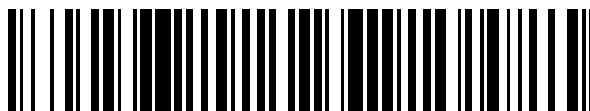


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 578**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009 E 09731279 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2265957**

54 Título: **Proendotelina-1 para la predicción del consumo de oxígeno máximo disminuido**

30 Prioridad:

09.04.2008 EP 08154267
28.01.2009 EP 09151573

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2013

73 Titular/es:

B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE

72 Inventor/es:

STRUCK, JOACHIM;
MORGENTHALER, NILS;
BERGMANN, ANDREAS y
MÜLLER, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 431 578 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

Proendotelina-1 para la predicción del consumo de oxígeno máximo disminuido.

5 El objeto de la presente invención es un procedimiento *in vitro* para la predicción del consumo de oxígeno (VO₂) máximo disminuido en un paciente que no padece insuficiencia cardíaca;

- determinando la concentración de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos en una muestra extraída de dicho paciente;

10 - utilizando dicha concentración de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos como un marcador sustituto para el VO₂ máximo.

15 Otro objeto de la invención es la utilización de este procedimiento para la evaluación de riesgos antes de la cirugía no cardíaca.

La utilización clínica de esfuerzo cardiopulmonar máximo (CPET) con la medición de VO₂ máximo es muy conocida (Cappuccio *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.* 1991; 21:40-6; Benzo *et al.*, *Respir. Med.* 2007; 101: 1790-7; Bolliger *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 151:1472-80; Brutsche *et al.*, *Eur. Respir. J.* 2000; 15:828-32; Butler *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 43:787-93; Isnard *et al.*, *Am. J. Cardiol.* 2000; 86:417-21; Isnard *et al.*, *Am. Heart J.* 2003; 146: 729-35). Sin embargo, debido al equipo requerido, al tiempo, así como un alto grado de conocimiento tanto por el técnico como por el médico, el CPET no es una técnica muy aplicada. En particular, la estimación de VO₂ máximo basada en la carga de trabajo máxima alcanzada durante una prueba de esfuerzo estándar sin técnicas de intercambio de gases, es decir, velocidad y grado de la cinta o la resistencia de la bicicleta ergométrica, puede estar asociada a imprecisiones significativas, en particular en pacientes con baja capacidad de esfuerzo (Benzo *et al.*, *Chest* 2007; 132; 1500-5, Myers *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 1991; 17:1334-42), y es una alternativa insuficiente al CPET. Por lo tanto, las alternativas disponibles rápida y fácilmente a la evaluación del VO₂ máximo serían muy deseables. En un estudio anterior entre pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (HF), se ha propuesto el péptido natriurético tipo B (BNP) como una herramienta bioquímica para la diferenciación de pacientes con capacidad de esfuerzo severa y moderadamente disminuida (Kruger *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40:718-22). (BNP procede de un péptido precursor más grande, proBNP, que puede escindirse proteolíticamente en BNP y proBNP N-terminal (NT-proBNP)). Sin embargo, otros estudios en pacientes con HF han dado a conocer que la correlación entre el BNP y el VO₂ máximo podría no ser suficientemente fuerte para la evaluación fiable del VO₂ máximo (Brunner-La Rocca *et al.*, *Heart* 1999; 81:121-7, Maeder *et al.*, *Int. J. Cardiol* 2007; 120:391-8). Además, se requiere la estimación de la capacidad de esfuerzo no sólo en los pacientes con HF. Estudios similares para grupos de pacientes menos seleccionados y estudios con otros biomarcadores no están disponibles.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención era encontrar otro marcador como sustituto para la evaluación del VO₂ máximo por CPET. Un marcador sustituto según la presente invención es un sustituto para la evaluación directa del VO₂ máximo por CPET.

El marcador evaluado en la presente invención está relacionado con la endotelina-1. La endotelina (ET)-1 es un potente vasoconstrictor endógeno proveniente del endotelio (13). La ET-1 ejerce sus efectos vasculares por la activación de los receptores ET(A) y ET(B) en las células del músculo liso, lo que provoca un aumento del calcio intracelular (Yanagisawa *et al.*, *J. Hypertens. Suppl.* 1988; 6:S188-91). La ET-1 endógena contribuye significativamente al tono vascular en reposo (Spratt *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 2001; 134:648-54), y se ha demostrado la vasoconstricción mediada por el receptor ET(A) para explicar, por lo menos en parte la respuesta vasodilatadora alterada para el esfuerzo en pacientes hipertensos (McEniery *et al.*, *Hypertension* 2002; 40:202-6). Se han encontrado concentraciones elevadas de ET-1 en condiciones asociadas a la capacidad disminuida para el esfuerzo, incluyendo después del infarto de miocardio (Omland *et al.*, *Circulation* 1994; 89:1573-9) y HF (Wei *et al.*, *Circulation* 1994; 89:1580-6), así como la neumonía obstructiva crónica (NOC) (Ferri *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 1995; 48:519-24). En pacientes con HF, una correlación entre la ET-1 y VO₂ máximo se ha sugerido anteriormente (Kinugawa *et al.*, *J. Card. Fail.* 2003; 9:318-24). Pacientes con HF parecen presentar un aumento de neurohormonas incluyendo ET-1 ya sin prueba de esfuerzo. También se han descrito los efectos del entrenamiento con ejercicios atléticos de fuerza y resistencia en jóvenes en la concentración de endotelina-1 en el plasma y la distensión arterial (Otsuki *et al.*, *Experimental biology and medicine*, 2006, 231, nº 6, 789-793).

El objeto de la presente invención era el suministro de un marcador de VO₂ máximo en pacientes no seleccionados, especialmente en pacientes que no padecen insuficiencia cardíaca.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es un procedimiento *in vitro* para la predicción de deficiencias del VO₂ máximo (<14 ml/kg/min) para un paciente que no padece insuficiencia cardíaca:

• determinar la concentración de proendotelina-1 (ProET- 1) o de fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos en una muestra obtenida de dicho pacientes;

- utilizar dicha concentración de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos como marcador sustituto para el VO₂ máximo.

En una forma de realización preferida del procedimiento según la invención, la muestra se extrajo de dicho paciente en reposo y por lo tanto se determinan las concentraciones en reposo de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos.

En otra forma de realización preferida del procedimiento según la invención, se determina la concentración de proendotelina-1 (ProET-1) o de fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos además del índice de peso corporal a máxima carga de trabajo (WL_{máx}) en la bicicleta y en el que la medición de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos conduce a una mejora de la precisión de WL_{máx} para la predicción de alteraciones del VO₂ máximo (<14 ml/kg/min). WL_{máx} es la carga máxima alcanzada durante CEPT dividido por el peso corporal del paciente [vatios/kg].

El VO₂ max o VO₂ máximo (también consumo máximo de oxígeno, absorción máxima de oxígeno o capacidad aeróbica) es la capacidad máxima del cuerpo de una persona para transportar y utilizar el oxígeno durante el esfuerzo progresivo, lo que refleja el estado físico de la persona. El VO₂ máximo está definido adecuadamente por la ecuación de Fick: VO₂ máx = Q(CaO₂ - CvO₂), en donde Q es el gasto cardíaco del corazón, CaO₂ es el contenido de oxígeno arterial, y CvO₂ es el contenido de oxígeno venoso. En las pruebas clínicas y deportivas en general, la medición del VO₂ máx por lo general implica una prueba de esfuerzo escalonado (ya sea en una cinta para correr o en una bicicleta ergométrica) en el que la intensidad del esfuerzo se aumenta progresivamente, mientras se mide la ventilación y la concentración de oxígeno y dióxido de carbono del aire inhalado y exhalado. La VO₂ máx se alcanza cuando el consumo de oxígeno se mantiene en estado estacionario a pesar del aumento de la carga de trabajo. El VO₂ max es ampliamente aceptado como una buena medida de la salud cardiovascular y la potencia aeróbica máxima.

Un marcador sustituto según la presente invención es un sustituto para la evaluación directa del VO₂ máximo por CPET.

La evaluación del VO₂ máximo (VO₂ max) debe considerar el sexo y la edad de la persona. Un VO₂ máximo de 14 (ml/kg/min) o menos puede considerarse como muy reducida, ya que con frecuencia se califica un trasplante de corazón (<http://www.brianmac.co.uk/vo2max.htm>), véase la figura 3.

La endotelina-1 procede de una molécula precursora más grande denominada proendotelina-1. La proendotelina-1 puede degradarse proteolíticamente en varios fragmentos según se describe (Struck J., Morgenthaler N.G., Bergmann A. Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor in vivo. Peptides. Dic. 2005; 26 (12):2482-6.). Estos fragmentos están sujetos a la degradación proteolítica en la circulación de la sangre, lo cual puede suceder rápida o lentamente, dependiendo del tipo de fragmento y del tipo y concentración/actividad de las proteasas presentes en la circulación. Por lo tanto, según la presente invención, se puede determinar la concentración de cualquiera de estos fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos, preferentemente fragmentos de por lo menos 20 aminoácidos, más preferentemente de por lo menos 30 aminoácidos. Preferentemente, se puede determinar la pro-ET-1 del C-terminal (CT-proET-1) o de un fragmento de la misma.

