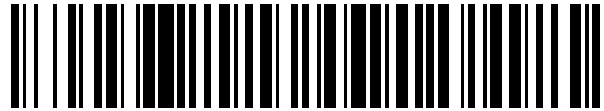


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 191**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2008 E 08750087 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2145191**

54 Título: **Procedimiento para determinar la parte de la región media de proANP amino-terminal en pacientes que presentan una cardiopatía o que se sospecha que desarrollan o que presentan una cardiopatía**

30 Prioridad:

07.05.2007 DE 102007022367

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

14.04.2014

73 Titular/es:

**B.R.A.H.M.S. GMBH (100.0%)
NEUENDORFSTRASSE 25
16761 HENNIGSDORF, DE**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS;
PAPASSOTIRIOU, JANA;
STRUCK, JOACHIM;
MORGENTHALER, NILS y
ANKER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 455 191 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

Procedimiento para determinar la parte de la región media de proANP amino-terminal en pacientes que presentan una cardiopatía o que se sospecha que desarrollan o que presentan una cardiopatía.

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico médico, el pronóstico y el seguimiento terapéutico para pacientes que presentan una cardiopatía o que se sospecha que desarrollan o que presentan una cardiopatía que comprende las etapas siguientes:

- proporcionar una muestra de un paciente que presenta una cardiopatía o que se sospecha que está desarrollando o que presenta una cardiopatía,
- determinar la zona de la región media de proANP amino-terminal, que comprende del aminoácido 50 al aminoácido 90, o péptidos parciales del mismo en dicha muestra con un inmunoensayo de tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos que se unen específicamente a secuencias parciales diferentes de dicha zona de la región media de proANP amino-terminal,
- atribuir el nivel de proANP amino-terminal determinado o el nivel de péptidos parciales del mismo a un cuadro clínico en el que la atribución a un cuadro clínico se lleva a cabo con la ayuda de un valor límite independiente del IMC de desde 190 hasta 260 pmol/l.

La presente invención se refiere además a un ensayo de prueba rápida para realizar el procedimiento de la presente invención y a la utilización de anticuerpos adecuados para el procedimiento y los ensayos según la presente invención.

La insuficiencia cardiaca (HF) es común, se asocia con alta morbimortalidad y es difícil de diagnosticar, particularmente en el servicio de urgencias (ED) [Cleland, J.G. *et al.*, *Eur Heart J*, 2003. 24(5): págs. 442-63; Mosterd, A. *et al.*, *Heart*, 2007. 93(9): págs. 1137-46]. La disnea es el síntoma principal en la mayoría de pacientes con HF. Desgraciadamente, ni la historia del paciente ni el examen físico pueden diferenciar con precisión la disnea debida a HF de la disnea debida a otras causas, tales como enfermedades pulmonares [Mueller, C. *et al.*, *Can J Cardiol*, 2005. 21(11): págs. 921-4; Wang, C.S. *et al.*, *Jama*, 2005. 294(15): págs. 1944-56]. Sin embargo, el diagnóstico preciso es obligado para la selección del tratamiento más apropiado.

Los péptidos natriuréticos de tipo B son marcadores cuantitativos de HF que se ha mostrado que son muy útiles en el diagnóstico de HF. La utilización de péptido natriurético de tipo B (BNP) y su fragmento amino-terminal, pro-péptido natriurético de tipo B N-terminal (NT-proBNP) aumenta significativamente la precisión de diagnóstico en el ED [Januzzi, J.L., Jr., *et al.*, *Am J Cardiol*, 2005. 95 (8): págs. 948-54; Maisel, A.S. *et al.*, *N Engl J Med*, 2002. 347(3): págs. 161-7], y de esa manera mejora la evaluación y el tratamiento del paciente [Moe, G.W. *et al.*, *Circulation*, 2007. 115(24): págs. 3103-10; Mueller, C. *et al.*, *N Engl J Med*, 2004. 350(7): págs. 647-54].

