

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 290**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2007 E 07103577 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 1970709**

54 Título: **Utilización de péptidos de tipo PNC para predecir la necesidad de diálisis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HERMANN, ZUZANA;
AMANN-ZALAN, ILDIKO;
MOECKS, JOACHIM;
BURGER, HANS ULRICH;
ESCRIG, CAESAR;
SCHERHAG, ARMIN y
DOUGHERTY, FRANK CH.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 430 290 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de péptidos de tipo PNC para predecir la necesidad de diálisis

- 5 Un objetivo de la medicina moderna es proporcionar regímenes de tratamiento personalizados o individualizados. Es decir, regímenes de tratamiento que consideren las necesidades o riesgos individuales del paciente, por ejemplo mediante la selección de un régimen terapéutico o de seguimiento particular.
- 10 La diálisis es un tipo de terapia de sustitución renal que se utiliza para proporcionar una sustitución artificial a la función renal perdida debido a insuficiencia renal. Principalmente es un tratamiento de apoyo vital y habitualmente no cura ninguna enfermedad renal. La diálisis puede utilizarse para pacientes muy enfermos que repentinamente han perdido la función renal (insuficiencia renal aguda) o para pacientes bastante estables de función renal en deterioro progresivo (insuficiencia renal crónica, enfermedad renal crónica) hasta que resulte necesario iniciar la diálisis para tratar la uremia (insuficiencia renal en estadio terminal, enfermedad renal crónica en estadio terminal).
- 15 En este contexto, debe indicarse que resulta perfectamente posible vivir con una función renal crónicamente alterada o incluso con sólo un riñón. Sólo cuando la cantidad de tejido renal funcional se ha reducido en gran parte se desarrollará una insuficiencia renal crónica. Dicha descompensación de la función renal puede afectar a la función de muchos otros órganos y conduce naturalmente a la muerte debido a uremia. En los pacientes descompensados aguda o crónicamente con uremia severa, está indicada la terapia inmediata de sustitución renal, por ejemplo la diálisis o el trasplante de riñón. Sin embargo, en contraste con el deterioro crónico y descompensación crónica de la función renal observados habitualmente, la insuficiencia renal puede producirse de manera muy súbita e inesperada, incluso en pacientes que previamente se consideraba que todavía presentaban una función renal estable, debido a una infección, sepsis o efectos secundarios tóxicos de diversas terapias médicas. Aunque existen valores de laboratorio establecidos para la estimación del grado de disfunción renal (ver posteriormente), resultaría altamente deseable disponer de medios y métodos de diagnóstico precoz tales como un marcador biológico para identificar pacientes con riesgo de desarrollar una necesidad de diálisis.
- 20 La mayoría de médicos utiliza las concentraciones en plasma de creatinina, urea, cistatina C y electrolitos para determinar la función renal. Estas medidas resultan adecuadas para determinar si un paciente sufre enfermedad renal. Por desgracia, el nitrógeno de urea y la creatinina en sangre no se encontrará fuera del intervalo normal hasta la pérdida del 60% de la función renal total.
- 25 En pacientes renales, se utilizan estimaciones de la tasa de filtración glomerular (TFG) para evaluar la función renal. La TFG se calcula comparando los niveles de creatinina en la orina con los resultados del análisis de sangre. Proporciona una indicación más precisa del estado de los riñones. La TFG se expresa en ml/minuto (mililitro por minuto). Para la mayoría de pacientes, resulta adecuada una TFG superior a 60 ml/minuto. Sin embargo, en el caso de que la TFG haya bajado significativamente respecto a un resultado de ensayo anterior, ello puede ser un indicador precoz de enfermedad renal que requiere intervención médica.
- 30 La medición de la cistatina C se correlaciona más estrechamente con la TFG que la creatinina. Los valores de referencia de cistatina C sérica son significativamente más altos en hombres que en mujeres. Además, la cistatina C sérica se incrementa con la edad a partir de los 60 años. En individuos de mayor edad no existen diferencias relacionadas con el género en los valores de referencia. Se creía que la cistatina C era independiente de la composición corporal; sin embargo, la masa corporal magra no afecta al nivel de cistatina C y la predicción de la TFG basada en la cistatina C mejora al incluir esta variable.
- 35 Sin embargo, aunque estos marcadores se están utilizando actualmente para determinar el estado actual de la función renal, por sí solos no resultan suficientes para diagnosticar el riesgo de desarrollar una necesidad de diálisis.
- 40 Sanchez et al. (2004) han investigado los factores predictivos preoperatorios y perioperatorios de la necesidad de terapia de sustitución renal en pacientes que han recibido un trasplante de hígado. Indican que un nivel sérico preoperatorio de creatinina superior a 1,9 mg/dl, de nitrógeno de urea preoperatorio en sangre superior a 27 mg/dl, una estancia en la unidad de cuidados intensivos superior a 3 días y una puntuación en el modelo de enfermedad hepática en estadio terminal superior a 21 son significativos (Sanchez E.Q., Gonwa T.A., Levy M.F., Goldstein R.M. et al. Preoperative and perioperative predictors of the need for renal replacement therapy after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 78(7):1048-54, 2004. 1048-54). Sin embargo, esta combinación de indicadores se aplica únicamente a receptores de trasplante de hígado y no puede generalizarse simplemente.
- 45 Se han investigado varios marcadores putativos, tales como MCP-1, ADMA, biopsia (por ejemplo la medición morfométrica de daño renal crónica en la nefritis del lupus) para la predicción de la necesidad de diálisis.
- 50
- 55
- 60

Vickery et al. (*American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, octubre

de 2005, Vol. 46, nº 4, octubre de 2005 (2005-10), páginas 610 a 620) dan a conocer una correlación negativa entre los PNC y una mayor severidad de enfermedad renal. Los niveles plasmáticos crecientes de PNC y de NT-proPNC se correlacionan con una menor TFG.

5 Los péptidos de tipo PNC (por ejemplo el péptido natriurético cerebral (PNC) y/o su fragmento propéptido N-terminal (NT-proPNC)) y su utilización como marcadores moleculares o bioquímicos en el diagnóstico de determinados trastornos son conocidos. En el documento WO nº 02/089657 se ha sugerido medir el péptido natriurético cerebral (PNC) para diagnosticar el infarto de miocardio. En el documento WO nº 02/083913 se ha propuesto utilizar el PNC para predecir la morbilidad o mortalidad a corto plazo en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva, infarto de miocardio, infarto de miocardio con elevación del ST o síndromes coronarios agudos sin elevación del ST. El nivel plasmático de NT-proPNC se sospecha que también se ve influido por la presencia de enfermedad renal crónica, lo que sugiere que NT-proPNC podría no ser un marcador satisfactorio de la función renal.

10 De esta manera, actualmente sólo se ha descrito en la técnica anterior un número limitado de medios candidatos para evaluar la potencial necesidad de diálisis.

15 Por lo tanto, todavía existe una necesidad de mejora del diagnóstico del riesgo de desarrollar una necesidad de diálisis y de superar las desventajas del estado de la técnica. En particular, existe una necesidad de proporcionar medios y métodos fiables y eficientes para el diagnóstico del riesgo de desarrollar una necesidad de diálisis.

20 La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de la probabilidad de desarrollar una necesidad de diálisis en un paciente, presentando dicho paciente enfermedad renal crónica, que comprende las etapas de:

25 a) medir el nivel de NT-proPNC en una muestra del paciente,
b) diagnosticar la probabilidad mediante la comparación entre el nivel medido de NT-proPNC y por lo menos un nivel de referencia,
en el que dicho sujeto sufre de enfermedad cardiaca concomitante seleccionada de entre el grupo de insuficiencia cardiaca crónica y enfermedad cardiaca isquémica crónica, y en el que el nivel de referencia corresponde a un nivel plasmático de NT-proPNC de 300 a 500 pg/ml

30 Se da a conocer un método para el diagnóstico y predicción del riesgo y tiempo hasta el desarrollo de una necesidad de diálisis en un paciente con insuficiencia renal crónica, que comprende las etapas de:

35 a) medir el nivel de péptido de tipo PNC o de una variante del mismo en una muestra del paciente,
b) diagnosticar y predecir el riesgo de necesidad de diálisis mediante la comparación del nivel medido del péptido de tipo PNC o de una variante del mismo y por lo menos un nivel de referencia.

El método puede comprender además la etapa de obtener un líquido corporal o una muestra de tejido del paciente. Preferentemente, el nivel se determina en una muestra de líquido corporal o tejido del paciente.