En otra forma de realización preferida de la invención, se determina la concentración de proBNP o fragmentos del mismo de por lo menos 12 aminoácidos incluyendo BNP o NT-proBNP, además de la WL_{máx} y en el que la determinación de proBNP o fragmentos del mismo de por lo menos 12 aminoácidos conduce a una mejora en la precisión de WL_{máx} para la predicción de alteraciones del VO₂ máximo. Por lo tanto, según la presente invención, se puede determinar la concentración de cualquiera de estos fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos, preferentemente fragmentos de por lo menos 20 aminoácidos, más preferentemente de por lo menos 30 aminoácidos.

En una forma de realización especialmente preferida, se determina tanto la concentración de proendotelina-1 (ProET-1) como de fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos y proBNP o fragmentos del mismo de por lo menos 12 aminoácidos incluyendo BNP o NT-proBNP, además de WL_{máx} y en la que la determinación de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos y proBNP o fragmentos del mismo de por lo menos 12 aminoácidos incluyendo BNP o NT-proBNP conduce a una mejora en la precisión de WL_{máx} para la predicción de deficiencias en VO₂ máximo. Cuando se utilizan CT-proET-1 y BNP como fragmentos de sus precursores, los valores límite preferibles son 74,4 pmol/l y 35,9 pg/ml, respectivamente. Por lo tanto, la utilización de estos dos biomarcadores en combinación con una prueba de esfuerzo estándar para la predicción de un pico VO₂ máximo con muchas deficiencias es objeto de la presente invención.

Es objeto de la presente invención además la utilización de proendotelina-1, preferentemente CT-proET-1, en la práctica clínica en situaciones en las que una estimación semicuantitativa del VO₂ máximo parece suficiente, por ejemplo, para la evaluación de riesgos antes de la intervención quirúrgica no cardíaca. Para intervenciones quirúrgicas de bajo o mediano riesgo en pacientes sin factores de riesgo importantes, tales como la angina de pecho, la HF sintomática o la diabetes, las directrices sugieren una capacidad umbral de esfuerzo de cuatro

equivalentes metabólicos como el criterio para decidir acerca de la necesidad de las pruebas no invasivas adicionales (Eagle *et al.*, *Circulation* 2002; 105:1257-67).

Por lo tanto, es objeto de la presente invención la utilización de CT-proET-1 para la evaluación del riesgo preoperatorio. También se podría considerar una combinación de BNP y CT-proET-1.

Según la presente invención dicha muestra que se extrae de un sujeto que no tiene insuficiencia cardíaca se selecciona del grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma.

Según una forma de realización preferida de la invención, dicha concentración de CT-proET-1 (o fragmentos de la misma) se determina con un inmunoanálisis de tipo sándwich. Se ha descrito un ejemplo de dicho inmunoanálisis de tipo sándwich (Papassotiropoulos J., Morgenthaler N.G., Struck J., Alonso C., Bergmann A. Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma. *Clin. Chem.* Jun. 2006; 52 (6):1144-1151).

En lugar de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos del mismo puede utilizarse otro marcador sustituto seleccionado de entre el grupo que comprende pro-adrenomedulina o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos incluyendo MR-proADM, CT-proADM, adrenomedulina y PAMP (DE 103 16 583.5, DE 10 2006 060 11; Beltowski J., Jamroz A. Adrenomedullin-what do we know 10 years since its discovery? *Pol. J. Pharmacol.* 2004 Ene-Feb; 56 (1): 5-27; Struck J., Tao C., Morgenthaler N.G., Bergmann A. Identification of an Adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. *Peptides* agosto 2004; 25(8):1369-72).

En el contexto de la presente invención, el término "concentración" se refiere a las concentraciones de los marcadores, se refiere a la cantidad de la entidad molecular mencionada en el contexto respectivo, o en el caso de las enzimas también puede referirse a la actividad enzimática.

Como se ha mencionado en la presente memoria en el contexto de proteínas o péptidos, el término "fragmento" se refiere a las proteínas o péptidos más pequeños provenientes de proteínas o péptidos mayores, que comprenden por lo tanto, una secuencia parcial de la proteína o péptido mayor. Dichos fragmentos provienen de las proteínas o péptidos mayores por saponificación de uno o más de sus enlaces peptídicos.

Como se ha mencionado en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo de diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Dicho ensayo se puede basar en la unión de un analito para ser detectado a una o más sondas de captura con una determinada afinidad. En cuanto a la interacción entre las moléculas de captura y las moléculas diana o las moléculas de interés, la constante de afinidad es preferentemente mayor de 10^8 M^{-1} .

Los métodos de detección preferidos comprenden inmunoanálisis en diversos formatos tales como, por ejemplo, radioinmunoanálisis, quimioluminiscencia e inmunoanálisis por fluorescencia, inmunoanálisis con enzima ligada (ELISA), matrices de microesferas Luminex, ensayos de microchips de proteínas, y formatos de pruebas rápidas tales como, por ejemplo, pruebas con tiras inmunocromatográficas.

Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos de sándwich competitivos y no competitivos. En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo es en forma de un ensayo de tipo sándwich, que es un inmunoanálisis no competitivo, en el que la molécula que va a detectarse y/o cuantificarse está unida a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede estar unido a una fase sólida, por ejemplo, una microesfera, una superficie de un pocillo o de otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que está marcado, por ejemplo con un colorante, con un radioisótopo, o con un reactivo o resto catalíticamente activo. La cantidad de anticuerpo marcado unido al analito se determina a continuación por un método apropiado. La composición general y los procedimientos implicados en los "ensayos en sándwich" en están muy demostrados y son conocidos por los expertos en la materia. (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford, 3ª ed. (mayo de 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C. *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006 Feb; 10 (1): 4-10 PMID: 16376134).

En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferentemente anticuerpos que están presentes en forma de dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en donde un primer componente de marcaje está unido a la primera molécula de captura, en el que dicho primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje por fluorescencia o extinción de quimioluminiscencia o amplificación, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje se une a la segunda molécula de captura, de modo que tras la unión de las dos moléculas de captura al analito se genera una señal mensurable que permite la detección de los complejos de tipo sándwich formados en la solución que comprende la muestra.

Todavía más preferentemente, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierras raras o quelatos de tierras raras en combinación con un colorante de fluorescencia o un colorante de quimioluminiscencia, en particular, un colorante de tipo cianina.

En el contexto de la presente invención, los ensayos de fluorescencia comprenden la utilización de colorantes, que se puede seleccionar por ejemplo de entre el grupo que comprende FAM (5- o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, colorantes de cianina, tales como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, CY7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2'7'-dimetoxifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxi-rodamina-6G (R5G5), 6-carboxi-rodamina-6G (RG6), rodamina, rodamina verde, rodamina roja, Rodamina 110, colorantes BODIPY, tales como BODIPY TMR, verde Oregon, cumarinas tales como la umbeliferona, benzimidazoles, tales como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como rojo de Texas, amarillo Yakima, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, colorantes de Acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes Polimetina y similares.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en quimioluminiscencia comprenden la utilización de colorantes, a base de los principios físicos descritos para materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 4ª ed., editor ejecutivo, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol.15, págs. 518-562, incorporado en la presente memoria como referencia, incluyendo las citas en las páginas 551-562. Los colorantes quimioluminiscentes preferidos son los ésteres de acridinio.

En el contexto de ensayos, "sondas de captura" son moléculas que se pueden usar para unir moléculas diana o las moléculas de interés, es decir, analitos de una muestra. Las moléculas de captura por lo tanto deben ser conformadas adecuadamente, tanto en el espacio como desde el punto de vista de características superficiales, tales como carga en superficie, hidrofobia, hidrofilia, la presencia o ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para unir específicamente las moléculas diana o las moléculas de interés. Por la presente memoria, la unión puede por ejemplo ser mediada por interacciones iónicas, de Van-der-Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrófobo o de enlace de hidrógeno o una combinación de dos o más de las interacciones mencionadas entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, moléculas de captura se pueden seleccionar por ejemplo de entre el grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de APN, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glicoproteína. Preferiblemente, las moléculas de captura son anticuerpos, incluyendo fragmentos de los mismos con suficiente afinidad por un objetivo o molécula de interés, e incluyendo anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpos recombinantes, así como derivados química y/o bioquímicamente modificados de dichos anticuerpos o fragmentos provenientes de la cadena variante con una longitud de por lo menos 12 aminoácidos de la misma.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos tales como "marcador" "marcador(es) de pronóstico, parámetro(s) o factor(es)" o "biomarcador" o "marcador biológico" se utilizan indistintamente y se refieren a parámetros biológicos mensurables y cuantificables (por ejemplo, concentración de la enzima específica, concentración de la hormona específica, distribución específico del fenotipo génico en una población, presencia de sustancias biológicas) que sirven como índices para las evaluaciones relacionados con la salud y la fisiología, tales como el riesgo de enfermedad, los trastornos psiquiátricos, la exposición al ambiente y sus efectos, el diagnóstico de enfermedades, procesos metabólicos, la drogadicción, el embarazo, el desarrollo de estirpes celulares, los estudios epidemiológicos, etc. Por otra parte, un biomarcador se define como una característica que se mide y se evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Un biomarcador se puede medir en una muestra biológica (como sangre, orina, o prueba de tejido), puede ser un registro obtenido de una persona (presión arterial, ECG o Holter), o puede ser una prueba de diagnóstico por la imagen (ecocardiografía o tomografía axial computerizada) (Vasan *et al.* 2006, *Circulation* 113:2335-2362).