La concentración de péptido natriurético auricular (ANP) en la circulación es aproximadamente de 50 a 100 veces más alta que la de BNP [Pandey, K.N., *Peptides*, 2005. 26(6): págs. 901-32]. Por tanto, la señal biológica reflejada mediante el aumento de ANP puede ser incluso más importante de manera patofisiológica y por tanto diagnóstica que la señal de BNP. A pesar de esto, se conoce poco sobre el rendimiento diagnóstico de ANP y sus precursores [Cowie, M.R. *et al.*, *Lancet*, 1997. 350(9088): págs. 1349-53]. El ANP maduro se deriva del precursor proANP N-terminal (NT-proANP), que es significativamente más estable en la circulación que el péptido maduro y por tanto se cree que es un analito más fiable [Vesely, D.L., *IUBMB Life*, 2002. 53(3): págs. 153-9]. No obstante, debido al hecho de que NT-proANP podría someterse a fragmentación adicional [Cappellin, E. *et al.*, *Clin Chim Acta*, 2001. 310(1): págs. 49-52], los inmunoensayos para la medición de proANP de región media (MR-proANP) pueden presentar una ventaja [Morgenthaler, N.G. *et al.*, *Clin Chem*, 2004. 50(1): págs. 234-6].

Las cardiopatías, tales como insuficiencia cardiaca crónica (CHF), insuficiencia cardiaca aguda, síndrome coronario agudo e infarto de miocardio están ampliamente extendidas y a menudo presentan un pronóstico devastador. El pronóstico temprano de la cardiopatía puede mejorar el desenlace del paciente a través de medidas terapéuticas y preventivas oportunas [Jortani, S.A. *et al.*, *Clin Chem* 2004; 50:265-278]. Una abundancia de datos sugiere que la evaluación de péptidos natriuréticos representa un complemento útil a rayos X torácicos, electrocardiograma y ecocardiografía Doppler en la verificación del diagnóstico clínico y el pronóstico para cardiopatías sospechadas [Cowie, M.R. *et al.*, *Eur Heart J* 2003;24:1710-1718]. Los miembros más importantes de la familia de péptidos natriuréticos son péptido natriurético auricular (ANP) y péptido natriurético de tipo B (BNP). Ambos son marcadores de la función cardiaca. Además de la utilización en la ayuda para establecer el diagnóstico de CHF [Cowie, M.R. *et al.*, *Lancet*, 1997. 350(9088): págs. 1349-53; Mueller, C. *et al.*, *N Engl J Med*, 2004. 350(7): págs. 647-54], se utilizan en la estratificación del riesgo de pacientes con CHF estable o recientemente descompensada [Omland, T. *et al.*, *Circulation* 1996;93:1963-1969; Anand, I.S. *et al.*, *Circulation* 2003;107:1278-1283; Cheng, V. *et al.*, *J Am Coll Cardiol* 2001, 37:386-391] o con síndrome coronario agudo [Morrow, D.A. *et al.*, *JAMA* 14 de diciembre de 2005; 294(22):2866-71] y, además, se utilizan en el seguimiento y la orientación en la terapia de CHF [Troughton, R.W. *et al.*, *Lancet* 2000, 355:1126-1130].