40 La invención proporciona métodos y medios, particularmente marcadores, que permiten el diagnóstico del riesgo de desarrollar una necesidad de diálisis. En consecuencia, la invención permite además predecir la necesidad de diálisis y/o el tiempo hasta que aparezca la necesidad de diálisis. Más particularmente, se ha encontrado en el contexto de la invención que el nivel medido de un péptido de tipo PNC puede indicar el riesgo de desarrollo de una necesidad de diálisis. Los métodos y medios proporcionados en la presente memoria son simples, rápidos, económicos y adecuados para la utilización por medios generales, aunque también por médicos, clínicas o laboratorios especializados. La invención proporciona además usos correspondientes de cualquiera de los marcadores, medios y métodos según la invención.

45 Durante el curso de la invención se ha encontrado que el nivel de un péptido de tipo PNC en un paciente puede indicar el riesgo de desarrollo de una necesidad de diálisis. Además, se ha encontrado que el nivel de péptido de tipo PNC permite predecir la rapidez con que se desarrollará una necesidad de diálisis. Estos resultados fueron bastante inesperados, ya que inicialmente se había supuesto que los niveles de los péptidos de tipo PNC se vería fuertemente influidos por la presencia o ausencia de trastornos cardiacos y, por lo tanto, no se consideró que los péptidos de tipo PNC pudiesen predecir el riesgo de desarrollar una necesidad de diálisis.

50 En especial, la invención permite además un diagnóstico particularmente precoz del riesgo (y/o la predicción) de desarrollo de la necesidad de diálisis. En consecuencia, la invención también permitirá identificar los pacientes con riesgo incrementado de descompensación de la función renal. De esta manera, resulta posible ajustar y optimizar la terapia renoprotectora antes de lo que era posible anteriormente. De esta manera, la invención podría permitir conservar más nefronas y posiblemente retrasar la necesidad de diálisis al iniciarse la terapia más precozmente y/o de una manera más vigorosa en un paciente en el que se ha identificado un riesgo incrementado de necesidad de diálisis.

Tal como ya se ha indicado, resulta perfectamente posible vivir con una función renal alterada o incluso con sólo un riñón. Por ejemplo, el ser humano dispone de más tejido renal del necesario para sobrevivir. Sin embargo, si la cantidad de tejido renal funcional se reduce mucho, puede desarrollarse una insuficiencia renal crónica o la disfunción renal puede conducir a síntomas severos. En estos casos, está indicada la terapia de sustitución renal (por ejemplo la diálisis o el trasplante de riñón).

La presente invención resulta particularmente ventajosa para el médico general y el internista, que frecuentemente no disponen de acceso a equipos especiales y no poseen la experiencia para diagnosticar y estimar adecuadamente la disfunción renal. Sin embargo, la invención también resulta de utilidad particular para los nefrólogos y/o para los especialistas en diabetes. Entre otros ejemplos se incluyen las clínicas o departamentos para pacientes ambulatorios nefrológicos o de diabetes.

La invención resultará de utilización particular en el contexto de cualesquiera trastornos renales. Los trastornos renales son conocidos por el experto en la materia. Según la invención, la expresión "trastorno renal" se considera relacionada con cualquier enfermedad, daño o disfunción del riñón o que afecta al riñón, más particularmente que afecta a la capacidad del riñón de eliminación de residuos y/o de ultrafiltración.

Entre los ejemplos de trastornos renales se incluyen los trastornos congénitos y los trastornos adquiridos. La presente invención se aplica particularmente a los trastornos renales adquiridos. Entre los ejemplos de trastornos renales congénitos se incluyen la hidronefrosis congénita, la obstrucción congénita del tracto urinario, la duplicación de uréter, el riñón en herradura, la enfermedad renal poliquistica, la displasia renal y el riñón pequeño unilateral. Entre los ejemplos de trastornos renales adquiridos se incluyen la nefropatía diabética o analgésica, la glomerulonefritis, la hidronefrosis (el agrandamiento de uno o ambos riñones provocado por la obstrucción del flujo de orina), la nefritis intersticial, los cólicos nefríticos, los tumores renales (por ejemplo el tumor de Wilms y el carcinoma de células renales), el lupus nefrítico, la enfermedad de cambio mínimo, el síndrome nefrótico (el glomérulo ha sido dañado de manera que entra en la orina una gran cantidad de proteínas sanguíneas). Entre otras características frecuentes del síndrome nefrótico se incluyen la hinchazón, el nivel bajo de albúmina sérica y el nivel elevado de colesterol), la pielonefritis, la insuficiencia renal (por ejemplo la insuficiencia renal aguda y la insuficiencia renal crónica).

La invención se utiliza para diagnosticar el riesgo en pacientes que sufren enfermedades cardíacas concomitantes, tales como insuficiencia cardíaca crónica o isquemia crónica.

Los trastornos renales pueden diagnosticarse mediante cualesquiera medios conocidos y que se consideren apropiados. En particular, la función renal puede evaluarse a partir de la tasa de filtración glomerular (TFG). Por ejemplo, la TFG puede calcularse utilizando la fórmula de Cockcroft-Gault o la fórmula MDRD (Levey, *Annals of Internal Medicine*, 461-470, 1999). La TFG es el volumen de líquido filtrado por los capilares glomerulares renales hacia el interior de la cápsula de Bowman por unidad de tiempo. Clínicamente se utiliza con frecuencia para determinar la función renal. La TFG inicialmente se estimaba (la TFG no puede determinarse directamente, todos los cálculos derivados de fórmulas tales como la fórmula de Cockcroft Gault o la fórmula MDRD proporcionan únicamente estimaciones y no la TFG "real") mediante la inyección de inulina en el plasma. Debido a que la inulina no es reabsorbida por el riñón tras la filtración glomerular, su tasa de excreción es directamente proporcional a la tasa de filtración de agua y solutos a través del filtro glomerular. Sin embargo, en la práctica clínica se utiliza la eliminación de creatinina para medir la TFG. La creatinina es una molécula endógena, sintetizada en el cuerpo, libremente filtrada por el glomérulo (aunque también secretada por los túbulos renales en cantidades muy reducidas). Por lo tanto, la eliminación de creatinina (ECr) es una aproximación ajustada de la TFG. La TFG típicamente se expresa en mililitros por minuto (ml/minuto). El intervalo normal de la TFG en hombres es de 97 a 137 ml/minuto; el intervalo normal de la TFG en mujeres es de 88 a 128 ml/minuto.

En el caso de que la TFG se reduzca a menos de un umbral crítico que permite la eliminación de la concentración tóxica de uremia para la sangre (habitualmente a una TFG, ECr <10 a 15 ml/min, insuficiencia renal en estadio terminal), está indicada la terapia de sustitución renal, dependiendo también de otras circunstancias clínicas, tales como la condición clínica del paciente, por ejemplo los trastornos renales pueden diagnosticarse mediante cualesquiera medios conocidos y que se consideren apropiados. En particular, la función renal puede evaluarse a partir de la tasa de la TFG. Una de las primeras indicaciones de trastorno renal es la presencia de proteínas en la orina (microalbuminuria o macroalbuminuria), que puede evaluarse mediante un simple ensayo de tira reactiva. El análisis de sangre más común utilizado actualmente todavía es la creatinina, aunque reconociendo su falta de precisión.

En el caso de que la TFG caiga a niveles muy bajos (insuficiencia renal en estadio terminal), está indicada la terapia de sustitución renal, por ejemplo la diálisis o el trasplante de riñón.

Preferentemente, una TFG inferior a 10 ml/min indica una necesidad de diálisis, y una TFG inferior a 6 ml/min indica

una necesidad inmediata de diálisis. La diálisis preferentemente también está indicada si el paciente presenta una TFG inferior a 15 ml/min y muestra por lo menos una de las condiciones clínicas siguientes: síntomas o indicios de uremia, sobrecarga de líquidos resistente a diuréticos, presión sanguínea mal controlada o evidencia de desnutrición.

5 El término "diálisis" es conocido por el experto en la materia. En particular, la diálisis es un tipo de terapia de sustitución renal que se utiliza para proporcionar una sustitución artificial de la función renal perdida debido a insuficiencia renal. Es principalmente un tratamiento de apoyo vital y habitualmente no cura ninguna enfermedad renal. La diálisis puede utilizarse para pacientes muy enfermos que han perdido repentinamente la función renal
10 (insuficiencia renal aguda) o para pacientes bastante estables que han perdido permanentemente la función renal (insuficiencia renal en estadio terminal). En estado de salud, los riñones eliminan los productos residuales (por ejemplo el potasio, los ácidos y la urea) de la sangre y también eliminan el exceso de líquidos en forma de orina. El tratamiento de diálisis puede duplicar ambas funciones. De esta manera, el término "diálisis" según la invención preferentemente se refiere a la eliminación de residuos y/o a la ultrafiltración (eliminación de líquidos). Más
15 particularmente, el término "diálisis" se refiere a la eliminación de residuos, más particularmente a la eliminación de residuos en combinación con la ultrafiltración.