Los biomarcadores pueden indicar una variedad de características de salud o enfermedad, incluyendo el nivel o tipo de exposición a un factor ambiental, la sensibilidad genética, las respuestas genéticas a las exposiciones, los biomarcadores de la enfermedad subclínica o clínica, o los indicadores de respuesta al tratamiento. Por lo tanto, una manera simplista para pensar de los biomarcadores es como indicadores de características de enfermedades (factor de riesgo o biomarcadores de riesgo), estado de la enfermedad (preclínico o clínico) o la tasa de la enfermedad (evolución). Por consiguiente, los biomarcadores pueden clasificarse como biomarcadores de antecedentes (identificando el riesgo de desarrollar una enfermedad), biomarcadores de detección (detección de la enfermedad subclínica), biomarcadores de diagnóstico (reconociendo la enfermedad declarada), biomarcadores de estadificación (clasificando la gravedad de la enfermedad) o biomarcadores de pronóstico (prediciendo el curso futuro de la enfermedad, incluyendo la recaída y la respuesta al tratamiento, y seguimiento de la eficacia de la terapia). Los biomarcadores también pueden servir como criterios sustituto. Un criterio sustituto es el que puede utilizarse como un resultado en los ensayos clínicos para evaluar la seguridad y la eficacia de las terapias en lugar de la medición del resultado verdadero de interés. El principio subyacente es que las alteraciones en el criterio sustituto siguen de cerca los cambios en los resultados de interés. Los criterios sustitutos tienen la ventaja de que pueden ser reunidos en un marco de tiempo más corto y con menos gastos que los criterios, tales como la morbilidad y la mortalidad, que requieren grandes ensayos clínicos para la evaluación. Los valores adicionales de los criterios sustitutos incluyen el hecho de que están más próximos a la exposición/intervención de interés y pueden ser más fáciles de relacionar causalmente que los episodios clínicos más distantes. Un inconveniente importante de los criterios sustitutos es que si el resultado clínico de interés está influido por numerosos factores (además del criterio sustituto), la confusión residual puede reducir la validez del criterio sustituto. Se ha sugerido que la validez de un criterio sustituto es mayor

si puede explicar, por lo menos el 50% del efecto de una exposición o intervención en el resultado de interés. Por ejemplo, un biomarcador puede ser una proteína, péptido o una molécula de ácido nucleico.

5 "Pacientes" en el contexto de la invención, se entiende que son todas las personas o animales, independientemente de si presentan o no cambios patológicos, a menos que se indique lo contrario. En el contexto de la invención, cualquier muestra recogida de células, tejidos, órganos, organismos o similares, puede ser una muestra de un paciente que va a ser diagnosticado. En una forma de realización preferida, el paciente según la invención es un ser humano.

10 Una "muestra" en el contexto de la invención pueden ser todos los tejidos y todos los líquidos biológicos tales como la linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, saliva, suero o heces. Los tejidos pueden ser, por ejemplo, tejido epitelial, tejido conectivo, tal como hueso o sangre, tejido muscular, tales como el músculo visceral o liso y el músculo esquelético y, tejido nervioso, médula ósea, cartílago, piel, mucosas o cabello. La muestra se recoge del paciente o se somete al diagnóstico según la invención. Cuando proceda, como por ejemplo en el caso de muestras
15 sólidas, puede ser necesario disolver, homogeneizar o extraer la muestra con un disolvente antes de su uso en la presente invención a fin de obtener una muestra de líquida. Una muestra líquida por este medio puede ser una solución o suspensión. Las muestras líquidas pueden someterse a uno o más pretratamientos antes de su uso en la presente invención. Dichos pretratamientos incluyen, pero no se limitan a la dilución, filtración, centrifugación, concentración, sedimentación, precipitación o diálisis. Los pretratamientos pueden incluir también la adición de
20 sustancias químicas o bioquímicas a la solución, tales como ácidos, bases, tampones, sales, disolventes, colorantes reactivos, detergentes, emulsionantes o quelantes.

Descripción de las figuras

25 Figura 1:

Título: Relación entre el consumo máximo de oxígeno, la carga de trabajo externa y los biomarcadores

30 Leyenda: Gráficos de dispersión que ilustran las correlaciones entre el consumo máximo de oxígeno (VO_2 máximo) y el péptido natriurético tipo B (BNP, gráfico A), proendotelina-1-C-terminal (CT-proET-1, gráfico B), y el índice de peso corporal a máxima carga de trabajo externa en la bicicleta ($\text{WL}_{\text{máx}}$, gráfico C) y, así como la correlación entre BNP y CT-proET-1 (gráfico D). Se dan los coeficientes de correlación de Spearman. Téngase en cuenta la escala logarítmica para el VO_2 máximo y BNP.

35 Figura 2:

Título: Precisión de biomarcadores solos o combinados con carga de trabajo externa para la predicción de un consumo máximo de oxígeno $<14 \text{ ml/kg/min}$.

40 Leyenda: Gráfico A: Curvas características de receptor-operador (CRO) que muestran el ABC (con intervalos de confianzas del 95%) para la predicción de un VO_2 máximo $<14 \text{ ml/kg/min}$ para el péptido natriurético tipo B (BNP) y proendotelina-1-C-terminal (CT-proET-1) en descanso. Gráfico B: Curvas CRO que muestran el ABC (con intervalos de confianzas del 95%) para la predicción de un VO_2 máximo $<14 \text{ ml/kg/min}$ para el BNP y la CT-proET-1 en reposo y en esfuerzo máximo. Gráfico C: Curvas CRO que muestran el ABC para la predicción de un VO_2 máximo
45 $<14 \text{ ml/kg/min}$ para el BNP y la CT-proET-1 en reposo e índice de peso corporal a máxima carga de trabajo ($\text{WL}_{\text{máx}}$) en la bicicleta. Para una mejor comparación con BNP y CT-proET-1 se muestra la curva CRO para $1/\text{WL}_{\text{máx}}$. Además se muestran la sensibilidad y 1-especificidad de las combinaciones de los límites óptimos para $\text{WL}_{\text{máx}}$ con límites óptimos para CT-proET-1 y BNP. Las flechas indican la sensibilidad y 1-especificidad del límite óptimo de $\text{WL}_{\text{máx}}$ ($\rightarrow$) y las combinaciones de $\text{WL}_{\text{máx}}$, CT-proET-1 y BNP para conseguir especificidad óptima ($\blacktriangleright$) o sensibilidad ($\bullet\blacktriangleright$).

50 Figura 3:

VO_2 máx medio varía entre mujeres y hombres.

55 Figura 4:

(a) Curvas características receptor-operador (CRO) que muestran las áreas bajo la curva (ABC) para el péptido natriurético tipo B (BNP), la puntuación de cinco unidades de BNP, y la puntuación de seis unidades [adición de proendotelina-1-C-terminal (CT-pre-ET-1)] para la predicción de un consumo máximo de oxígeno (VO_2 máximo) $<14 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.
60

(b) Curvas CRO que muestran el ABC de CT-proET-1, la puntuación de cinco unidades de CT-proET-1, y la puntuación de seis unidades (además de BNP) para la predicción de un VO_2 máximo $<14 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Ejemplos

Sumario

5 El presente estudio de una muestra representativa de pacientes no seleccionados remitidos para CPET pusieron de manifiesto dos importantes conclusiones: En primer lugar, CT-proET-1 medida en reposo se relacionó con el VO_2 máximo y tenía una gran precisión en la predicción de VO_2 máximo drásticamente disminuido y por eso superado el BNP. En segundo lugar, la medición adicional de CT-proET-1 y BNP llevó a una notable mejora en la precisión de $\text{WL}_{\text{máx}}$ para la predicción de VO_2 máximo drásticamente disminuido.

Procedimientos

Población del estudio

15 Desde mayo de 2004 a junio de 2005, 185 pacientes consecutivos remitidos para CPET para la evaluación de la intolerancia al esfuerzo inexplicable fueron seleccionables para su inclusión. Se excluyeron los pacientes sin autorización por escrito ($n = 12$) y pacientes sin determinación de CT-pro-ET-1 y/o BNP ($n = 11$). Esto dejó un total de 162 pacientes para el presente análisis. Este estudio fue aprobado por el comité de ética local. La autorización por escrito se consiguió de todos los pacientes participantes.