- Tanto BNP como el otro producto de escisión de su precursor, proBNP N-terminal (NT-proBNP) se utilizan actualmente en la evaluación de pacientes con CHF. ANP se origina a partir de la escisión de su precursor proANP. El otro producto de escisión, proANP N-terminal (NT-proANP) es significativamente más estable en circulación que ANP. Por tanto en la técnica anterior, se ha sugerido que NT-proANP es un analito más fiable [Ala-Kopsala, M. *et al.*, Clin Chem, 2004. 50(9): págs. 1576-88]. Sin embargo, las regiones N- y C-terminal del pro-péptido N-terminal pueden alterarse a través de degradación enzimática [Seidler, T. *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 1999, 255:495-501]. Comúnmente, se considera que BNP y NT-proBNP son más adecuados para el diagnóstico y el pronóstico en pacientes con insuficiencia cardíaca que ANP y NT-proANP. El motivo de esto puede ser que la determinación de ANP y NT-proANP se considera menos reproducible y que errores conceptuales en la mayoría de los diseños de ensayo aplicados conducen a una subestimación parcial de la cantidad de analito circulante [Yoshiyoshi, M. *et al.*, Eur J. Endocrinol 1996; 135:265-268; Vesely, D.L. *et al.*, IUBMB Life, 2002. 53(3): págs. 153-9].
- Habitualmente, un péptido que comprende 28 aminoácidos (99-126) de la sección C-terminal de una prohormona que comprende 128 aminoácidos (proANP; SEC ID n°: 2) se denomina la hormona ANP real. Tras la liberación de ANP a partir de su prohormona proANP, se libera una cantidad equimolar del péptido de proANP parcial más grande restante, el proANP N-terminal, que consiste en 98 aminoácidos (NT-proANP; proANP (1-98)) en la circulación. Como NT-proANP presenta un tiempo de semivida y estabilidad significativamente mayores puede utilizarse NT-proANP como parámetro de laboratorio para el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento y el control de terapia en cardiopatías. Para una observación más exhaustiva en la materia, véase: Lothar Thomas (Editor), Labor und Diagnose, 5ª ed. expandida, subcapítulo 2.14 del capítulo 2, Kardiale Diagnostik, páginas 116-118, y la bibliografía citada en el mismo.
- Tanto para la determinación del propio ANP así como para la determinación de NT-proANP en líquidos biológicos (suero, plasma, orina), se han desarrollado diversos inmunoensayos en el pasado y se han aplicado en la investigación y la práctica clínica. La mayor parte de tales inmunoensayos para la determinación de ANP y NT-proANP se basa en el principio conocido de inmunoensayos competitivos, siendo el mejor conocido el radioinmunoensayo (RIA). Los inmunoensayos competitivos para la determinación de proANP y ANP se describen o utilizan, por ejemplo en [Cappellin, E. *et al.*, Clin Chim Acta, 2001. 310(1): págs. 49-52] y [Hiroshi Itoh *et al.*, Journal of Hipertension 1988, 6 (supl. 4) S309-S319; Meleagros, L. *et al.*; Peptides, vol. 10, 545-550, 1989; Amir Lerman *et al.*, Lancet 1993, 341:1105-09, 1993; John G F Cleland *et al.*, Heart 1996, 75:410-413; Martin G. Buckley *et al.*, Clinical Science (1999) 97:689-695].
- Mediante la utilización de diversos anticuerpos que reconocen diversas secuencias de NT-proANP (NT-proANP 1-98; SEC ID n°: 1) para la determinación de NT-proANP con inmunoensayos competitivos, se interpretó que diversos péptidos aparecen en los líquidos biológicos, en particular sangre u orina, que se corresponden con los productos de degradación de NT-proANP (proANP 1-98). En particular, se ha interpretado que se forman fragmentos de bajo peso molecular a partir de NT-proANP, en particular fragmentos tales a los que se han dirigido las secuencias de aminoácidos 1-30, 31-67 y 79-98 de proANP debido a su inmunoreactividad (véase por ejemplo M. G. Buckley *et al.*, Clinica Chimica Acta, 191 (1990) 1-14; J.B. Hansen *et al.*, Lab. Invest. 1995, 55:447-452; Rose M. Overton *et al.*, Human Plasma and Serum; Peptides, vol. 17, 1155-1162, 1996; Sreedevi Daggubati *et al.*, Cardiovascular Research 36 (1997) 246-255; E. F. Macaulay Hunter *et al.*, Scand J Clin Invest 1998; 58: 205-216; Martina Franz *et al.*, Kidney International, vol. 58 (2000), 374-383, Fumiaki Marumo *et al.*, Human Plasma and Urine; Biochem. Biophys. Res. Commun. 137:231-236 (1985) y Engelbert Hartter *et al.*, Clin Chem Lab Med 2000, 38(19): 27-32).
- Los inmunoensayos competitivos que reconocen específicamente las secuencias mencionadas anteriormente siempre reconocen el NT-proANP completo de la misma manera, sin tener en cuenta influencias basadas en diferentes grados de avidéz o posibles influencias conformacionales, y por tanto no diferencian entre NT-proANP y sus fragmentos.
- En contraposición con los inmunoensayos competitivos, los inmunoensayos de tipo sándwich no competitivos muestran varias ventajas. Por ejemplo, pueden interpretarse como ensayos de fase sólida (ensayos heterogéneos) más fácilmente, son más robustos, proporcionan resultados de medición con una sensibilidad mayor, presentan menos reactividad cruzada y son más adecuados para la automatización y mediciones en serie. Además, reconociendo sólo tales moléculas y/o péptidos en los que están presentes ambos restos de unión para los anticuerpos que se utilizan para la formación del sándwich en la misma molécula, los inmunoensayos de tipo sándwich pueden conducir a conclusiones ligeramente diferentes en comparación con inmunoensayos competitivos que sólo aplican un tipo de anticuerpo. Si, por ejemplo, las áreas de unión se localizan en péptidos parciales diferentes (producto de degradación, fragmentos) una unión de los anticuerpos a tales fragmentos no conducirá a la señal de medición que es típica para el "sándwich" completo.
- Debido a las ventajas conocidas de los inmunoensayos de tipo sándwich en principio así como debido a la posibilidad de medir selectivamente sólo NT-proANP completo sin ninguna influencia de productos de degradación y fragmentos, ya se han descrito inmunoensayos de tipo sándwich para la determinación de NT-proANP y se han aplicado en la investigación y la práctica clínica. Por ejemplo, el documento EP 721 105 B1 describe un