La expresión "necesidad de diálisis" es conocida por el experto en la materia. En particular, según la invención la expresión se considera que se relaciona con la necesidad de cualquier tipo de terapia de sustitución renal, incluyendo, por ejemplo, la diálisis, el trasplante de riñón y el trasplante de tejido renal. Más particularmente, la expresión "necesidad de diálisis" se refiere a la necesidad de cualquier tipo de terapia renal que presente un efecto sobre la eliminación de residuos y la ultrafiltración comparable a la diálisis utilizando, por ejemplo, una HDF ONLINE de Fresenius Medical Care, Alemania.

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

35 La presente invención aprovecha particularmente el NT-proPNC como marcador bioquímico. Ventajosamente, se ha encontrado en los estudios subyacentes a la presente invención que el NT-proPNC es un factor predictivo preciso, eficiente y estadísticamente independiente con respecto a la TFG del riesgo de desarrollar una necesidad de diálisis.

Los péptidos de tipo PNC comprenden prep-proPNC, proPNC NT-proPNC y PNC.

40 El pre-propéptido (134 aminoácidos en el caso de pre-proPNC) comprende un péptido de señal corto, que es escindido enzimáticamente para liberar el propéptido (108 aminoácidos en el caso de proPNC). El propéptido es cortado adicionalmente en un propéptido N-terminal (NT-propéptido, 76 aminoácidos en el caso de NT-proPNC) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de PNC).

45 Los péptidos de tipo PNC preferentes según la presente exposición son proPNC, NT-proPNC, PNC y las variantes de los mismos. El PNC es la hormona activa y presenta una vida media más corta in vivo que el presumiblemente inactivo NT-proPNC.

50 La preanalítica es más robusta con NT-proPNC, permitiendo un fácil transporte de la muestra a un laboratorio central (Mueller T., Gegenhuber A., Dieplinger B., Poelz W., Haltmayer M. Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples. Clin Chem Lab Med 42: 942-4, 2004). Las muestras de sangre pueden almacenarse a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o transportarse sin pérdidas. En contraste, el almacenamiento del PNC durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C comporta una pérdida de concentración de por lo menos 20% (Mueller T., Gegenhuber A. et al., Clin. Chem. Lab. Med. 42: 942-4, 2004, supra; Wu AH, Packer M, Smith A, Bijou R, Fink D, Mair J, Wallentin L, Johnston N, Feldcamp CS, Haverstick DM, Ahnadi CE, Grant A, Despres N, Bluestein B, Ghani F. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study. Clin Chem 50: 867-73, 2004).

60 Cualquiera de las mediciones de la forma activa o inactiva puede resultar ventajosa, según el curso temporal de interés y los equipos analíticos o condiciones de almacenamiento disponibles. Los péptidos de tipo PNC más preferentes según la presente invención son NT-proPNC y variantes del mismo.

El término "variantes" en el presente contexto se refiere a péptidos sustancialmente similares a dichos péptidos. La expresión "sustancialmente similar" es perfectamente conocida por el experto en la materia. En particular, una variante puede ser una isoforma o alelo que muestre intercambios de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos de la isoforma peptídica más prevalente en la población humana. Preferentemente, dicho péptido sustancialmente similar presenta una identidad de secuencia respecto a la isoforma más prevalente del péptido de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 85%, más preferentemente de por lo menos 90%, todavía más preferentemente de por lo menos 95%. También son sustancialmente similares los productos de degradación, por ejemplo los productos de degradación proteolítica, que todavía son identificados con los medios diagnósticos o mediante ligandos dirigidos contra el péptido de longitud completa respectivo. El término "variantes" también pretende referirse a las variantes de procesamiento.

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

Se conocen ejemplos de variantes y métodos particulares para su medición (ver, por ejemplo, Ala-Kopsala M., Magga J., Peuhkurinen K. et al., Molecular heterogeneity has a major impact on the measurement of circulating N-terminal fragments of A-type and B-type natriuretic peptides. *Clinical Chemistry* 50(9):1576-1588, 2004).

Entre otras realizaciones preferentes de la exposición se incluyen la medición de diferentes marcadores en combinación, de manera simultánea o no simultánea. Un ejemplo es la medición de NT-proPNC en combinación con PNC.

En una realización preferente adicional del método de la exposición, debe determinarse en la muestra del paciente la cantidad de hemoglobina (Hb). La Hb puede determinarse mediante diversas técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Un incremento significativo de la cantidad de Hb también será indicativo de un riesgo incrementado de desarrollar una necesidad de diálisis. Una cantidad significativamente reducida de Hb será indicativa de un riesgo reducido. Una cantidad incrementada de Hb tal como se utiliza según la presente invención preferentemente es una cantidad superior a 11 g/dl, más preferentemente una cantidad de entre 13 y 15 g/dl, mientras que una cantidad reducida es una cantidad inferior a 11 g/dl, más preferentemente inferior a 10,5 g/dl.

Además, también un método preferente de la presente exposición, se considera la historia médica previa. Concretamente, se ha encontrado en los estudios subyacentes a la presente invención que una enfermedad cardiovascular previa y, preferentemente, infarto de miocardio, es un indicador de un riesgo incrementado de desarrollo de necesidad de diálisis.

Una reducción de la eliminación de creatinina de por lo menos 1 ml/min es, además, un indicador adicional de un riesgo incrementado de desarrollo de la necesidad de diálisis. Por lo tanto, puede determinarse la eliminación de creatinina además del NT-proPNC en otra realización preferente del método de la presente invención. Más preferentemente, una eliminación de creatinina de entre 15 y 25 ml/min es indicativa de un riesgo incrementado.

El término "diagnóstico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la evaluación del riesgo, es decir, la probabilidad según la cual el sujeto desarrollará una necesidad de diálisis según se hace referencia en la presente memoria. Tal como entenderá el experto en la materia, dicha evaluación habitualmente no se pretende que sea correcta para el 100% de los sujetos que deben diagnosticarse. Sin embargo, el término requiere que en una parte estadísticamente significativa de los sujetos se diagnostique correctamente que desarrollarán dicha necesidad de diálisis. El experto en la materia podrá determinar si una parte se considera estadísticamente significativa utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Pueden encontrarse más detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1993. Los intervalos de confianza preferentes son por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99%. Los valores de p son, preferentemente, 0,05, 0,01, 0,005 ó 0,0001. Preferentemente, la probabilidad contemplada por la presente invención permite que el diagnóstico sea correcto para como mínimo 60%, como mínimo 70%, como mínimo 80% o como mínimo 90% de los sujetos de una cohorte o población determinada.

El diagnóstico según la presente invención incluye determinar, seguir, confirmar, subclasificar y predecir el trastorno, riesgo o necesidad relevante. El término determinar se refiere a adquirir conciencia de un trastorno, riesgo o necesidad. Seguir se refiere a mantener un registro de un trastorno, riesgo o necesidad ya diagnosticado, por ejemplo para analizar la progresión de un trastorno o riesgo, o la influencia de un tratamiento particular sobre la progresión de un trastorno o riesgo. Confirmar se refiere a fortalecer o justificar un diagnóstico ya realizado utilizando otros indicadores o marcadores. Subclasificar se refiere a definir adicionalmente un diagnóstico según diferentes subclases del trastorno, riesgo o necesidad diagnosticado, por ejemplo definir según formas leves y severas del

trastorno. Predecir se refiere al pronóstico de un trastorno, riesgo o necesidad antes de que se pongan de manifiesto o se alteren significativamente otros síntomas o marcadores.

5 Debe entenderse, tal como se indica en la presente memoria, que la estratificación del riesgo proporcionada mediante el método de la presente invención preferentemente se refiere a una ventana temporal definida (ventana de predicción) en el futuro. La ventana de predicción es un intervalo en el que el sujeto desarrollará la necesidad de diálisis según la probabilidad predicha. La ventana de predicción puede ser la totalidad del periodo de vida restante del sujeto tras el análisis mediante el método de la presente invención. Preferentemente, la ventana de predicción es un intervalo de varios meses y hasta dos años posteriores a la obtención de la muestra que debe analizarse
10 mediante el método de la presente invención. Más preferentemente, las ventanas temporales se dan a conocer en otras partes de la memoria en mayor detalle.

15 El término "paciente" según la presente invención se refiere a un individuo sano, a un individuo aparentemente sano o, particularmente, a un individuo que sufre una enfermedad. En particular, el paciente presenta un trastorno renal (en particular una enfermedad renal crónica (por ejemplo debida a nefropatía diabética)), más particularmente insuficiencia renal preterminal o insuficiencia renal preterminal. De esta manera, el paciente también puede presentar diabetes. Todavía más particularmente, en el momento de la medición o diagnóstico, el paciente no presenta una necesidad de diálisis y/o no se ha diagnosticado una necesidad inmediata de diálisis.