Procedimientos del CPET

Se sometió a los pacientes a ejercicio de pedaleo erguidos limitado por síntomas utilizando protocolos de rutina con un electrocardiograma de 12 derivaciones registrando cada minuto de ejercicio y seguimiento continuo del electrocardiograma durante la prueba. Se aplicaron los siguientes criterios de valoración de la prueba: agotamiento físico, angina de pecho grave, arritmia ventricular constante o hipotensión de esfuerzo. Los gases espirados se captaron continuamente, y el consumo de oxígeno (VO_2) y la producción de dióxido de carbono (VCO_2) se registraron en promedios sucesivos de 30 segundos. La calibración del sistema se llevó a cabo antes de cada ensayo con una jeringa de 3 litros. El índice de intercambio respiratorio (RER), definido como VCO_2 dividido por VO_2 , se determinó durante todo el ensayo. Se suponía esfuerzo máximo si se cumplía por lo menos uno de los siguientes criterios: 1. frecuencia cardíaca máxima $> 80\%$ prevista, 2. $\text{RER} > 1,2$, 3. lactato a máximo esfuerzo $> 4,5 \text{ mmol/l}$, o 4. exceso de base $> -2,5 \text{ mmol/l}$ (Schmid *et al.*, *Respirology* 2007; 12:916-23). Estos criterios se han utilizado en nuestro laboratorio de CPET durante años y reflejan los principios establecidos en las directrices de la American Thorax Society/American College of Chest Physicians (ATS/ACCP Statement on cardiopulmonary exercise testing, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167:211-77). La capacidad de esfuerzo se expresó como VO_2 máximo medido directamente y la índice de peso corporal a máxima carga de trabajo ($\text{WL}_{\text{máx}}$) en la bicicleta.

Toma de muestras de sangre y procedimientos de laboratorio

40 Se extrajo una muestra de sangre venosa antes y un minuto después de esfuerzo máximo en posición de sentado de un catéter previamente insertado en la vena antecubital. Estas muestras se recogieron en tubos de plástico que contienen etilendiamintetra-acetato. Se colocaron en hielo y a continuación se centrifugaron a 3.000 g, y el plasma se congeló a -80°C . Todas las muestras de plasma se analizaron aproximadamente un año después de la toma. El técnico del laboratorio que realizó los ensayos estaba en un lugar diferente y con las características de los pacientes y resultados del CPET ocultos. Se detectó CT-proET-1 utilizando un nuevo ensayo disponible en el mercado en formato de tubo revestido con quimioluminiscencia (BRAHMS AG, Hennigsdorf/Berlín, Alemania) como se describió anteriormente (Papassotiropoulos *et al.*, *Clin. Chem.* 2006; 52:1144-51; Khan *et al.*, *Am. Heart J.* 2007; 154:736-42). La concentración de BNP se determinó utilizando el ensayo AxSYM BNP que puede adquirirse en el mercado (Abbott Laboratories, Zug, Suiza) (Mueller *et al.*, *Clin. Chem.* 2004; 50:1104-6). Este inmunoanálisis enzimático de micropartícula totalmente automatizado utiliza dos anticuerpos monoclonales de ratón en un formato de dos etapas. Armonizándose a la prueba de BNP Biosite, tiene un intervalo dinámico de 1-4000 pg/ml.

Análisis estadístico

55 Los datos se expresaron en números y porcentajes, media $\pm$ desviación estándar, y la mediana (intervalo intercuartil) a menos que se indique lo contrario. La distribución normal de los datos se probó con la utilización de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se hicieron comparaciones utilizando las pruebas de la ji al cuadrado o exacta de Fisher, pruebas de la t para datos independientes o pruebas no paramétricas, según correspondiera. Para comparar las concentraciones de BNP (log-transformado debido a desigual distribución) y CT-proET-1 en reposo y en esfuerzo máximo se realizó análisis de varianza para medidas repetidas. Se realizaron correlaciones entre los parámetros de interés utilizando los coeficientes de correlación de Spearman.

Se construyeron curvas CRO para evaluar la sensibilidad y especificidad de TC-proET-1 y BNP a todas las concentraciones y $\text{WL}_{\text{máx}}$ para detectar un VO_2 máximo $< 14 \text{ ml/kg/min}$. Este límite se seleccionó basándose en su valor pronóstico probado en pacientes con HF (Cappuccio *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.* 1991; 21:40-6) y el hecho de que corresponde a cuatro equivalentes metabólicos, que es un límite frecuentemente utilizado para la diferenciación

de la capacidad de esfuerzo severa y moderadamente disminuida para la estratificación del riesgo preoperatorio (Eagle *et al.*, *Circulation* 2002; 105, 1257-67). Se calcularon la sensibilidad, especificidad, valor pronóstico positivo y valores pronóstico negativos de los límites óptimos de biomarcadores y $WL_{\text{máx}}$, así como su combinación. Se compararon las curvas CRO utilizando el método de DeLong *et al.* (DeLong *et al.*, *Biometrics* 1988; 44:837-45) utilizando un programa informático especializado (Analyse-it V2.04, Leeds, Reino Unido). Se realizaron otros análisis estadísticos utilizando SPSS/PC (versión 15.0, SPSS Inc, Chicago, IL). Todas las pruebas de hipótesis fueron de dos colas. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Pacientes

En la Tabla 1 se presentan las características de los pacientes que consiguen un VO_2 máximo < 14 ml/kg/min ($n = 39$) frente a ≥ 14 ml/kg/min ($n = 123$). Los pacientes con un VO_2 máximo < 14 ml/kg/min eran de mayor edad, con más sobrepeso, eran más propensos a tener arteriopatía coronaria, arteriopatía obstructiva periférica, neumopatía obstructiva crónica e hipertensión pulmonar, eran más propensos a ser tratados con bloqueantes beta, inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona, diuréticos, nitratos, aspirina y estatinas, y eran más sintomáticos que los pacientes con VO_2 máximo ≥ 14 ml/kg/min.

CPET

En la Tabla 2 se muestran los resultados del CPET. La frecuencia cardíaca máxima, la presión arterial sistólica máxima, y por definición, las medidas de capacidad de esfuerzo fueron inferiores en los pacientes con VO_2 máximo < 14 ml/kg/min que en aquellos con VO_2 máximo ≥ 14 ml/kg/min. El volumen espiratorio forzado en el primer segundo y la relación entre el volumen espiratorio forzado en el primer segundo y la capacidad vital forzada fue menor, y la frecuencia respiratoria en reposo fue mayor en los pacientes con un VO_2 máximo < 14 ml/kg/min. La presión arterial de oxígeno en esfuerzo máximo, pero no en reposo y la presión del dióxido de carbono arterial en reposo, pero no en esfuerzo máximo fueron menores, y el gradiente alvéolo-arterial tanto en reposo como en esfuerzo máximo fue mayor en los pacientes con un VO_2 máximo < 14 ml/kg/min en comparación con aquellos con un VO_2 máximo ≥ 14 ml/kg/min.

Cinéticas de CT-proET-1 y BNP

En la Tabla 3, se muestran los niveles de biomarcadores en reposo y en esfuerzo máximo, así como cambios absolutos y relativos desde reposo hasta esfuerzo máximo en pacientes con un VO_2 máximo < 14 ml/kg/min frente a ≥ 14 ml/kg/min. Las concentraciones de CT-proET-1 y BNP en reposo ($p < 0,001$ para ambos) y en esfuerzo máximo ($p < 0,001$ para ambos) fueron mayores en los pacientes con un VO_2 máximo < 14 ml/kg/min en comparación con aquellos con un VO_2 máximo ≥ 14 ml/kg/min. Hubo un aumento significativo en CT-pro-ET-1 y BNP desde reposo hasta esfuerzo máximo en los pacientes con VO_2 máximo < 14 ml/kg/min y ≥ 14 ml/kg/min. Los cambios absolutos y relativos en CT-proET-1 y BNP fueron similares en ambos grupos.

Relación entre CT-proET-1, BNP y $WL_{\text{máx}}$ y VO_2 máximo

Como se muestra en la Figura 1, hubo un aumento estadísticamente significativo, pero sólo correlaciones moderadas entre CT-proET-1 y BNP y VO_2 máximo (gráficos A y B). Por el contrario, $WL_{\text{máx}}$ y VO_2 máximo estaban estrechamente relacionados (gráfico C). También hubo una correlación moderada entre CT-proET-1 y BNP (gráfico D).