inmunoensayo de tipo sándwich para la determinación de proANP, en particular en el área de diagnóstico de cardiopatías e insuficiencia renal crónica, utilizando dos anticuerpos monoclonales, uno de los cuales se une a los aminoácidos 1-25 de proANP (compárese con el documento EP 350 218 B1) y el otro de los cuales se une a los aminoácidos 43-66 de proANP. Mediante este tipo de inmunoensayo de tipo sándwich, sólo tales péptidos parciales de proANP se detectan y detectan conjuntamente en presencia de proANP (1-98), que comprende por lo menos los primeros 66 aminoácidos de la secuencia de proANP.

Otro inmunoensayo de tipo sándwich que es similar a este respecto se describe en [Mats Stridsberg *et al.*, J. Med. Sci 102, 99-108, vol. 18: 1201-1203]. Este inmunoensayo de tipo sándwich también utiliza dos anticuerpos monoclonales, uno de los cuales se une a los aminoácidos 1-30 de proANP, mientras que el otro se une a los aminoácidos 79-98. Debido a la elección de zonas de unión en los extremos terminales de proANP (1-98) puede suponerse que este inmunoensayo de tipo sándwich sólo detectará proANP (1-98) intacto.

El documento WO 00/19207 describe un procedimiento para la determinación de proANP (1-98) en el que se utilizan dos de tres anticuerpos policlonales, que se unen a las secuencias de aminoácidos 8-27, 31-64 o 79-98 de la secuencia de proANP (1-98). El ensayo para la determinación de proANP (1-98) ofrecido comercialmente por el solicitante del documento WO 00/19207 es un inmunoensayo enzimático, que utiliza un par de anticuerpos policlonales de oveja purificados por afinidad, de los que el anticuerpo inmovilizado reconoce los aminoácidos 10-19 de proANP, mientras que se utiliza un segundo anticuerpo policlonal para la detección, que reconoce los aminoácidos (85-90) (compárese con el manual de funcionamiento del ensayo de tipo sándwich de proANP (1-98) de BIOMEDICA, A-1210 Viena). Por tanto, este ensayo también reconoce sólo especies de péptido que contienen los extremos terminales del proANP (1-98) completo, es decir NT-proANP completo o casi completo).