20 El diagnóstico según la presente invención preferentemente se lleva a cabo mediante la utilización de medios diagnósticos. La expresión medios diagnósticos se refiere a cualesquiera medios que permitan medir el nivel, cantidad o concentración de una sustancia de interés, en particular un péptido o polipéptido de interés, más particularmente un péptido de tipo PNC.

25 Los métodos y medios diagnósticos que pueden utilizarse para medir los niveles de los péptidos respectivos son conocidos por el experto en la materia. Entre estos métodos se incluyen los métodos basados en ELISA en microplaca, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (disponibles, por ejemplo, en los analizadores Elecsys™ o Cobas™), CBA (un ensayo enzimático de unión de Cobalut; disponible, por ejemplo, en los analizadores Roche-Hitachi™) y ensayos de aglutinación de látex (disponibles, por ejemplo, en los analizadores Roche-Hitachi™).
30 Entre los métodos y medios de medición se incluyen además los dispositivos de diagnóstico inmediato, tales como Cardiac Reader™ (disponible de Roche Diagnostics).

Los dispositivos de diagnóstico inmediato se entienden generalmente como dispositivos que permiten la medición en la habitación del paciente, aunque también permiten el análisis ambulatorio y la atención en el hogar. Un ejemplo es
35 Cardiac Reader™ (disponible de Roche Diagnostics), en combinación con, por ejemplo, tiras reactivas de ensayo para NT-proPNC (disponible como "Cardiac proBNP" de Roche Diagnostics). Dicho ensayo puede utilizar dos anticuerpos (preferentemente monoclonales) dirigidos contra el péptido de interés (por ejemplo un péptido de tipo PNC). Los anticuerpos pueden ser idénticos a los anticuerpos utilizados en, por ejemplo, los ensayos Elecsys™ o Cobas™. Por ejemplo, el primer anticuerpo se marca con biotina, mientras que el segundo anticuerpo se marca con partículas de oro. El ensayo puede iniciarse mediante la adición de una cantidad reducida (por ejemplo 150 µl) de muestra de sangre a la tira reactiva de ensayo (por ejemplo en un pocillo de muestra de la tira de ensayo). Los eritrocitos en la muestra pueden separarse del plasma antes o después de la adición de la tira de ensayo, por ejemplo en el caso de que la muestra fluya a través de una fibra adecuada (por ejemplo un tejido de fibra de vidrio). Dichos medios de separación (por ejemplo fibra) preferentemente son partes de la tira de ensayo. Los anticuerpos
40 (preferentemente ya presentes en la tira de ensayo) se disuelven en el plasma restante. Los anticuerpos son capaces de unirse al péptido o polipéptido de interés, formando un complejo de sándwich de tres componentes. Los anticuerpos (unidos o no) fluyen a través de la tira hacia el interior de una zona de detección. La zona de detección comprende medios para detectar el complejo unido, por ejemplo puede comprender estreptavidina. Ello inmoviliza los complejos y se visualiza el complejo inmovilizado en forma de una línea violeta como el anticuerpo marcado con el oro. Preferentemente, el anticuerpo marcado con oro libre restante a continuación puede seguir desplazándose hacia abajo en la tira, en donde es capturado en una zona que comprende un péptido o polipéptido sintético que comprende el epítipo del péptido de tipo PNC que debe detectarse, visualizado como una línea violeta separada. La presencia de dicha segunda línea puede servir de control, ya que indica que el flujo de muestra se ha producido correctamente y que el anticuerpo se encuentra intacto. La tira de ensayo puede comprender un marcaje que
45 indique qué péptido o polipéptido de interés puede detectarse con la tira. Puede comprender además un código de barras u otro código legible por un dispositivo de medición óptica de la cantidad de marcaje detectable en la zona de detección. Dicho código de barras puede incluir información que indique qué péptido o polipéptido de interés puede detectarse con la tira. El código de barras puede incluir además información específica de lote de la tira de ensayo.

60 El lector cardiaco mismo comprende una cámara (por ejemplo una cámara dispositivo de carga acoplada (cámara CCD)) que registre ópticamente la zona de detección de la tira de ensayo. Pueden identificarse líneas de señal y de control a partir de un algoritmo de reconocimiento de patrones. La intensidad del marcaje en la línea de señal típicamente es proporcional a la cantidad de péptido o polipéptido de interés. La señal óptica puede convertirse en

una concentración mediante una curva de calibración específica de lote que puede almacenarse en un chip de código. Puede comprobarse la concordancia entre el código de calibración y el lote de ensayo en un código de barras sobre la tira de ensayo.

5 Además, al experto en la materia le resultarán familiares los diferentes métodos de medición del nivel de péptido o polipéptido. El término "nivel" se refiere a la cantidad o concentración de un péptido o polipéptido en un paciente o en una muestra obtenida de un paciente.

10 El término "medir" según la presente invención se refiere a determinar la cantidad o concentración, preferentemente de manera semicuantitativa o cuantitativa, del ácido nucleico, péptido, polipéptido u otra sustancia de interés. La medición puede llevarse a cabo directa o indirectamente. La medición indirecta incluye la medición de respuestas celulares, ligandos unidos, marcajes o productos de reacción enzimática. Preferentemente, la medición se lleva a cabo in vitro.

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

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

25 En una realización preferente, el método para medir el nivel de un péptido o polipéptido de interés, en particular un péptido de tipo PNC, comprende las etapas de: (a) poner en contacto una célula capaz de una respuesta celular al péptido o polipéptido con el péptido o polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular.

30 En otra realización preferente, el método para medir el nivel de un péptido o polipéptido de interés, en particular un péptido de tipo PNC, comprende las etapas de: (a) poner en contacto un péptido o polipéptido con un sustrato adecuado durante un periodo de tiempo adecuado, (b) medir la cantidad de producto.

35 En otra realización preferente, el método para medir el nivel de un péptido o polipéptido de interés, en particular un péptido de tipo PNC, comprende las etapas de: (a) poner en contacto un péptido o polipéptido con un ligando de unión específica, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido

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

45 Pueden medirse los péptidos y polipéptidos (proteínas) en muestras de tejidos, células y líquidos corporales, es decir, preferentemente in vitro. Preferentemente, el péptido o polipéptido de interés se mide en una muestra de líquido corporal.

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

50 La expresión "muestra de líquido corporal" según la invención se refiere preferentemente a una muestra de sangre o derivados de la misma. Más preferentemente, la expresión se refiere a plasma o suero. Pueden obtenerse muestras de líquidos corporales mediante cualquier método conocido y que se considere apropiado.

55 Entre los métodos para obtener muestras celulares se incluyen la preparación directa de células individuales o pequeños grupos celulares, disociar tejido (por ejemplo utilizando tripsina) y separar células de líquidos corporales, por ejemplo mediante filtración o centrifugación. Las células según la presente invención comprenden además plaquetas y otras células no nucleares, por ejemplo eritrocitos.

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

Para medir las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión de un gen informador o la secreción de una sustancia, por ejemplo un péptido, polipéptido o una molécula pequeña.

Entre otros métodos preferentes para la medición pueden incluirse la medición de la cantidad de un ligando de unión

específica al péptido o polipéptido de interés. La unión según la presente invención incluye la unión tanto covalente como no covalente.

5 Un ligando según la presente invención puede ser cualquier péptido, polipéptido, ácido nucleico u otra sustancia de unión al péptido o polipéptido de interés. Es bien conocido que los péptidos o polipéptidos, obtenidos o purificados a partir de células humanas o animales, pueden modificarse, por ejemplo mediante glucosilación. Un ligando adecuado según la presente invención también puede unirse al péptido o polipéptido mediante dichos sitios.

10 Preferentemente, el ligando debería unirse específicamente al péptido o polipéptido que debe medirse. La expresión "unión específica" según la presente invención se refiere a que el ligando no debería unirse sustancialmente (no debería "reaccionar cruzadamente") con otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra investigada. Preferentemente, la proteína o isoforma unida específicamente debería unirse con una afinidad por lo menos 3 veces más alta, más preferentemente por lo menos 10 veces más alta, y todavía más preferentemente por lo menos 50 veces más alta que a cualquier otro péptido o polipéptido relevante. En el presente contexto, dichos otros péptidos o polipéptidos relevantes pueden ser otros péptidos o polipéptidos estructuralmente relacionados u homólogos.