CT-proET-1 y BNP en reposo para la predicción de un VO_2 máximo < 14 ml/kg/min

En la Figura 2A, se muestran las curvas CRO para las concentraciones de CT-proET-1 y BNP en descanso para la predicción de un VO_2 máximo < 14 ml/kg/min. El área bajo la curva (ABC) para CT-proET-1 fue de 0,76 [intervalo de confianza del 95% (HF del 95%) 0,68-0,84; $p < 0,001$], y el ABC para BNP fue de 0,65 (HF del 95% 0,54-0,75; $p = 0,006$). La comparación de las curvas reveló una diferencia significativa a favor de la CT-proET-1 ($p = 0,03$). El límite óptimo de CT-proET-1 de 74,4 pmol/l tenía una sensibilidad del 74% y una especificidad del 74%, y el límite óptimo de BNP de 35,9 pg/ml tenía una sensibilidad del 80% y una especificidad del 51% para la predicción de un VO_2 máximo < 14 ml/kg/min.

CT-proET BNP y en esfuerzo máximo para la predicción de un VO_2 máximo < 14 ml/kg/min

En la Figura 2B se muestran las curvas CRO para CT-proET-1 y BNP no sólo en reposo, sino también en esfuerzo máximo. El ABC para CT-proET-1 y BNP medido en esfuerzo máximo fueron 0,76 (HF del 95% 0,65-0,83; $p < 0,001$) y 0,65 (HF del 95% 0,54-0,75; $p < 0,001$), respectivamente. El límite de CT-proET-1 para esfuerzo máximo óptimo de 74,0 pmol/l tenía una sensibilidad del 80% y una especificidad del 67%, y el límite de BNP para el esfuerzo máximo óptimo de 128,2 pg/ml tenía una sensibilidad del 44% y una especificidad del 82%. Por lo tanto, los valores medidos en esfuerzo máximo no se añaden a la información obtenida de las concentraciones en reposo.

WL_{máx} combinado con biomarcadores para la predicción de un VO₂ máximo <14 ml/kg/min

Como era de esperar, WL_{máx} tenía una alta precisión aunque no perfecta para la predicción de un VO₂ máximo <14 ml/kg/min [ABC de 0,92 (HF del 95% 0,88-0,96), $p < 0,001$]. Un límite óptimo de 1,22 vatios/kg tuvo una sensibilidad del 87% y una especificidad del 85%. Como se muestra en la Figura 2C, el ABC de WL_{máx} (representado como 1/vatio por kilogramo de peso corporal) fue mejor que la de BNP ($p < 0,001$) y CT-proET-1 ($p < 0,001$). Debe apreciarse que se necesita un límite de 1,50 vatios/kg para lograr una sensibilidad del 100% (especificidad 67%), y que podría conseguirse una especificidad del 100% si se seleccionase un límite para WL_{máx} de 0,72 vatios/kg (sensibilidad del 15%).

En la Tabla 4 se muestran las características de la prueba de los límites óptimos para WL_{máx} y los biomarcadores, así como sus combinaciones. El uso añadido de CT-proET-1 o/y BNP mejoró la especificidad y el valor predictivo positivo de WL_{máx} para la predicción de un VO₂ máximo <14 ml/kg/min de 85% y 65%, respectivamente, hasta un máximo de 97% y 85%, respectivamente. Por otro lado, no había ningún paciente sin ningún valor de la prueba patológica (es decir, BNP <35,9 pg/ml, CT-pro-ET <74,4 pmol/l, WL_{máx} >1,22 vatios/kg) que tuviera un VO₂ máximo <14 ml/kg/min, es decir la sensibilidad y el valor predictivo negativo de esta combinación fueron del 100%, mientras que la sensibilidad y el valor predictivo negativo del límite óptimo de WL_{máx} solo eran de 85% y 95%, respectivamente.

En la Figura 2C, se aprecia el impacto de la CT-proET-1 y BNP añadido a WL_{máx} para la predicción de un VO₂ máximo <14 ml/kg/min. Es obvio que, en particular, CT-proET-1 o una combinación de CT-proET-1 y BNP podría mejorar la sensibilidad y especificidad del límite óptimo para WL_{máx}.

BNP y CT-proET-1 combinados con otros parámetros para la predicción de un VO₂ máximo <14 ml kg⁻¹ min⁻¹

El ABC para FEV₁, D(A-a)O₂ e IMC para la predicción de un VO₂ máximo <14 ml kg⁻¹ min⁻¹ fueron 0,77 [intervalo de confianza del 95% (HF del 95%) 0,68-0,87; $p < 0,001$], 0,76 (HF del 95%: 0,66-0,85, $P < 0,001$) y 0,65 (HF del 95% 0,53-0,78, $P = 0,01$), respectivamente. Los límites óptimos y las características de la prueba se muestran en la Tabla 4. El ABC para PaCO₂ no mostró un resultado estadísticamente significativo ($P = 0,07$). Una puntuación de cinco unidades con un punto de puntuación para FEV₁ <1,88 L, D(A-a)O₂ > 28 mm Hg, IMC > 28 kg m⁻², presencia de diabetes y BNP > 37,2 pg ml⁻¹ tuvo una ABC de 0,88 (Fig. 4a). Si esta puntuación se extendió a una puntuación de seis unidades con otro unidad de puntuación para CT-proET-1 > 74,4 pmol l⁻¹, el ABC de esta puntuación de seis unidades aumentó a 0,92 (Fig. 4a). Una puntuación de cero tenía la sensibilidad y el valor predictivo negativo del 100%, y una puntuación de seis tenía una especificidad y un valor predictivo positivo del 100% (Tabla 4). Si la puntuación de cinco unidades similares se construía con FEV₁, D(A-a)O₂, IMC, la diabetes y CT-proET-1 > 74,4 pmol l⁻¹, el ABC de esta puntuación fue de 0,91 (Fig. 4b).

Más límites del VO₂ máximo para CT-proET-1 y BNP

Se determinó también la precisión de los dos biomarcadores para la predicción de un VO₂ máximo <20 ml kg⁻¹ min⁻¹ ($n = 90$), que es el límite para una capacidad de esfuerzo disminuida según la clasificación de Weber (Weber *et al.*, *Circulation* 1987; 76: VI40-5). El ABC para BNP y CT-proET-1 fueron 0,76 (HF del 95% 0,68-0,84, $P < 0,001$) y 0,75 (HF del 95% 0,67-0,84, $P < 0,001$), respectivamente. Por el contrario, el ABC de BNP y CT proET-1 para la predicción de un VO₂ máximo ≤ 84% del valor predicho ($n = 103$), que es el límite para una capacidad de esfuerzo disminuida según las directrices del CPET (ATS / ACCP statement on cardiopulmonary exercise testing, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167: 211-77) sólo fueron 0,63 (HF del 95%: 0,53-0,73, $P = 0,02$) y 0,58 (HF del 95%: 0,47-0,68; $P = 0,17$), respectivamente.

Tabla 1. Características de los pacientes

	VO ₂ máximo <14 ml/kg/min (n=39)	VO ₂ máximo ≥14 ml/kg/min (n=123)	Valor P
Edad (años)	62±14	54 ± 16	0,007
Sexo masculino (%)	20 (51%)	75 (61%)	0,28
Índice de masa corporal (kg/m ²)	28,5 ± 5,5	25,5 ±4,1	<0,001
Antecedentes personales			
Arteriopatía coronaria	15 (38%)	18 (15%)	0,001
Infarto de miocardio anterior	10 (26%)	11 (9%)	0,007
Cardiopatía valvular	2 (5%)	4 (3%)	0,59
Otras cardiopatías	3 (8%)	10 (8%)	0,93
Enfermedad oclusiva arterial periférica	4 (10%)	1 (1%)	0,003
Neumopatía obstructiva crónica	17 (44%)	22 (18%)	0,001
Asma bronquial	3 (8%)	13 (11%)	0,60
Otras neumopatías	9 (23%)	45 (37%)	0,12
Hipertensión arterial pulmonar	5 (13%)	5 (4%)	0,048
Diabetes mellitus	11 (28%)	7 (6%)	0,001
Hipertensión	20 (50%)	32 (26%)	0,01
Función ventricular izquierda (n = 82)			
Fracción de expulsión ventricular izquierda (%)	52 (30-60) n = 23	60 (55-65) n = 49	0,001
Disfunción diastólica LV	13 (57%) n = 23	27 (55%) n = 49	0,38
Función renal			
Tasa de filtración glomerular (ml/min)	91±42	99±34	0,26
Terapia médica			
β-bloqueante	19 (49%)	27 (22%)	0,001
IECA/ARB	17 (44%)	26 (21%)	0,006
Diurético	17 (44%)	21 (17%)	0,001
Estatina	16 (41%)	24 (20%)	0,007
Aspirina	14 (36%)	22 (18%)	0,018
Broncodilatadores	15 (38%)	31 (25%)	0,11
Corticosteroides inhalados	12 (31%)	28 (23%)	0,31
Corticosteroides orales	6 (15%)	21 (17%)	0,81
Síntomas			
Clase funcional de disnea			<0,001
NYHA I	6 (15%)	32 (26%)	
NYHA II	10 (26%)	63 (51%)	
NYHA III	22 (56%)	25 (20,5%)	
NYHA intervalo	1 (3%)	3 (2,5%)	
Angina de pecho típica	7 (18%)	4 (3%)	0,32
Angina atípica/dolor de pecho	3 (8%)	5 (4%)	0,36
Los datos se expresan en recuentos y porcentajes, media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartil). IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueante del receptor de angiotensina. NYHA: New York Heart Association			

Tabla 2. Prueba de esfuerzo cardiopulmonar.

