variables demográficas sugieren que los individuos con niveles elevados de creatinina mostraron con mayor frecuencia un historial de infarto de miocardio. Los datos sugieren que una alteración de la función renal per se puede contribuir a la elevación de los niveles de NT-proBNP cuando los pacientes con un historial de IM (AIM) se excluyen de la valoración (Tabla 9).

15

Tabla 10: Niveles de NT-proBNP en pacientes con niveles elevados de creatinina.

Creatinina	normal		elevada		Valor de p
	0,66-1,1 mg/dl		> 1,1 mg/dl		
N, total	140		253		
Edad [mediana]	66,0		65,0		
NT-proBNP [pg/ml] mediana	289,7		456,5		0,0003 ***
	N	%	N	%	
NYHA I	99	70,7 %	176	69,6 %	>=0,05
NYHA II	31	22,1 %	49	19,4 %	>=0,05
NYHA III	10	7,1 %	25	9,9 %	>=0,05
NYHA IV	0	0	3	1,2 %	>=0,05
FEVI < 30%	5	3,6 %	15	5,9 %	>=0,05
FEVI 30-50% +> 50%	135	96,4 %	238	94,1 %	>=0,05
Hipertensión arterial	92	65,7 %	141	55,7 %	>=0,05
Presión sanguínea, sistólica	66	47,1 %	94	37,2 %	>=0,05
Presión sanguínea, diastólica	32	22,9 %	41	16,2 %	>=0,05
Disnea	57	40,7 %	97	38,3 %	>=0,05
Edema	16	11,4 %	19	7,5 %	>=0,05
Angina de pecho	31	22,1 %	58	22,9 %	>=0,05
Arritmia	8	5,7 %	24	9,5 %	>=0,05

En un subgrupo de 306 individuos se determinó la función tiroidea. En base a los niveles de TSH y FT4 los pacientes se clasificaron en individuos con la función tiroidea normal y con la función tiroidea anormal. La mayoría de los individuos con la función tiroidea anormal mostraron niveles elevados de TSH, pero FT4 normal, lo que sugiere una función hipotiroidea compensada. La mediana de los niveles de NT-proBNP fueron superiores en los individuos con función tiroidea anormal que en aquellos con la función tiroidea normal. Esto sugiere que la disfunción tiroidea representa una contribución a los niveles elevados de NT-proBNP que con mayor probabilidad se asocian con una alteración de la función cardiaca a través de una alteración de la función tiroidea (Tabla 11).

Tabla 11: Niveles de NT-proBNP en pacientes con función tiroidea regular comparado con los de los pacientes con disfunción tiroidea.

	Eutirosea		Disfunción tiroidea		Valor de p
N, total	139		167		
Edad [mediana]	66,0		66,0		
NT-proBNP [pg/ml] mediana	397,2		555,5		0,048*
	N	%	N	%	
NYHA I	97	69,8 %	109	65,3 %	>=0,05
NYHA II	30	21,6 %	38	22,8 %	>=0,05
NYHA III	12	8,6 %	19	11,4 %	>=0,05
NYHA IV	0	0	1	0,6 %	>=0,05
FEVI < 30%	6	4,3 %	8	4,8 %	>=0,05
FEVI 30-50%	24	17,3 %	37	22,2 %	>=0,05
FEVI > 50%	109	78,4 %	122	73,1 %	>=0,05
Hipertensión arterial	83	59,7 %	96	57,5 %	>=0,05
Presión sanguínea, sistólica	54	38,8 %	53	31,7 %	>=0,05
Presión sanguínea, diastólica	24	17,3 %	23	13,8 %	>=0,05
Disnea	53	38,1 %	76	45,5 %	>=0,05
Edema	13	9,4 %	18	10,8 %	>=0,05
Angina de pecho	37	26,6 %	41	24,6 %	>=0,05
Anamnesis AIM	22	15,8 %	29	17,4 %	>=0,05
Arritmia	6	4,3 %	12	7,2 %	>=0,05