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

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

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

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

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

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

45 El marcaje puede llevarse a cabo mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcaje directamente (covalente o no covalentemente) con el ligando. El marcaje indirecto implica la unión (covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con un marcaje adecuado y/o ser la diana (receptor) de la unión de un ligando terciario al ligando secundario. La utilización de ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior se utiliza con frecuencia para incrementar la señal. Entre los ligandos secundarios y de orden superior adecuados pueden incluirse anticuerpos, anticuerpos secundarios y el bien conocido sistema de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.).

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

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

Entre los marcajes enzimáticamente activos se incluyen, por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa

- 5 alcalina, β -galactosidasa, luciferasa y derivados de los mismos. Entre los sustratos adecuados para la detección se incluyen diaminobencidina (DAB), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como solución madre lista para utilizar de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences) y ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación de enzima-sustrato adecuada puede resultar en un producto de reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que puede medirse según métodos conocidos de la técnica (por ejemplo utilizando una película fotosensible o un sistema de cámara adecuado). Respecto a la medición de la reacción enzimática, se utilizan análogamente los criterios proporcionados anteriormente.
- 10 Entre los marcajes fluorescentes típicos se incluyen proteínas fluorescentes (tales como las proteínas fluorescentes derivadas de la medusa *Aequorea victoria* (por ejemplo GFP, YFP, RFP y derivados de los mismos) o el pólipo *Renilla reniformis*), Cy3, Cy5, rojo de Texas, fluoresceína, los pigmentos Alexa (por ejemplo Alexa 568) y puntos cuánticos. Se encuentran disponibles marcajes fluorescentes adicionales de, por ejemplo, Molecular Probes (Oregon).
- 15 Entre los marcajes radioactivos típicos se incluyen ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P , ^{33}P , ^3H y similares. Puede detectarse un marcaje radioactivo mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo una película fotosensible o un Phosphor-Imager.
- 20 Entre los métodos de medición adecuados según la presente invención se incluyen además la precipitación (particularmente la inmunoprecipitación), la electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), ensayos inmunológicos enzimáticos de tipo sándwich, inmunoensayos de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroinmunoensayo con lantánidos potenciado por la disociación (DELFI), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría potenciada por látex o nefelometría, ensayos inmunológicos en fase sólida y espectrometría de masas, tales como SELDI-TOF, MALDI-TOF o electroforesis capilar-espectrometría de masas (EC-EM). Pueden utilizarse métodos adicionales conocidos de la técnica (tales como la electroforesis en gel, la electroforesis en gel 2D, la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), transferencia Western) solos o en combinación con marcaje u otros métodos de detección tal como se ha indicado anteriormente.
- 25 Entre los ligandos preferentes se incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos y aptámeros, por ejemplo aptámeros de ácidos nucleicos o de péptidos (por ejemplo spiegelmeros o anticinalinas). Los métodos para obtener dichos ligandos son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, los proveedores comerciales también ofrecen la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados. Al experto en la materia le resultarán familiares los métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos de afinidad o especificidad más elevadas. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. A continuación, estos derivados pueden someterse a ensayo para la unión según procedimientos de cribado conocidos de la técnica, por ejemplo la expresión fágica.
- 30 El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como variantes o fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unirse a antígenos o haptenos. El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos de cadena sencilla.
- 35 En otra realización preferente, el ligando preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos o aptámeros, se encuentra presente en una matriz.
- Dicha matriz contiene por lo menos un ligando adicional, que puede dirigirse contra un péptido, polipéptido o ácido nucleico de interés. Dicho ligando adicional también puede dirigirse contra un péptido, polipéptido o ácido nucleico que no presenta ningún interés particular en el contexto de la presente invención. Preferentemente, se encuentran contenidos en la matriz ligandos de por lo menos tres, preferentemente de por lo menos cinco, más preferentemente de por lo menos ocho péptidos o polipéptidos de interés en el contexto de la presente invención.
- 40 Según la presente invención, el término "matriz" se refiere a un portador de fase sólida o de tipo gel al que se enganchan o unen por lo menos dos compuestos en una disposición de una, dos o tres dimensiones. Dichas matrices (incluyendo "chips génicos", "chips de proteínas", matrices de anticuerpos y similares) son generalmente conocidas por el experto en la materia y típicamente se generan sobre portaobjetos de vidrio para microscopía, especialmente portaobjetos de vidrio recubiertos, tales como portaobjetos recubiertos con policlones, nitrocelulosa o biotina, cubreobjetos y membranas tales como, por ejemplo, membranas basadas en nitrocelulosa o nilón.
- 45 La matriz puede incluir un ligando unido o por lo menos dos células cada una de las cuales expresa por lo menos un ligando.
- 50 En otra realización preferente, el ligando preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste de ácidos

nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, se encuentra presente sobre un soporte sólido, preferentemente una matriz. Según la presente invención, el término "matriz" (incluyendo "chips génicos", "chips de proteínas", matrices de anticuerpos y similares) se refiere a un portador de fase sólida o de tipo gel al que se enganchan o se unen por lo menos dos compuestos en una disposición de una, dos o tres dimensiones. Los soportes sólidos o matrices que comprenden un ligando o agente de unión para un péptido de tipo PNC son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, entre otros, materiales de columna disponibles comercialmente, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede unirse a muchos portadores diferentes. Entre los ejemplos de portadores bien conocidos se incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nilón, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando o agente son bien conocidos y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, las interacciones iónicas, hidrofóbicas y covalentes, y similares.

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

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

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

De esta manera, la exposición se refiere además a la utilización de medios diagnósticos capaces de medir, preferentemente in vitro, el nivel de un paciente de un péptido de tipo PNC, particularmente NT-proPNC, para el diagnóstico del riesgo de desarrollar una necesidad de diálisis.

La exposición se refiere además a un kit que comprende medios o un agente para medir un péptido de tipo PNC. Dichos medios o agentes pueden ser cualesquiera medios o agentes adecuados conocidos por el experto en la materia. Se proporcionan en la presente memoria ejemplos de dichos medios o agentes, así como métodos para su utilización. Por ejemplo, un agente adecuado puede ser cualquier tipo de ligando o anticuerpo capaz de unirse específicamente a un péptido de tipo PNC. El kit puede comprender además cualesquiera otros componentes que se consideren apropiados en el contexto de la medición del nivel o niveles de los marcadores biológicos respectivos, tales como tampones adecuados, filtros, etc.

Opcionalmente, el kit puede comprender además un manual para el usuario para la interpretación de los resultados de una o más mediciones cualesquiera con respecto al diagnóstico del riesgo de un paciente de desarrollar una necesidad de diálisis. En particular, dicho manual puede incluir información sobre qué nivel medido corresponde a qué grado de riesgo. Lo anterior se describe de manera general en otras partes de la presente memoria. Además, dicho manual para el usuario puede proporcionar instrucciones sobre cómo utilizar correctamente los componentes del kit de medición del nivel o niveles del marcador biológico respectivo.

La exposición se refiere además a la utilización de dicho kit para el diagnóstico del riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis. La presente invención se refiere además a la utilización de dicho kit en cualquiera de los métodos según la presente invención para el diagnóstico del riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis.

Además, la exposición comprende un dispositivo adaptado al diagnóstico del riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis, que comprende:

- a) medios para medir la cantidad de un péptido de tipo PNC en una muestra del paciente, y
- b) medios para diagnosticar dicho riesgo mediante la comparación entre el nivel medido y por lo menos un nivel de referencia.

La exposición se refiere además a la utilización de dicho kit para el diagnóstico del riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis.