	VO ₂ máximo <14 ml/kg/min (n=39)	VO ₂ máximo ≥ 14 ml/kg/min (n=123)	Valor P
Frecuencia cardíaca y respuesta de la presión arterial			
Frecuencia cardíaca en reposo (lpm)	82 ± 15	79 ± 14	0,30
Frecuencia cardíaca máxima (lpm)	114 ± 18	139 ± 27	<0,001
% de la frecuencia cardíaca prevista	71 ± 12	84 ± 14	<0,001
La presión arterial sistólica en reposo (mm Hg)	126 ± 26	123 ± 18	0,34
Presión arterial diastólica en reposo (mmHg)	84 ± 13	85 ± 11	0,66
Presión arterial sistólica máxima (mm Hg)	166 ± 31	180 ± 32	0,019
Presión arterial diastólica máxima (mmHg)	92 ± 17	91 ± 15	0,77
Capacidad de esfuerzo			
Duración del esfuerzo (minutos)	4,6 (3,7 a 5,5)	6,5 (5,3-8,0)	<0,001
Carga de trabajo máxima (vatios)	81 (65-92)	129 (99-166)	<0,001
% de carga máxima de trabajo previsto	62± 23	89 ± 25	<0,001
Carga de trabajo máxima corregida por el peso corporal (vatios/kg)	0,98 (0,84-1,13)	1,73 (1,33-2,24)	<0,001
VO ₂ máximo (l/min)	0,93 (0,76-1,07)	1,47 (1,16-1,92)	<0,001

	VO ₂ máximo <14 ml/kg/min (n=39)	VO ₂ máximo ≥ 14 ml/kg/min (n=123)	Valor P
% de VO ₂ máximo predicho	52 ± 14	80 ± 18	<0,001
VO ₂ máximo corregido por peso corporal (ml/kg/min)	11,7 (10,5-13,1)	19,8 (16,5-25,0)	<0,001
Índice de intercambio respiratorio a máximo esfuerzo	1,12 (1,01-1,28)	1,18 (1,0-1,27)	0,23
Lactato en reposo (mmol/l)	1,3 (1,1-1,7)	1,0 (0,7-1,4)	0,005
Lactato en esfuerzo máximo (mmol/l)	4,2 (3,0-5,3)	6,3 (4,3-8,5)	<0,001
Ventilación			
FEV ₁ (l)	1,86 ± 0,73	2,55 ± 0,83	<0,001
FEV ₁ (% predicho)	70 ± 20	84 ± 20	<0,001
Relación FEV ₁ /FVC	0,71 (0,60-0,74)	0,73 (0,67-0,79)	0,044
Ventilación máxima por minuto (l/min)	45,8 ± 14,7	66,2 ± 22,2	<0,001
Frecuencia respiratoria en reposo (min ⁻¹)	21 (17-27)	19 (15-22)	0,02
Frecuencia respiratoria máxima (min ⁻¹)	34 (28-39)	36 (30-41)	0,14
Reserva respiratoria (%)	29 ± 19	30 ± 16	0,84
Gases en la sangre			
Hemoglobina (g/l)	13,9 ± 1,9	14,4 ± 1,6	0,11
Carboxihemoglobina (%)	1,5 (1,2-2,7)	1,5 (1,2-2,1)	0,94
Saturación de oxígeno en reposo (%)	95 (93-96)	95 (94-96)	0,50
Saturación de oxígeno en esfuerzo máximo (%)	95 (90-96)	95 (93-97)	0,90
PaO ₂ en reposo (mm Hg)	81 ± 17	84 ± 13	0,42
PaO ₂ en esfuerzo máximo (mm Hg)	83 ± 24	92 ± 17	0,011
PaCO ₂ en reposo (mm Hg)	33 ± 5	36 ± 5	0,003
PaCO ₂ en esfuerzo máximo (mm Hg)	34 ± 7	35 ± 5	0,14
D(A-a)O ₂ en reposo (mm Hg)	29 ± 14	20 ± 12	<0,001
D(A-a)O ₂ en esfuerzo máximo (mmHg)	33 ± 20	23 ± 15	0,003

Los datos se expresan en media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartil).

FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; VO₂ máximo: Consumo máximo de oxígeno; PaO₂: presión arterial de oxígeno; PaCO₂: presión arterial de dióxido de carbono; D(A-a)O₂: gradiente alveolo-arterial.

Tabla 3. Concentraciones de péptido natriurético tipo B (BNP) y de pro-endotelina-1-C-terminal (CT-proET-1) en reposo y en esfuerzo máximo y cambios absolutos (ΔBNP, ΔCT-proET-1) y relativos (% ΔBNP, % ΔCT-proET-1) desde el reposo hasta el esfuerzo máximo.

5

	VO ₂ máximo <14 ml/kg/min (n=39)	VO ₂ máximo ≥ 14 ml/kg/min (n=123)	Valor P
BNP en reposo (pg/ml)	46 (37-270)	35 (15-84)	0,006
BNP en esfuerzo máximo (pg/ml)	79 (40-270) *	44 (22-98) *	0,006
ΔBNP (pg/ml)	9 (0-41)	9 (0-21)	0,51
% ΔBNP	8 (0-40)	15 (0-41)	0,53
CT-proET-1 en reposo (pmol/l)	87,3 ± 25,8	66,9 ± 23,9	<0,001
CT-proET-1 en esfuerzo máximo (pmol/l)	91,2 ± 30,0 *	69,0 ± 24,3*	<0,001
ΔCT-proET-1 (pmol/l)	3,9 ± 8,9	1,8 ± 8,6	0,15
%Δ CT-proET-1	3,9 ± 9,4	2,9 ± 15,3	0,70

Los datos se expresan en media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartil).

* p <0,05 para comparación con el reposo

Tabla 4. Características de la prueba de los límites óptimos de péptido natriurético tipo B (BNP), pro-endotelina-1 C-terminal (CT-pro-ET-1), y la carga de trabajo de la bicicleta externa indexada al peso corporal máximo (WL_{máx}) sola o en combinación para la predicción de un consumo de oxígeno máximo <14 ml/kg/min.

10

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	PPV (%)	NPV (%)
BNP > 35,9 pg/ml	80	51	34	89
CT-proET-1 > 74,4 pmol/l	74	74	48	90
WL _{máx} <1,22 vatios/kg	87	85	65	95
BNP > 35,9 pg/ml + CT-proET-1 > 74,4 pmol/l	64	82	53	88
BNP > 35,9 pg/ml + WL _{máx} <1,22 vatios/kg	69	90	69	90
CT-proET-1 > 74,4 pmol/l + WL _{máx} <1,22 vatios/kg	64	95	81	89
BNP > 35,9 pg/ml + CTpro-ET-1 > 74,4 pmol/l + WL _{máx} <1,22 vatios/kg	56	97	85	88
FEV ₁ <1,88 l	63	80	46	89
D(A-a)O ₂ > 28 mm Hg	63	74	40	88

ES 2 431 578 T3

IMC > 28 kg m ⁻²	57	77	40	87
Puntuación de 0 en puntuación de seis unidades	100	26	27	100
Puntuación de 6 en puntuación de seis unidades	3	100	100	79
Sin valor de prueba patológica	100	40	35	100
VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo				

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* como sustituto para la medición del VO_2 máximo para un paciente que no padece insuficiencia cardíaca que comprende las etapas siguientes:
 - determinar la concentración de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos en una muestra obtenida de dicho paciente;
 - utilizar dicha concentración de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos como un marcador sustituto para el VO_2 máximo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra se tomó de dicho paciente en reposo y por lo tanto se determinan las concentraciones en reposo de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2 para la evaluación del consumo máximo de oxígeno drásticamente disminuido.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, en el que se mide la concentración de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos, además de $\text{WL}_{\text{máx}}$ y en el que la medición de proendotelina-1 (ProET-1) o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos conduce a una mejora en la precisión de $\text{WL}_{\text{máx}}$ para la predicción del VO_2 máximo disminuido.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, en el que se mide adicionalmente la concentración de proBNP o fragmentos del mismo de por lo menos 12 aminoácidos que incluyen BNP o NT-proBNP.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, en el que se mide CT-proET-1 y se utiliza un valor umbral de 74,4 (+/- 20%) pmol/l.
7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que se mide el BNP y se utiliza un valor umbral de 35,9 (+/- 20%) pg/ml.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma.
9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha concentración de proendotelina-1 (ProET-1) o de fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos es medida con un inmunoanálisis de tipo sándwich.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en el que además para la determinación de la concentración de proendotelina-1 (ProET-1) o de fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos se mide un número de n marcadores adicionales que presentan una correlación con el VO_2 máximo y en el que un valor de 1 o 0 se dirige a cada marcador, dependiendo de si el resultado obtenido para dicho marcador es indicador de una probabilidad aumentada de consumo de oxígeno máximo drásticamente disminuido para dicho sujeto o no, en el que se calcula una puntuación a partir la suma de los valores dirigida a la totalidad de dichos marcadores, de tal manera que resulta una puntuación entre 0 y n+1, y en el que una puntuación más alta se dirige a una probabilidad mayor de consumo de oxígeno máximo drásticamente disminuido para dicho paciente.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que los marcadores adicionales son $\text{FEV}_{1\text{L}}$, índice de masa corporal, gradiente alvéolo-arterial, la presencia de diabetes y proBNP o fragmentos del mismo de por lo menos 12 aminoácidos que incluyen BNP o NT-proBNP.
12. Utilización de un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 11 para la evaluación del riesgo de los pacientes, que son considerados candidatos para una intervención quirúrgica no cardíaca.