Los presentes datos sugieren que cuando se compara con datos obtenidos en donantes de sangre (Ejemplo 3) la mayoría de los pacientes que se presentan en la consulta de un cardiólogo muestran niveles elevados de NT-proBNP. Los niveles de NT-proBNP aumentaron con el nivel de los síntomas y con la alteración de la fracción de eyección ventricular izquierda. El hecho de que se registraran niveles elevados de NT-proBNP en individuos asintomáticos y en individuos con la fracción de eyección inalterada indica que el NT-proBNP sirve para reconocer la complicación cardiaca de forma más temprana que la mejor metodología actual utilizada por los cardiólogos. En el presente estudio se encontró que la función renal estaba frecuentemente alterada en base a los niveles de creatinina en un grupo de pacientes con evidencia de complicación cardiaca. Esto contrasta con un estudio en donantes de sangre en el que se encontraron niveles de creatinina significativamente menores y normales en una población de edad similar (véase el Ejemplo 3). El estudio sugiere que deben considerarse ambos componentes, la función renal y la complicación cardiaca, y los datos también indican que la disfunción renal de leve a moderada no influencia la interpretación de los valores de NT-proBNP en el diagnóstico y valoración de las complicaciones cardiacas.

Los datos también indican que la disfunción tiroidea puede estar asociada con la disfunción cardiaca y puede contribuir a los niveles elevados de NT-proBNP.

#### Ejemplo 6

Se estaban discutiendo las opciones de tratamiento de un paciente de 46 años de edad con un tumor y anemia concurrente. El tratamiento con antraciclinas parecía ser una opción preferible. Para diagnosticar el riesgo de complicación cardiovascular, se determinaron los valores de NT-proBNP del paciente. El valor de NT-proBNP de 800 pg/ml indicaba un riesgo aumentado de complicación cardiovascular, mientras el ecocardiograma no estaba alterado. El tratamiento con antraciclinas se inició y el valor de NT-proBNP se controló periódicamente a intervalos cortos. Mientras los exámenes de ecocardiograma y ultrasonido permanecían inalterados, los valores de NT-proBNP aumentaron hasta un valor de 3500 pg/ml. En base a estos valores, se diagnosticó un riesgo altamente aumentado de sufrir complicaciones cardiovasculares. Los médicos discutieron si debían interrumpir el tratamiento, incrementar el valor de hemoglobina o iniciar una terapia cardiaca.

#### Ejemplo 7

Un paciente de 62 años con depresión con un valor de NT-proBNP de 1200 pg/ml en el momento de presentarse se está tratando con antidepresivos tricíclicos. A causa de la sospecha de disfunción cardiaca, el paciente se siguió de forma regular con ECG, ecocardiograma y NT-proBNP. Los valores de NT-proBNP aumentaron significativamente hasta 2050 pg/ml, determinados a intervalos bisemanales. Al mismo tiempo, los ECG y ecocardiogramas

permanecían inalterados. El paciente recibió un tratamiento más intenso para la disfunción cardíaca, lo que incluye los diuréticos de lazo. Posteriormente, los valores de NT-proBNP decrecieron y se consideró una terapia alternativa de antidepresivos.