El documento WO 2004/046181 A1 describe un inmunoensayo de tipo sándwich para identificar péptidos de proANP parciales en diagnóstico cardíaco y de septicemia utilizando dos anticuerpos que se unen específicamente a secuencias parciales en la zona de la región media de NT-proANP, en el que dicha zona se extiende desde los aminoácidos 53 hasta 83 de NT-proANP.

Todos los ensayos competitivos o ensayos que aplican el principio de tipo sándwich descritos en la técnica anterior se han desarrollado de manera básica como ensayos para diagnósticos cardíacos o que se han utilizado en el contexto de diagnósticos cardíacos, por lo que se ha mencionado la insuficiencia renal crónica como aplicación diagnóstica adicional (compárese con el documento EP 721 105 B1 y la mención [Buckley MG *et al.*, AM. J. Hipertens. 3 de diciembre de 1990 (12 Pt1): 933-935]).

Además, se ha desarrollado un nuevo inmunoensayo de tipo sándwich para la determinación de la región central de proANP (aminoácidos 53-73), cuyos resultados de medición no están influidos por un supuesto truncamiento terminal del péptido [Clinical Chemistry 50, n° 1, 2004, páginas 234-236].

Un objetivo de la invención consiste en proporcionar un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico médico, el pronóstico y el seguimiento de la terapia para pacientes que presentan una cardiopatía o que se sospecha que desarrollan o que presentan una cardiopatía que proporciona información fiable especialmente al médico en el servicio de urgencias (ED).

Por tanto, la presente invención comprende un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico médico, el pronóstico y el seguimiento terapéutico para pacientes que presentan una cardiopatía o que se sospecha que desarrollan o que presentan una cardiopatía que comprende las etapas siguientes:

- proporcionar una muestra de un paciente que presenta una cardiopatía o que se sospecha que está desarrollando o que presenta una cardiopatía,
- determinar la zona de la región media de proANP amino-terminal, que comprende del aminoácido 50 al aminoácido 90, o péptidos parciales del mismo en dicha muestra con un inmunoensayo de tipo sándwich utilizando dos anticuerpos que se unen específicamente a secuencias parciales diferentes de dicha zona de la región media de proANP amino-terminal,
- atribuir el nivel de proANP amino-terminal determinado o el nivel de péptidos parciales del mismo a un cuadro clínico en el que la atribución a un cuadro clínico se lleva a cabo con la ayuda de un valor límite independiente del IMC de desde 190 hasta 260 pmol/l.

Atribución a un cuadro clínico significa que se utiliza el nivel del proANP amino-terminal de la región media determinado o el nivel de péptidos parciales del mismo para el diagnóstico médico, el pronóstico o el seguimiento de la terapia para pacientes que presentan una cardiopatía o que se sospecha que están desarrollando o que presentan una cardiopatía en que la utilización se lleva a cabo independientemente del IMC del paciente.

La cardiopatía del paciente puede seleccionarse de manera no limitativa entre insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, síndrome coronario agudo o infarto de miocardio.

En una forma de realización de la invención, la enfermedad se diagnostica, por tanto dicho procedimiento es un procedimiento para el diagnóstico médico.

5 En una forma de realización preferida de la invención, la cardiopatía es la insuficiencia cardiaca. El procedimiento *in vitro* según la invención es especialmente adecuado y fiable para pacientes que presentan síntomas de disnea y que por tanto se sospecha que presentan insuficiencia cardiaca y se diagnostica el cuadro clínico. La evaluación y el manejo de pacientes que se presentan en el servicio de urgencias se facilitan mediante el procedimiento según la presente invención. El diagnóstico preciso es obligatorio para la selección de la mayoría de tratamientos apropiados para tales pacientes. Por tanto, la presente invención cumple la necesidad de diferenciar de manera precisa disnea debida a insuficiencia cardiaca de disnea debida a otras causas, tales como enfermedades pulmonares. El procedimiento según la presente invención, por tanto, mejora significativamente la precisión de diagnóstico para insuficiencia cardiaca.