El término "dispositivo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un sistema de medios que comprende por lo menos los medios anteriormente indicados operativamente unidos entre sí para permitir el diagnóstico del riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis. Los medios preferentes para medir el nivel de un péptido de tipo PNC y para diagnosticar el riesgo se dan a conocer en otras partes de la presente memoria en relación al método de la invención. Cómo enlazar los medios de una manera operativa dependerá del tipo de medios incluido en el dispositivo. Por ejemplo, en el caso de que se utilicen medios para medir automáticamente el nivel del péptido de tipo PNC, los datos obtenidos mediante dichos medios de funcionamiento automático pueden procesarse mediante, por ejemplo, un programa informático con el fin de diagnosticar el riesgo. Preferentemente, los medios se encuentran comprendidos en un único dispositivo en dicho caso. Dicho dispositivo puede incluir, de acuerdo con lo anterior, una unidad de análisis para medir el nivel del péptido de tipo PNC en una muestra y una unidad de ordenador para procesar los datos resultantes para el diagnóstico. Alternativamente, en el caso de que se utilicen medios tales como tiras de ensayo para medir el nivel del péptido de tipo PNC, los medios de diagnóstico pueden comprender tiras de control o tablas que asignen el nivel medido a un nivel de referencia según se define en otras partes de la presente memoria. Las tiras de ensayo preferentemente se acoplan con un ligando o agente que se une específicamente al péptido de tipo PNC. La tira o dispositivo preferentemente comprende medios para la detección de la unión del péptido de tipo PNC a dicho ligando o agente. Se dan a conocer los medios preferentes de detección en las realizaciones referentes al método de la invención descrito anteriormente. En este caso, los medios se encuentran asociados operativamente en el aspecto de que el usuario del sistema combina el resultado de la determinación de la cantidad y el valor diagnóstico del mismo según las instrucciones e interpretaciones proporcionadas en un manual. Los medios pueden aparecer como dispositivos separados en dicha realización y, preferentemente, se empaquetan juntos en un kit. El experto en la materia conocerá cómo asociar los medios sin mayor problema. Los dispositivos preferentes son aquellos que pueden utilizarse sin conocimientos particulares de un médico especializado, por ejemplo tiras de ensayo o dispositivos electrónicos que meramente requieran la carga de una muestra. Los resultados pueden proporcionarse como resultado de un parámetro diagnóstico o como datos en bruto que requieran la interpretación por parte del médico. Entre los dispositivos preferentes adicionales se incluyen unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo biosensores, matrices, soportes sólidos acoplados a ligandos o agentes que reconocen específicamente el PNC, dispositivos de resonancia del plasmón superficial, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masas, etc.) o unidades/dispositivos de evaluación a los que se ha hecho referencia anteriormente según el método de la invención.

El método según la presente invención comprende la etapa de diagnosticar el riesgo del paciente mediante la comparación del nivel medido del péptido de tipo PNC y por lo menos un nivel de referencia, por ejemplo con niveles conocidos asociados a grados diferentes de riesgo en un paciente.

Según la presente invención, el término "riesgo" se refiere a la probabilidad de que tenga lugar un incidente particular, más particularmente la necesidad de diálisis. Por ejemplo, un riesgo puede ser que el incidente dado vaya a tener lugar con una probabilidad de por lo menos 2%, 5%, 10%, 15% ó 20% en un paciente dado dentro de un marco temporal determinado. Preferentemente, el marco temporal para la predicción según la presente invención es de por lo menos 1 mes, por lo menos tres meses, por lo menos seis meses, por lo menos 9 meses, por lo menos 12 meses, por lo menos 15 meses, por lo menos 18 meses, por lo menos 21 meses o hasta 24 meses. Los estudios clínicos pueden proporcionar datos que indican dichos riesgos. A partir de lo anteriormente indicado, resulta evidente que el diagnóstico de dicho riesgo también permitirá predecir el intervalo temporal dentro del que, o transcurrido el cual, un paciente desarrollará la necesidad de diálisis. En general, cuanto más alto es el riesgo, más corto será el intervalo de tiempo. También permitirá determinar la probabilidad con la que un paciente desarrollará la necesidad de diálisis dentro de un intervalo temporal determinado.

El riesgo proporcionado puede derivarse, por ejemplo, de un gráfico de Kaplan-Meier adecuado de tiempo hasta producirse un incidente determinado; ver, por ejemplo, el Ejemplo 3 y también los riesgos y cocientes de riesgo particulares indicados en el mismo.

Aunque el riesgo puede expresarse como valores absolutos, con frecuencia puede resultar más útil expresar el riesgo en términos relativos ("riesgo relativo"), por ejemplo en términos de un riesgo incrementado o altamente incrementado respecto a un riesgo determinado concreto o a un grupo de control en un estudio clínico, a un paciente en otro estadio de insuficiencia renal o incluso en comparación con una persona sana normal de edad similar. Al experto en la materia le resultarán muy familiares dichas expresiones relativas. Por ejemplo, existe un riesgo determinado medio de desarrollar la necesidad de diálisis en la población general, en pacientes renales o en pacientes que sufren una enfermedad renal particular. Sin embargo, puede resultar más relevante conocer si un paciente particular presenta un riesgo adicional de desarrollar la necesidad de diálisis en comparación con un grupo de comparación respectivo (por ejemplo la población general, los pacientes renales o los pacientes que sufren una enfermedad renal particular mencionados), de manera que el riesgo total de este paciente se encuentra "incrementado". Ventajosamente, la presente invención también permite diagnosticar dicho riesgo relativo.

Un riesgo relativo puede expresarse en términos de cocientes de riesgo. La expresión "cociente de riesgos" es

conocida por el experto en la materia. Puede expresar la relación entre dos subgrupos, por ejemplo el cociente de riesgos entre un grupo que presenta un nivel bajo de péptido de tipo PNC y un grupo que presenta un nivel elevado de péptido de tipo PNC. Una diferencia de cocientes de riesgos es conocida como una interacción que debe extraerse de los modelos de interacción, por ejemplo de grupos de riesgo con determinados niveles de PNC. Las expresiones interacción y modelo de interacción son conocidas por el experto en la materia.

En particular, la presente invención permite identificar los pacientes con un determinado riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis. Por ejemplo, el riesgo puede encontrarse incrementado, no incrementado o reducido. Al experto en la materia le resultará familiar el significado de dichas expresiones. Por ejemplo, en el caso de que un paciente particular presente un riesgo más alto que un paciente medio, el experto en la materia habitualmente se referirá a dicho riesgo como "incrementado". Preferentemente, la expresión "riesgo incrementado" se refiere a que es más probable que el paciente desarrolle la necesidad de diálisis o que el paciente desarrolle la necesidad de diálisis antes que un paciente comparable medio. Preferentemente, debería realizarse un seguimiento de un paciente que presente un riesgo incrementado, con cuidados adicionales referentes al desarrollo de la necesidad de diálisis. El experto en la materia entenderá que la decisión final sobre el tratamiento será del médico responsable, quien considerará factores relevantes adicionales, tales como la edad del paciente, la historia familiar de trastornos renales, la naturaleza o etiología de un trastorno renal presente en el paciente, las opciones de tratamiento disponibles, la disponibilidad de las opciones de seguimiento, etc.

En el contexto de la invención, un riesgo incrementado de desarrollar la necesidad de diálisis se refiere en particular a un incremento del riesgo de por lo menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 3,5 veces ó 4 veces en comparación con el riesgo de un paciente medio, preferentemente de un paciente medio de la misma edad y género, más preferentemente respecto a un paciente de la misma edad, género y naturaleza o etiología del trastorno renal del paciente.

El experto en la materia es capaz de determinar los niveles conocidos de péptidos de tipo PNC que se asocian a diferentes grados de riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis.

Según la invención, cuanto más alto sea el nivel medido del péptido de tipo PNC, más alto será el riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis.

Preferentemente, el riesgo se determina mediante la comparación del nivel medido del péptido de tipo PNC y un nivel de referencia. La expresión "nivel de referencia" es conocida por el experto en la materia. En particular, un nivel de referencia puede asociarse a un riesgo particular o puede distinguir entre diferentes grados de riesgo. Se apreciará que el nivel de referencia también puede seleccionarse según la sensibilidad o especificidad deseada del diagnóstico. Una sensibilidad más elevada se refiere a que una fracción más alta del total de pacientes con un diagnóstico particular son identificados y/o que menos pacientes con un diagnóstico particular son erróneamente diagnosticados como libres de la enfermedad, complicación o riesgo diagnosticado. Una especificidad más elevada se refiere a que una fracción más alta de los pacientes identificados con un diagnóstico particular en efecto presentan la enfermedad, complicación o riesgo diagnosticado. Cuanto más alta sea la sensibilidad deseada para un diagnóstico concreto, más baja es la especificidad de este diagnóstico, y viceversa. Por lo tanto, el nivel de referencia puede ser seleccionado por el experto en la materia según la sensibilidad y especificidad deseadas.

En el contexto del presente comentario, resulta evidente que un nivel de referencia no sólo puede ser un valor individual, sino que también puede incluir un abanico de valores.

Más concretamente, los niveles de referencia pueden derivarse de los niveles de péptidos de tipo PNC determinados en, por ejemplo, estudios clínicos tales como los presentados en los ejemplos.

Se proporcionan posteriormente ejemplos de los niveles de referencia, es decir se proporcionan los niveles plasmáticos de NT-proPNC que se ha observado durante el curso de la invención que distinguen o se asocian a los grados de riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis.

Resulta evidente que los niveles proporcionados posteriormente sólo pueden servir como primera clasificación del riesgo de un paciente. Por ejemplo, el riesgo también puede depender del estado físico general del paciente y de la naturaleza del trastorno subyacente responsable de que se sospeche de un riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis.

Según la invención, por ejemplo, un nivel correspondiente a un nivel plasmático inferior a 500 pg/ml, más particularmente inferior a 400 pg/ml, todavía más particularmente inferior a 300 pg/ml de NT-proPNC no se asocia a ningún riesgo incrementado de desarrollar la necesidad de diálisis.