Figura 1 A

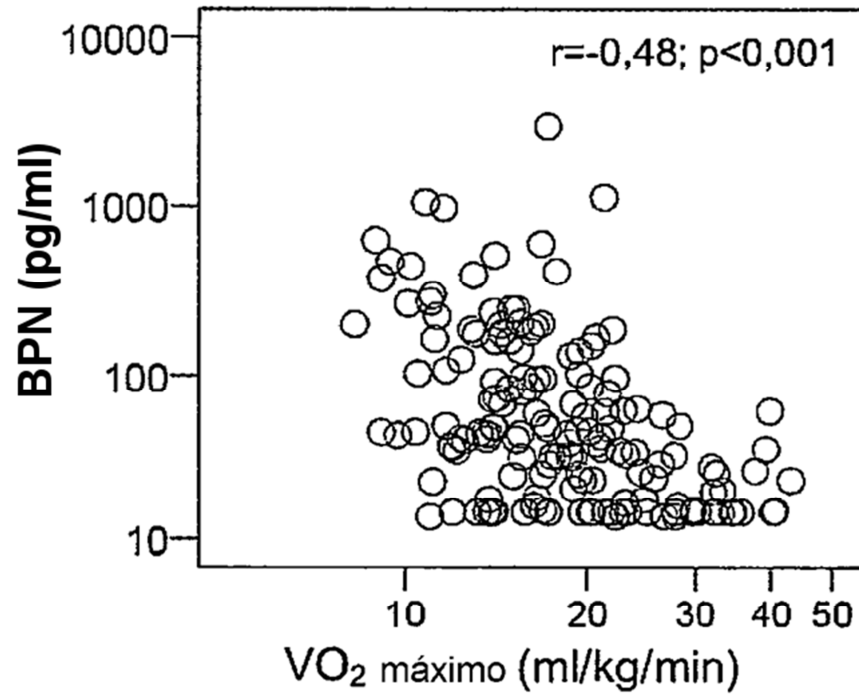


Figura 1 B

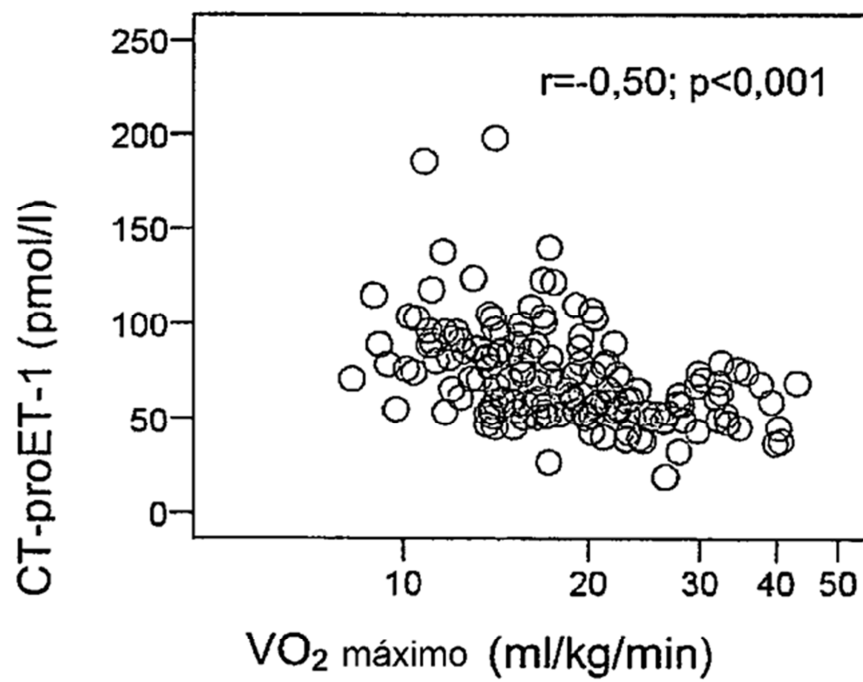


Figura 1 C

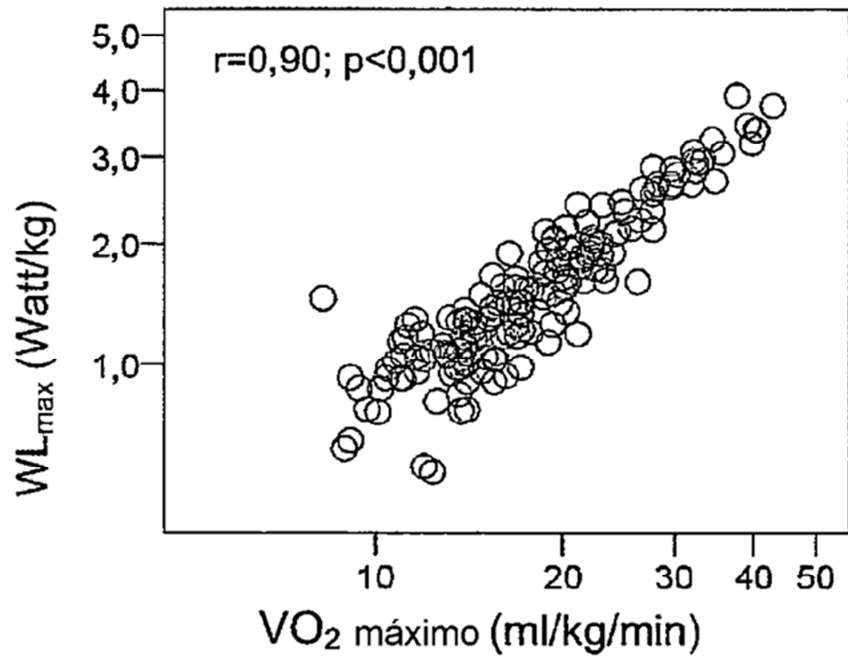


Figura 1 D

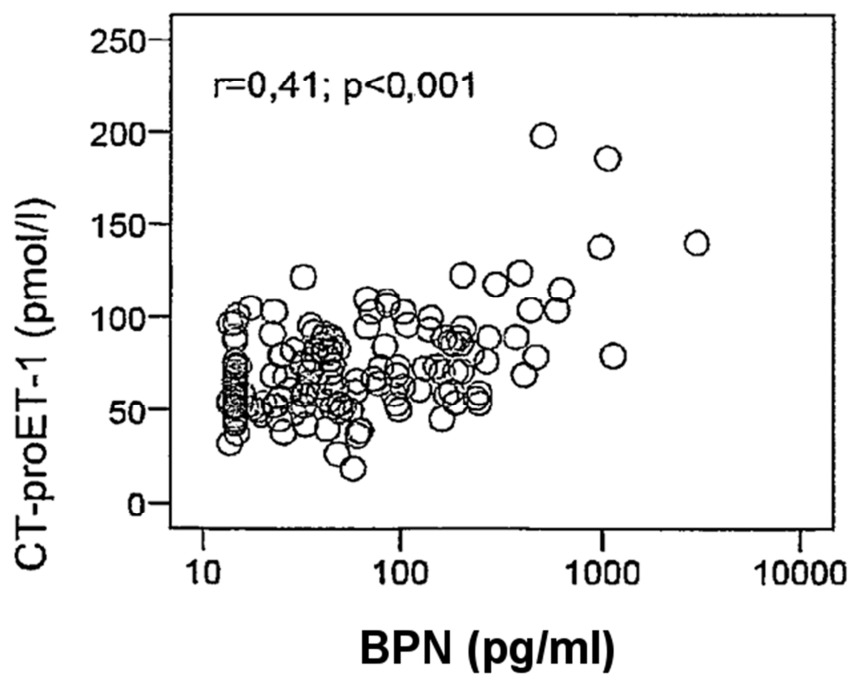


Figura 2 A

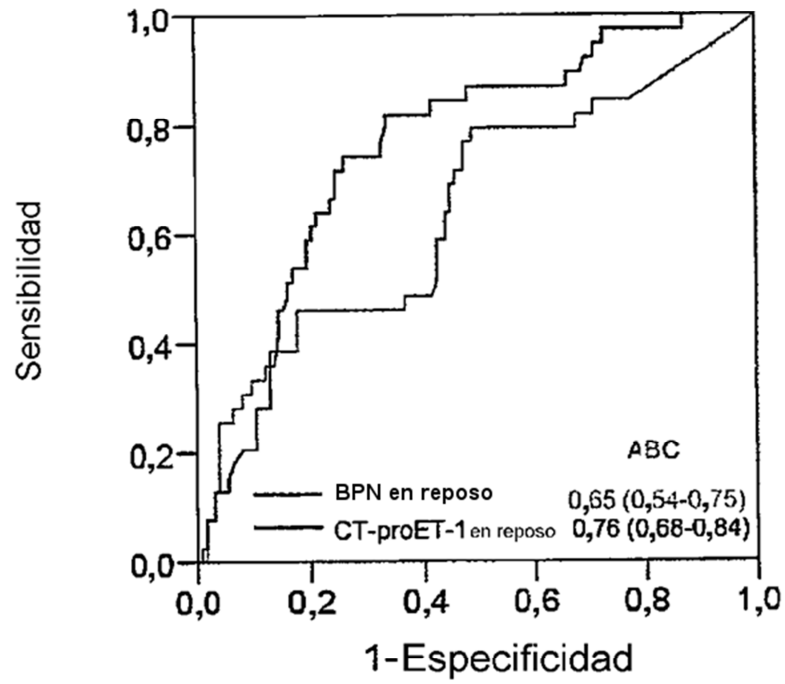


Figura 2 B

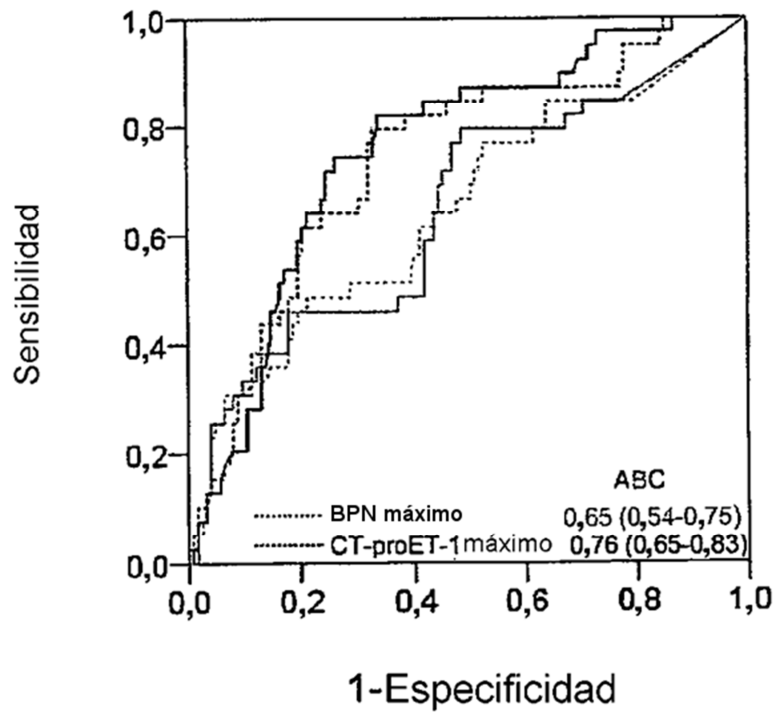
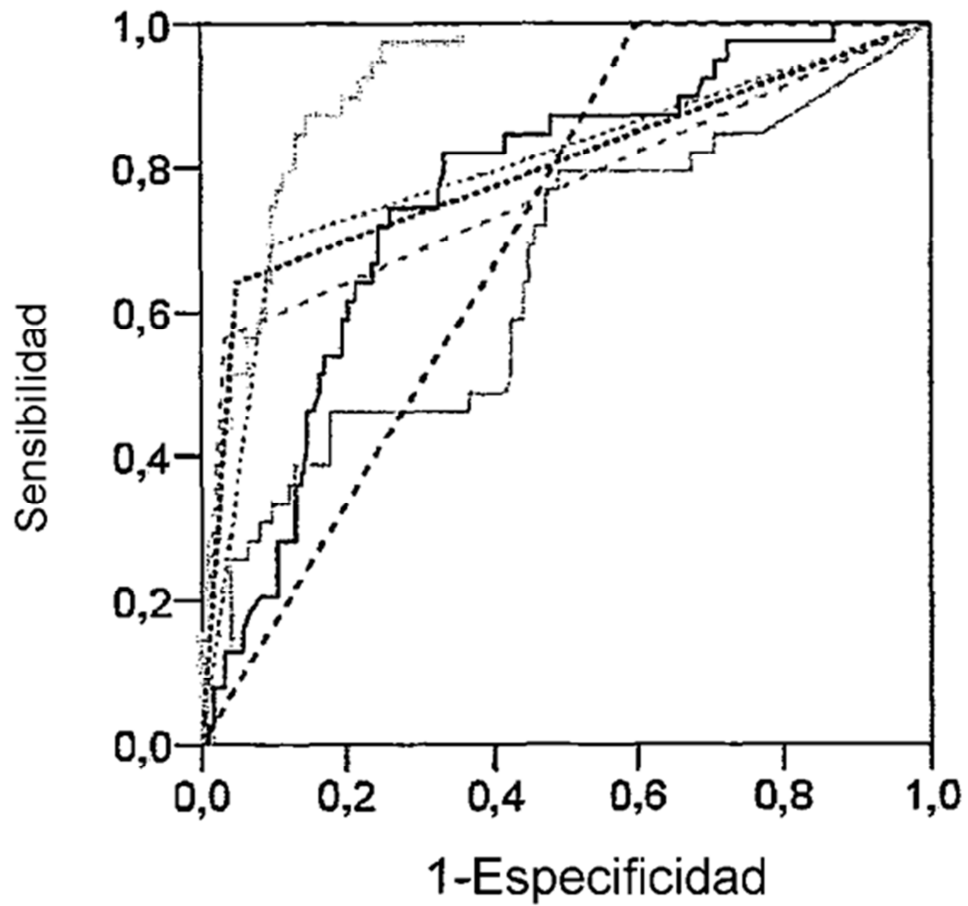


Figura 2 C

- BPN en reposo
- CT-proET-1 en reposo
- $1/WL_{max}$
- límite de WL_{máx} + límite de BPN
- límite de WL_{máx} + límite de CT-proET-1
- - - límite de WL_{máx} + límite de BPN + límite de CT-proET-1
- - - ningún valor superior al valor límite

Figura 3

Intervalos medios de VO ₂						
puntuaciones masculinas en ml/kg/minuto						
Edad	Malo	Mediocre	Válido	Bueno	Excelente	Excepcional
13 a 19 años	inferior a 35	30,5 a 38,3	38,4 a 45,1	45,2 a 50,9	51,0 a 55,9	superior a 55,9
20 a 29 años	inferior a 33	33,0 a 36,4	36,5 a 42,4	42,5 a 46,4	46,5 a 52,4	superior a 52,4
30 a 39 años	inferior a 31,5	31,5 a 35,4	35,5 a 40,9	41,0 a 44,9	45,0 a 49,4	superior a 49,4