15 Se ha descrito que la concentración de NT-proANP así como la de BNP se reduce con el aumento del IMC en la población sana [Wang, T.J. *et al.*, *Circulation*, 2004. 109(5): págs. 594600]. Los autores por tanto deducen que los péptidos natriuréticos no son adecuados como marcadores en pacientes obesos ("En segundo lugar, los niveles de péptido natriurético en plasma pueden ser un marcador menos útil para la insuficiencia cardiaca o disfunción ventricular izquierda en individuos obesos, una especulación que merece investigación").

20 Sorprendentemente, se ha encontrado en el contexto de esta invención que para una determinada subpoblación de pacientes con una cardiopatía (insuficiencia cardiaca crónica), concretamente tales con un IMC (índice de masa corporal) igual a o mayor de 30 kg/cm², en particular la determinación de proANP amino-terminal de la región media o péptidos parciales derivados del mismo en una muestra biológica originada a partir de estos pacientes permite un pronóstico fiable. Esta es exactamente la subpoblación de la que Wang *et al.* dedujeron que los péptidos natriuréticos podían ser marcadores menos útiles. En una publicación reciente se ha descrito que BNP también presenta un valor pronóstico en el subgrupo de pacientes obesos en pacientes hospitalizados con insuficiencia cardiaca crónica [Horwich, T.B. *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 3 de enero de 2006, 47(1):85-90; Epub 15 de diciembre de 2005]. En el contexto de esta invención, sorprendentemente se ha encontrado que NT-proANP ha sido más fiable con respecto al pronóstico de dicha subpoblación de pacientes en comparación con el análogo de BNP, NT-proBNP.

A continuación, se describe una forma de realización preferida de la presente invención con respecto a un procedimiento *in vitro*, en el que el paciente o el grupo de pacientes presenta un IMC igual a o mayor de 30 kg/m² y la muestra la proporciona un paciente que presenta un IMC igual a o mayor de 30 kg/m².

35 Un objeto de la presente invención es un procedimiento *in vitro* según la presente invención, en el que el paciente o el grupo de pacientes presenta un IMC igual a o mayor de 30 kg/m² y la muestra la proporciona un paciente que presenta un IMC igual a o mayor de 30 kg/m².

40 Por tanto, la presente invención comprende un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico médico, el pronóstico y el seguimiento de la terapia para pacientes que presentan una cardiopatía o que se sospecha que están desarrollando o que presentan una cardiopatía y que presentan un IMC igual a o mayor de 30 kg/m², que comprende las etapas siguientes:

- 45
- proporcionar una muestra de un paciente que presenta una cardiopatía o que se sospecha que está desarrollando o que presenta una cardiopatía y un IMC igual a o mayor de 30 kg/m², y
 - determinar la zona de la región media de proANP amino-terminal, que abarca del aminoácido 50 al aminoácido 90, o péptidos parciales del mismo en dicha muestra con un inmunoensayo de tipo sándwich
- 50 utilizando dos anticuerpos que se unen específicamente a secuencias parciales diferentes de dicha zona de la región media de proANP amino-terminal.

El procedimiento según la presente invención es particularmente adecuado para el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento terapéutico en pacientes que presentan insuficiencia cardiaca crónica.

55 El procedimiento según la presente invención es particularmente adecuado para el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento terapéutico en pacientes que presentan insuficiencia cardiaca crónica y que presentan un IMC igual a o mayor de 30 kg/m². El procedimiento según la presente invención es especialmente adecuado para el pronóstico de pacientes que presentan una cardiopatía o que se sospecha que están desarrollando o que presentan una cardiopatía y que presentan un IMC igual a o mayor de 30 kg/m², especialmente en el caso en el que la enfermedad es insuficiencia cardiaca crónica.

60 En este grupo de pacientes, es decir pacientes que presentan una cardiopatía o que se sospecha que están desarrollando o que presentan una cardiopatía y que presentan un IMC igual a o mayor de 30 kg/m², especialmente en el caso en el que la enfermedad es insuficiencia cardiaca crónica, el procedimiento según la invención se lleva a cabo preferentemente en pacientes que no son (supuestamente) asintomáticos.