5 Ejemplo 8

48 pacientes que sufrían de hepatitis C crónica (de forma predominante de genotipo 1) se trataron con 5 millones de unidades de interferón alfa 2b no pegilado, tres veces por semana, durante 48 semanas. De forma adicional, los pacientes recibieron ribavirina. Las muestras se tomaron y se determinaron los niveles de NT-proBNP antes de que el tratamiento se iniciara, a las 24 semanas, a las 48 semanas y a las 96 semanas. Los niveles determinados de NT-proBNP de todos los pacientes aumentó durante el tratamiento (mediana: 37,1, 44,3, 52,4 y 49 pg/ml de NT-proBNP en los intervalos de tiempo mencionados). Sin embargo, un paciente que ya mostraba un nivel elevado de NT-proBNP antes del inicio del tratamiento (368 pg/ml de NT-proBNP) a continuación desarrolló una insuficiencia cardíaca clínicamente aparente. Este paciente también mostró un aumento más intenso de NT-proBNP durante el tratamiento que el resto de pacientes (los niveles determinados fueron: 368, 696, 376 y 413 pg/ml de NT-proBNP). En comparación, los niveles más elevados de NT-proBNP determinados en cualquiera del resto de los 47 pacientes fue de aproximadamente 200, 370, 280, 430 pg/ml en los intervalos de tiempo mencionados. El segundo nivel más elevado determinado en el resto de pacientes a las 96 semanas (430 pg/ml) fue de aproximadamente 280 pg/ml de NT-proBNP. Por lo tanto, la presente invención habría permitido el diagnóstico del riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares en el paciente que mostró el nivel de 368 pg/ml de NT-proBNP antes de la iniciación del tratamiento.

Ejemplo 9

25 98 pacientes que sufrían de cáncer de mama se trataron con antraciclina. Un paciente mostró un nivel aumentado de NT-proBNP ya antes de la iniciación del tratamiento. Durante el tratamiento, el nivel determinado de NT-proBNP del paciente aumentó fuertemente. El paciente desarrolló una insuficiencia cardíaca. El aumento del nivel de NT-proBNP estuvo presente antes de que los síntomas clínicos de insuficiencia cardíaca fueran aparentes.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para diagnosticar el riesgo de un paciente de sufrir complicaciones cardiovasculares seleccionadas de entre enfermedad coronaria cardiaca, síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, disfunción ventricular izquierda o fallo cardiaco congestivo como consecuencia de medicamentos cardiotóxicos, en el que dicho diagnóstico se realiza antes del inicio del tratamiento con dichos medicamentos cardiotóxicos, lo que comprende los pasos de
- 10 a) determinar *in vitro* el nivel de NT-proBNP,
- b) diagnosticar el riesgo del paciente comparando el nivel determinado con los niveles conocidos asociados con los diferentes grados de riesgo en un paciente.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un nivel en plasma superior a 60 e inferior a 1000 pg/ml de NT-proBNP en un paciente varón está asociado con un riesgo aumentado de sufrir una complicación cardiovascular.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un nivel en plasma superior a 120 e inferior a 1000 pg/ml de NT-proBNP en un paciente mujer está asociado con un riesgo aumentado de sufrir una complicación cardiovascular.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un nivel en plasma de 1000 a 5000 pg/ml de NT-proBNP está asociado con un riesgo muy aumentado de sufrir una complicación cardiovascular.
- 30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un nivel en plasma superior a 5000 pg/ml de NT-proBNP está asociado con un riesgo extremadamente aumentado de sufrir una complicación cardiovascular.
6. El método de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 5 en el que los medicamentos cardiotóxicos se escogen de entre el grupo que consiste en los antineoplásicos, antidepresivos tricíclicos, fármacos para la esclerosis múltiple, anestésicos locales, interferón alfa, cocaína, andrógenos y fármacos antivirales para el VIH.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el medicamento cardiotóxico es un antineoplásico, concretamente una antraciclina.
- 40 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, en el que el diagnóstico está relacionado con la monitorización o confirmación del riesgo.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8, en el que el nivel de NT-proBNP se determina utilizando un ligando de unión específica, un chip, un dispositivo de microfluídica, un analizador de quimioluminiscencia o un dispositivo robotizado.
- 45 10. La utilización de un anticuerpo que puede determinar *in vitro* el nivel de NT-proBNP de un paciente para diagnosticar el riesgo de un paciente de sufrir una enfermedad coronaria cardiaca, síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, disfunción ventricular izquierda o fallo cardiaco congestivo como consecuencia de medicamentos cardiotóxicos, en el que dicho diagnóstico se realiza antes de que se inicie el tratamiento con los medicamentos cardiotóxicos.
- 50 11. Un método para decidir el tratamiento de un paciente con medicamentos cardiotóxicos antes del inicio de dicho tratamiento, que comprende los pasos de
- 55 a) determinar *in vitro* el nivel de NT-proBNP,
- b) diagnosticar el riesgo del paciente de sufrir complicaciones cardiovasculares seleccionadas de entre una enfermedad coronaria cardiaca, síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, disfunción ventricular izquierda o fallo cardiaco congestivo como consecuencia del tratamiento planeado comparando el nivel determinado de NT-proBNP con los niveles conocidos asociados con diferentes grados de riesgo en un paciente,
- 60 c) opcionalmente, iniciar el examen del paciente por un cardiólogo,
- d) recomendar la detención del tratamiento si el método indica la presencia de un riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares seleccionadas de entre la enfermedad coronaria cardiaca, síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, disfunción ventricular izquierda o fallo cardiaco congestivo como consecuencia de los medicamentos cardiotóxicos.