40 a 49 años	inferior a 30,2	30,2 a 33,5	33,6 a 38,9	39,0 a 43,7	43,8 a 48,0	superior a 48,0
50 a 59 años	inferior a 26,1	26,1 a 30,9	31,0 a 35,7	35,8 a 40,9	41,0 a 45,3	superior a 45,3
60 años o mayor	inferior a 20,5	20,5 a 26,0	26,1 a 32,2	32,3 a 36,4	36,5 a 44,2	superior a 44,2
De: www.brianmac.demon.co.uk/vo2max.htm						

Intervalos medios de VO ₂						
puntuaciones femeninas en ml/kg/minuto						
Edad	Malo	Mediocre	Válido	Bueno	Excelente	Excepcional
13 a 19 años	inferior a 25,0	25,0 a 30,9	31,0 a 34,9	35,0 a 38,9	39,0 a 41,9	superior a 41,9
20 a 29 años	inferior a 23,6	23,6 a 28,9	29,0 a 32,9	33,0 a 36,9	37,0 a 41,0	superior a 41,0
30 a 39 años	inferior a 22,8	22,8 a 26,9	27,0 a 31,4	31,5 a 35,6	35,7 a 40,0	superior a 40,0
40 a 49 años	inferior a 21,0	21,0 a 24,4	24,5 a 28,9	29,0 a 32,8	32,9 a 36,9	superior a 36,9
50 a 59 años	inferior a 20,2	20,2 a 22,7	22,8 a 26,9	27,0 a 31,4	31,5 a 35,7	superior a 35,7
60 años o mayor	inferior a 17,5	17,5 a 20,1	20,2 a 24,4	24,5 a 30,2	30,3 a 31,4	superior a 31,4
De: www.brianmac.demon.co.uk/vo2max.htm						

Figura 4