- En una forma de realización particularmente preferida, el umbral óptimo para el pronóstico de mortalidad en el grupo de pacientes con un IMC igual a o mayor de 30 kg/m² está en el intervalo de entre 190 y 210, preferentemente entre 195 y 205, todavía más preferentemente 199 pmol/l. El umbral óptimo para el grupo de IMC < 30 era de 231 pmol/l.
- 5 Naturalmente, los valores absolutos de los umbrales varían, dependiendo del ensayo y del procedimiento de calibración utilizado. Los umbrales mencionados en la presente memoria se estimaron mediante el mismo ensayo y la misma calibración que se había utilizado para determinar los resultados en [Clinical Chemistry 50, n° 1, 2004, páginas 234-236].
- 10 Sorprendentemente, se ha descubierto que en el procedimiento según la presente invención el umbral óptimo para los pacientes con un IMC > 30 es más bajo que para los pacientes con un IMC < 30. Por tanto, el contenido de la presente invención es en particular un procedimiento *in vitro* según la presente invención, en el que el umbral subyacente para pacientes con un IMC > 30 es más bajo que para pacientes con un IMC < 30.
- 15 El coeficiente de variación intraensayo del ensayo, definido como el coeficiente de variación que resulta para un valor de medición dado a partir de una determinación de 10 veces en un lote de reacción, es preferentemente como máximo del 10% para todos los valores de medición. Es desventajoso sobrepasar este valor, ya que puede conducir a atribuciones erróneas de valores de medición con respecto a los umbrales y por tanto puede conducir a conclusiones falsas.
- 20 Por tanto, los procedimientos *in vitro* según la presente invención pueden realizarse con pacientes que presentan un IMC por debajo de 30 kg/m² y con pacientes que presentan un IMC superior o igual a 30 kg/m². Son adecuados valores de umbral de desde 190 hasta 260 pmol/l, preferentemente de desde 195 hasta 240 pmol/l para los procedimientos de la presente invención independientemente del IMC del paciente. Sin embargo, en las formas de realización preferidas de la invención, los valores de umbral para pacientes con IMC igual a o mayor de 30 kg/m² se seleccionan de manera que se encuentran en el intervalo de entre 190 y 210, preferentemente entre 195 y 205, todavía más preferentemente 199 pmol/l. El umbral óptimo para el grupo de IMC < 30 es 231 pmol/l.
- 25 En particular, la muestra proporcionada por un paciente puede ser plasma, suero, sangre u orina.
- 30 Según la invención, los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales así como policlonales. Por tanto, por lo menos un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal.
- Resultan preferidos los anticuerpos policlonales, en particular anticuerpos policlonales purificados por afinidad.
- 35 Particularmente se prefiere que uno de los anticuerpos se obtenga inmunizando un animal con un antígeno que contiene una secuencia de péptido sintético que comprende los aminoácidos 53-72 de proANP, y el otro anticuerpo se obtiene inmunizando un animal con un antígeno que contiene una secuencia de péptido sintético que comprende los aminoácidos 73-90 de proANP. En otra forma de realización, la secuencia de péptido sintético que comprende los aminoácidos 53-72 de proANP presenta un grupo cisteína N-terminal adicional. En otra forma de realización preferida, el otro anticuerpo se obtiene inmunizando un animal con un antígeno que contiene una secuencia de péptido sintético que comprende los aminoácidos 72-90 o 73-83 de proANP junto con un grupo cisteína N-terminal adicional. Los anticuerpos obtenidos mediante la utilización de dichos péptidos sintéticos, representan juntos una parte de la región media completa de la secuencia de proANP, por tanto sólo reconocen zonas de unión en el intervalo de aminoácidos 53-83 de NT-proANP, y pueden detectar dicho intervalo completamente en forma de anticuerpos policlonales.
- 40 En una forma de realización preferida del procedimiento *in vitro* según la invención, uno de los anticuerpos está etiquetado y el segundo está unido a o puede estar unido selectivamente a una fase sólida. En una forma de realización particularmente preferida del ensayo, uno de los anticuerpos está etiquetado mientras que el otro o bien está unido a una fase sólida o bien puede estar unido selectivamente a una fase sólida. En una forma de realización preferida, el procedimiento se ejecuta como inmunoensayo de tipo sándwich heterogéneo, en el que uno de los anticuerpos está inmovilizado sobre una fase sólida seleccionada arbitrariamente, por ejemplo, las paredes de tubos de ensayo recubiertos (por ejemplo tubos de ensayo de poliestireno; tubos recubiertos; CT) o placas de microtitulación, por ejemplo compuestas de poliestireno, o a partículas, tales como por ejemplo partículas magnéticas, mediante lo cual el otro anticuerpo presenta un grupo que se asemeja a una etiqueta detectable o que permite la unión selectiva a una etiqueta, y que sirve para la detección de las estructuras de tipo sándwich formadas. También es posible una inmovilización retrasada en el tiempo o posterior utilizando fases sólidas adecuadas.
- 50 El procedimiento según la presente invención puede expresarse además como un procedimiento homogéneo, en el que los complejos de tipo sándwich formados por el/los anticuerpo/anticuerpos y el proANP o péptido parcial de proANP que va a detectarse permanecen suspendidos en la fase líquida. En este caso se prefiere que cuando se utilicen dos anticuerpos, ambos anticuerpos estén etiquetados con partes de un sistema de detección, que conduce a la generación de una señal o al desencadenamiento de una señal si ambos anticuerpos se integran en un sándwich individual. Tales técnicas han de expresarse en particular como procedimientos de detección de potenciación de la fluorescencia o de extinción de la fluorescencia. Una forma de realización particularmente
- 60
- 65