Según la invención, por ejemplo, un nivel correspondiente a un nivel plasmático igual o superior a 300 pg/ml, más

preferentemente igual o superior a 400 pg/ml, todavía más particularmente igual o superior a 500 pg/ml de NT-proPNC se asocia a un riesgo incrementado de desarrollar la necesidad de diálisis.

5 Resulta evidente que los niveles determinados pueden solaparse, dependiendo de la sensibilidad y especificidad seleccionadas. Por lo tanto, según la invención, un nivel correspondiente a un nivel plasmático de entre 300 y 500 pg/ml de NT-proPNC es capaz de distinguir entre un riesgo no incrementado y un riesgo incrementado de desarrollar la necesidad de diálisis. En el caso de que el nivel medido sea más alto que dicho nivel diferenciador, el nivel medido indica un riesgo incrementado de desarrollar la necesidad de diálisis. Dicho nivel diferenciador también puede denominarse "valor de corte" o "umbral de decisión". Dicho "valor de corte" o "umbral de decisión" puede
10 indicar al médico responsable si debe aplicar el tratamiento habitual según se ha planificado o iniciar el tratamiento o seguimiento considerando un riesgo incrementado de desarrollar la necesidad de diálisis.

15 El diagnóstico del riesgo de un paciente puede suponer consecuencias para el tratamiento posterior, tal como se indica posteriormente. Los grados de riesgo indicados posteriormente se refieren en particular a los grados de riesgo asociados a los niveles anteriormente indicados de NT-proPNC.

20 En el caso de que un método según la presente invención no indique un riesgo incrementado, el tratamiento puede continuarse según lo planificado. El tratamiento ESA puede acompañarse de un seguimiento adicional de los niveles de NT-proPNC a intervalos no estrictos, por ejemplo cada 4 semanas, 2 meses ó 3 meses.

25 En el caso de que un método según la presente invención indique un riesgo incrementado, el tratamiento puede adaptarse. Preferentemente, el tratamiento se acompaña de la medición adicional del nivel de los péptidos de tipo PNC de la invención y mediante el diagnóstico adicional, tal como el seguimiento de la función renal a intervalos más cortos, por ejemplo aproximadamente cada mes, preferentemente aproximadamente cada dos semanas, o aproximadamente cada semana.

La exposición se refiere además al seguimiento del riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis. Además, la exposición se refiere además al seguimiento adicional del riesgo tras el diagnóstico del riesgo.

30 El término "seguimiento" es conocido por el experto en la materia y se ha definido en otras partes de la presente memoria. El "seguimiento más estrecho" preferentemente se refiere al seguimiento a intervalos más cortos que para el paciente medio. Por ejemplo, el seguimiento más estrecho puede llevarse a cabo mediante el diagnóstico del riesgo del paciente a intervalos periódicos, por ejemplo a intervalos de aproximadamente 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses ó 1 año.
35

40 El término "aproximadamente" en dicho contexto es entendido por el experto en la materia. Por lo tanto, el intervalo real también puede apartarse de un intervalo periódico deseado según las circunstancias prácticas, tales como el establecimiento de tiempos de visita adecuados, etc. En particular, el intervalo puede, por ejemplo, apartarse hasta en el 100%, preferentemente hasta en el 50%, más preferentemente en hasta el 25%, más preferentemente en hasta el 10%.

El seguimiento presenta la ventaja adicional de que se observa si un determinado tratamiento ha tenido éxito o no en la reducción del riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis y/o en el retraso de la necesidad de diálisis.

45 Cualesquiera realizaciones o características preferentes indicadas en la presente descripción evidentemente se aplican correspondientemente al aspecto del seguimiento.

Se da a conocer un método para decidir un seguimiento más estrecho del riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis, en particular en un paciente con un trastorno renal, que comprende las etapas de:

- 50 (a) medir, preferentemente in vitro, el nivel de un péptido de tipo PNC,
(b) diagnosticar el riesgo del paciente de desarrollar la necesidad de diálisis mediante la comparación del nivel medido del péptido de tipo PNC con los niveles conocidos que se asocian a diferentes grados de riesgo en un paciente,
55 (c) recomendar el inicio del seguimiento más estrecho o la no realización de un seguimiento más estrecho. Preferentemente se recomienda un seguimiento más estrecho en el caso de que el método indique un riesgo incrementado de desarrollar la necesidad de diálisis. Resulta evidente que el método puede adaptarse según todas las realizaciones o aspectos preferentes de la invención indicados en la presente memoria.

60 Resulta evidente que cualesquiera medios y métodos proporcionados en la presente memoria pueden combinarse ventajosamente con otros medios y métodos adecuados que el experto en la materia considere apropiados, por ejemplo el diagnóstico del riesgo o el seguimiento según la invención pueden acompañarse de la medición de la tasa de filtración glomerular o de la determinación de los cambios de la tasa de filtración glomerular.

Finalmente, la exposición comprende además la utilización de los dispositivos indicados en la presente memoria o de un péptido de tipo PNC o de una variante del mismo, para el diagnóstico del riesgo de desarrollar la necesidad de diálisis.

5 La **figura** muestra gráficos de Kaplan-Meier que comparan los grupos de tratamiento basados en el criterio de valoración "necesidad de diálisis", A) curva de Kaplan-Meier de tiempo hasta la diálisis que muestra una desventaja para el grupo 1 (diálisis más temprana), B) gráfico de Kaplan-Meier de sucesos de diálisis frente a NT-proPNC de línea base que muestra que un nivel elevado de línea base de NT-proPNC conduce a una probabilidad más elevada de "necesidad de diálisis".

10

Los ejemplos a continuación ilustran la invención y no pretenden limitar su alcance en modo alguno.

Ejemplo 1: medición de NT-proPNC

15 Se determinó NT-proPNC mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (inmunoensayo de tipo sándwich de proPNC Elecsys; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un Elecsys 2010. El ensayo funciona según el principio de inmunoensayo de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia. En una primera etapa, el anticuerpo de captura IgG marcado con biotina (1-21), el anticuerpo de señal F(ab')₂ (39-50) marcado con rutenio y 20 microlitros de muestra se incubaron a 37°C durante 9 minutos. Posteriormente, se añadieron micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina y la mezcla se incubó durante 9 minutos adicionales. Tras la segunda incubación, la mezcla de reacción se transfirió a la celda de medición del sistema, en la que las perlas son capturadas magnéticamente sobre la superficie de un electrodo. Se eliminó el marcaje no unido mediante lavado de la celda de medición con tampón.

20

25 En la última etapa, se aplicó voltaje al electrodo en presencia de un tampón que contenía tripropilamina y la señal electroquimioluminiscente resultante se registró con un fotomultiplicador. Todos los reactivos y muestras se manipularon de manera totalmente automática en el instrumento Elecsys[®]. Los resultados se determinaron a partir de una curva de calibración, generada específicamente para el instrumento mediante una calibración de 2 puntos y una curva patrón proporcionada por el código de barras de los reactivos. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

30

Ejemplo 2: obtención de las muestras

35 Se muestreó la sangre para el análisis de péptidos de tipo PNC en tubos con EDTA que contenían 5.000 U de aprotinina (Trasylol, Beyer, Alemania) y tubos con litio-heparina (para la química clínica), según resultase apropiado. Se centrifugaron muestras de sangre y orina inmediatamente durante 10 minutos a 3.400 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta el análisis.

35

Ejemplo 3: NT-proPNC es un marcador de la necesidad de diálisis

40

El estudio CREATE era un estudio multicéntrico abierto, aleatorizado, de grupos paralelos, con el fin de investigar el efecto de la corrección precoz de la anemia con epoetina beta sobre la reducción del riesgo cardiovascular en pacientes con anemia renal crónica no sometidos a terapia de sustitución renal. El objetivo principal del estudio era investigar el efecto del tratamiento precoz con epoetina beta hasta un nivel diana de hemoglobina (Hb) de 13 a 15 g/dl sobre la morbilidad cardiovascular y comparar estos efectos con los alcanzados con el tratamiento de epoetina beta para mantener un nivel diana de Hb de entre 10,5 y 11,5 g/dl. La variable de valoración principal era la variable combinada de todos los sucesos cardiovasculares especificados en el protocolo (tiempo hasta el primer suceso): angina de pecho que conduce a la hospitalización durante como mínimo 24 h o prolongación de la hospitalización, insuficiencia cardíaca aguda, infarto de miocardio fatal o no fatal, ictus fatal o no fatal, muerte súbita, ataque isquémico cerebral transitorio (AIT), enfermedad vascular periférica (amputación, necrosis), arritmias cardíacas que conducen a la hospitalización durante como mínimo 24 h o prolongación de la hospitalización. Entre otras se investigó la necesidad de diálisis como variable de valoración secundaria de los pacientes.