Fig. 1

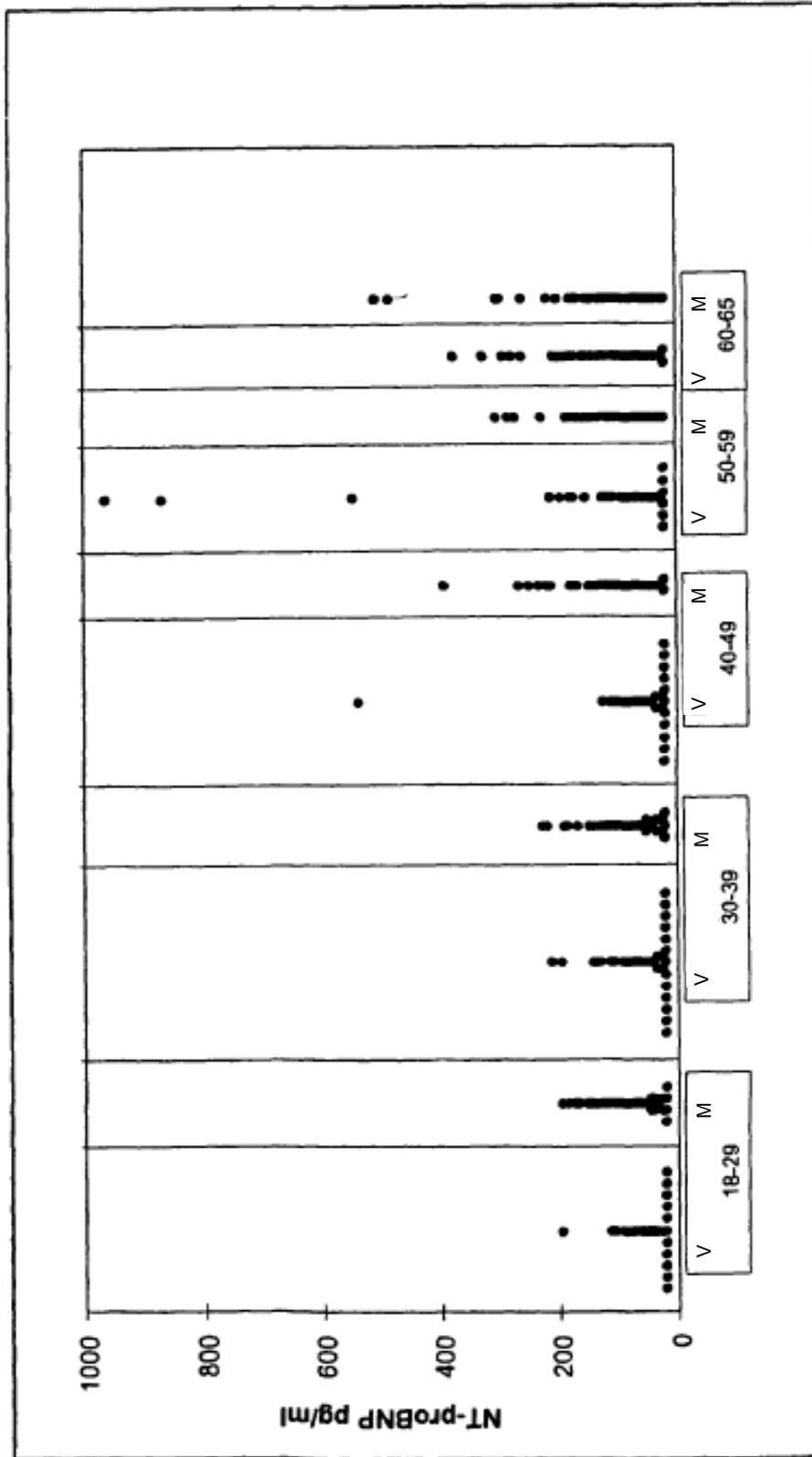