45

50

55 En el sub-estudio de NT-proPNC se realizaron mediciones de laboratorio adicionales en la línea base y tras 6, 12, 24, 36 y 48 meses para un subgrupo de los pacientes en el estudio CREATE. Las mediciones realizadas eran de NT-proPNC y algunas otras mediciones de laboratorio.

55

60 Se realizó un seguimiento de la cohorte de estudio completa, incluyendo los pacientes del subestudio de NT-proPNC, para la incidencia de sucesos incluidos en la variable de valoración primaria predefinida del estudio y todas las variables de valoración secundarias del estudio, incluyendo tiempo hasta la diálisis. Todos los sucesos respectivos, incluyendo la necesidad de diálisis, fueron clasificados por los comités independientes respectivos de las variables de valoración o por personal médico profesional de Roche en el estudio siguiendo procedimientos operativos estándares (POE) de Roche. Se recogió y evaluó la necesidad de iniciar terapia de sustitución renal, tal

60

como diálisis o trasplante de riñón, en la página específicamente destinada a ello del impreso de informe de caso de cada paciente. Se evaluaron los datos correspondientes siguiendo un plan predefinido de análisis estadístico.

5 En un primer análisis preliminar, los niveles de línea base de NT-proPNC de 266 pacientes de la población del estudio CREATE se estratificaron en 2 grupos de tratamiento ("Hb alto"=valor diana de Hb de entre 13 y 15 g/dl y "Hb bajo"=valor diana de Hb de entre 10,5 y 11,5 pg/dl). Además, los grupos se dividieron según la mediana preliminar del nivel de NT-proPNC de la cohorte entera (>400 y <400 pg/ml). El tiempo hasta la diálisis definido como variable de valoración del estudio se representó en un gráfico de Kaplan-Meier (por ejemplo la fracción de la población que no había experimentado este suceso particular). Fig. 1 Se calcularon los cocientes de riesgo (es decir, el factor por el que se incrementa o se reduce el riesgo respectivo) y se consideraron significativos los valores de p<0,05. Se generó un gráfico de Kaplan-Meier para el tiempo hasta el desarrollo de la necesidad de diálisis (fig. 1). En la Tabla 1 a continuación se proporciona una vista global de las tasas de incidencia (ignorando los tiempos en que se produjeron los sucesos) de los 2 grupos de tratamiento.

15 Tabla 1:

	Necesidad de diálisis		Total
	NT-proBNP <400 pg/mL	NT-proBNP ≥400 pg/mL	
Hb bajo	29,7 % (22 de 74)	41,3 % (33 de 80)	35,7 % (55 de 154)
Hb alto	29,0 % (20 de 69)	51,5 % (35 de 68)	40,1 % (55 de 137)
Total	29,4 % (42 de 143)	45,9 % (68 de 148)	37,8 % (110 de 291)

Los pacientes con valores superiores a 400 pg/ml en comparación con pacientes con valores inferiores a 400 pg/ml desarrollaron con más frecuencia (diferencia estadísticamente significativa) la necesidad de diálisis en ambos grupos de estrategia de tratamiento, con un cociente de riesgos más alto para el grupo "Hb alto".

20 En la Tabla 2, a continuación, se proporcionan los factores de riesgo de desarrollado de la necesidad de diálisis conjuntamente con los valores de p correspondientes para diversos parámetros, incluyendo los niveles de NT-proPNC, los niveles de Hb y de eliminación de creatinina, determinados basándose en los resultados del estudio descrito anteriormente en la presente memoria.

25 Tabla 2:

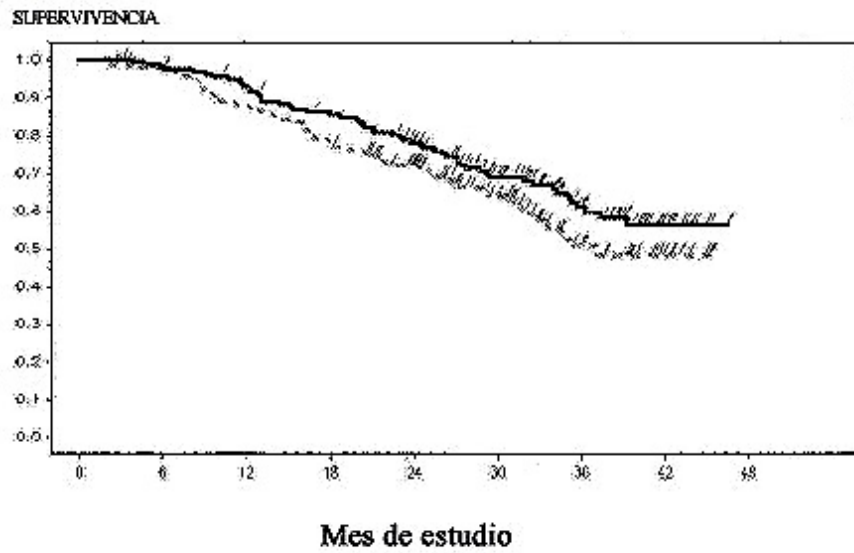
Factores de riesgo de necesidad de diálisis			
	Riesgo relativo	IC al 95%	valor de p
Enfermedades cardiovasculares anteriores	3,54	1,08, 11,6	0,036
NT-proPNC de línea base ≤400 pg/ml	0,45	0,29, 0,70	0,0003
Hb de línea base ≥11 g/dl	0,61	0,37, 0,93	0,05
Eliminación de línea base de creatinina (incremento ≥1 ml/min)	0,84	0,78, 0,91	<0,0001
Eliminación de línea base de creatinina (15 a 25 ml/min)	0,31	0,13, 0,74	0,009
Infarto de miocardio	0,15	0,04, 0,58	0,006

REIVINDICACIONES

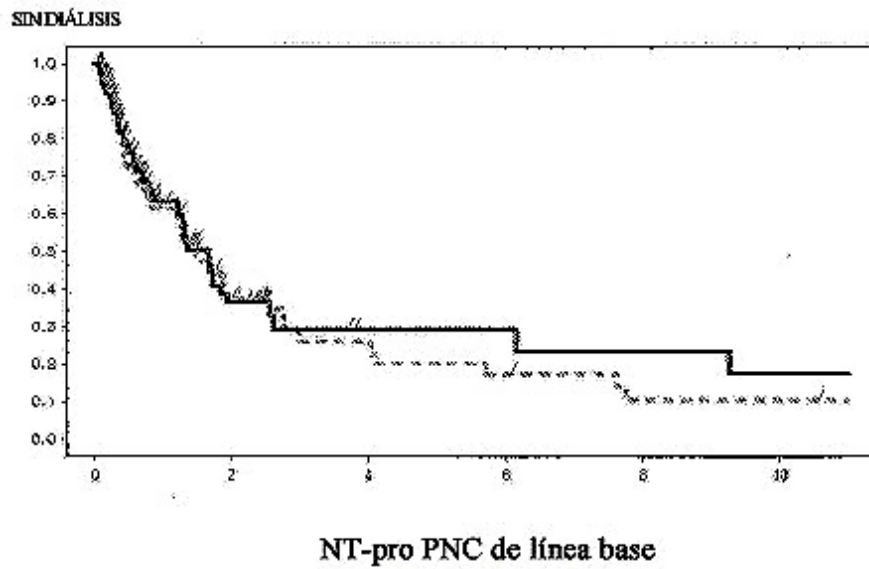
1. Método para el diagnóstico de la probabilidad de desarrollar la necesidad de diálisis en un paciente, presentando dicho paciente enfermedad renal crónica, que comprende las etapas de:
- 5 a) medir el nivel de NT-proPNC en una muestra del paciente, b) diagnosticar la probabilidad mediante la comparación entre el nivel medido de NT-proPNC y por lo menos un nivel de referencia,
- 10 en el que dicho sujeto sufre de enfermedad cardíaca concomitante seleccionada de entre el grupo de insuficiencia cardíaca crónica y enfermedad cardíaca isquémica crónica, y en el que el nivel de referencia corresponde a un nivel plasmático de NT-proPNC de 300 a 500 pg/ml.
2. Método según la reivindicación 1, en el que un nivel medido superior al nivel de referencia indica que la probabilidad se encuentra incrementada.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que la probabilidad incrementada se refiere a un incremento de por lo menos 3 veces en comparación con la probabilidad de un paciente medio de la misma edad, género y trastorno que causa la disfunción renal.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nivel de NT-proPNC se mide utilizando un ligando de unión específica.

Figura

A)



B)



..... Grupo 1
———— Grupo 2