Fig. 2

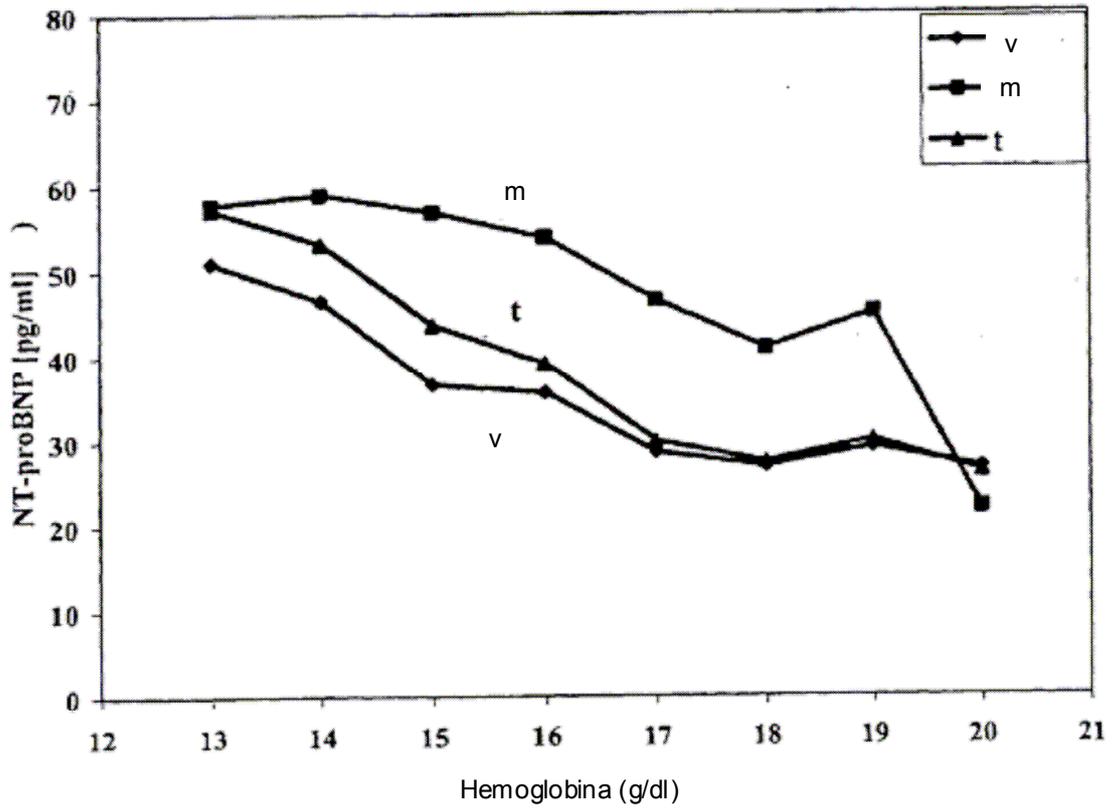


Fig. 3

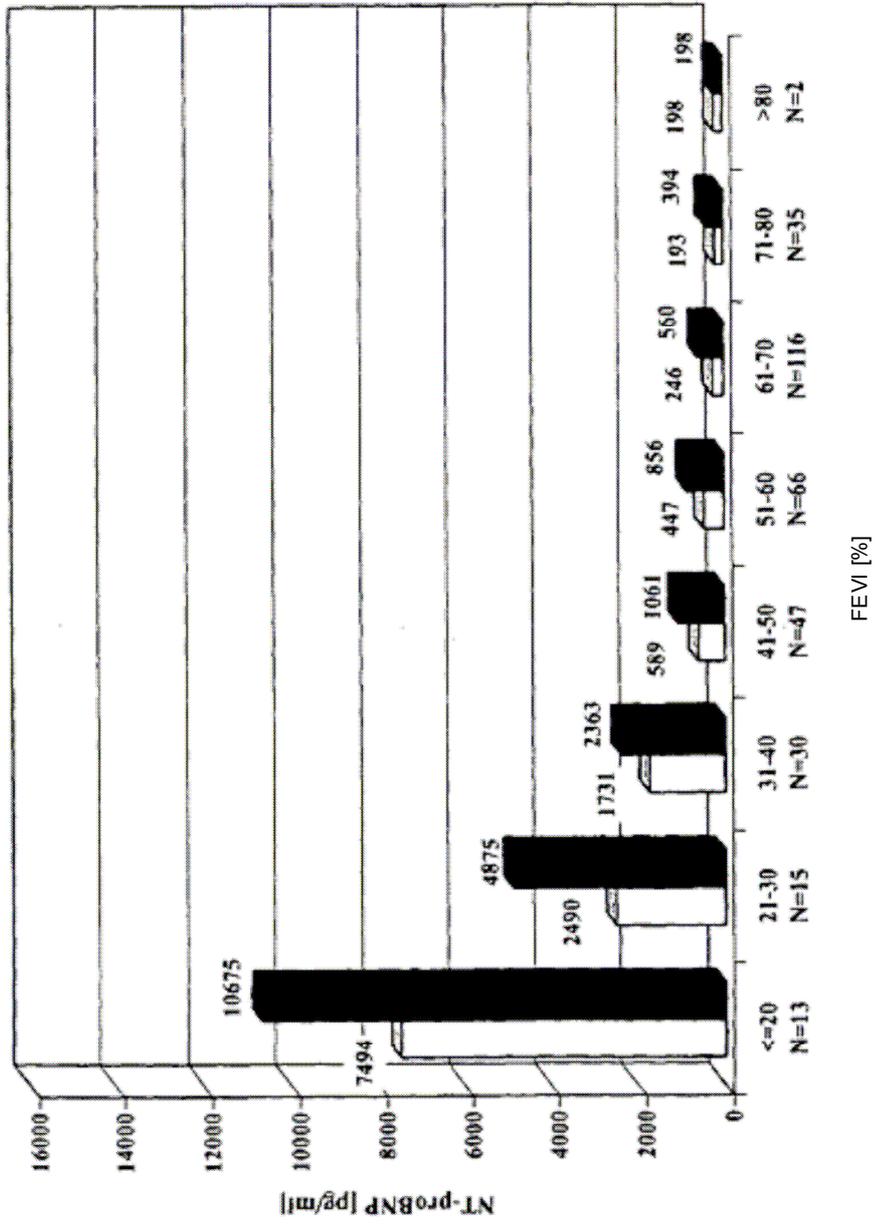


Fig. 4