preferida se refiere a la utilización de reactivos de detección que deben utilizarse en pareja, tales como por ejemplo los que se describen en los documentos US-A-4 882 733, EP-B1 0 180 492 o EP-B1 0 539 477 y la técnica anterior citada en los mismos. De esta manera, se hacen posibles las mediciones en las que sólo se detectan productos de reacción que comprenden ambos componentes de etiquetado en un inmunocomplejo individual directamente en la mezcla de reacción. Por ejemplo, tales tecnologías se ofrecen con los nombres de marca TRACE[®] (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) o KRYPTOR[®], implementando las enseñanzas de las aplicaciones mencionadas anteriormente.

En principio, pueden utilizarse todas las técnicas de etiquetado que pueden aplicarse en ensayos de dicho tipo, tal como etiquetado con radioisótopos, enzimas, etiquetas de fluorescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia y etiquetas de color detectables ópticamente de manera directa, tales como átomos de oro y partículas de tinción, que se utilizan en particular en pruebas de diagnóstico inmediato (POC) o rápidas. En el caso de inmunosayos de tipo sándwich heterogéneos, ambos anticuerpos pueden presentar partes del sistema de detección según el tipo descrito en la presente memoria en el contexto de ensayos homogéneos.

En una alternativa preferida, tanto el primer como el segundo anticuerpo están dispersos en el medio de reacción líquido, mediante lo cual un primer componente de etiquetado que forma parte de un sistema de etiquetado basado en la extinción o la potenciación de la fluorescencia o quimioluminiscencia se une al primer anticuerpo, y mediante lo cual el segundo componente de etiquetado de este sistema de etiquetado se une al segundo anticuerpo, de manera que tras la unión de ambos anticuerpos al proANP amino-terminal que va a detectarse, se genera una señal detectable que permite una detección de los complejos de tipo sándwich formados en la disolución de medición. Una forma de realización de esta alternativa comprende el sistema de etiquetado de quelatos o criptatos de tierras raras en combinación con un colorante de fluorescencia o quimioluminiscencia. En una forma de realización preferida particular, el sistema de etiquetado comprende un criptato de tierras raras en combinación con un colorante de fluorescencia o quimioluminiscencia.

En una forma de realización adicional preferida, la detección se lleva a cabo con un inmunosayo competitivo. En una forma de realización particularmente preferida se utiliza un radioinmunosayo.

El procedimiento según la presente invención puede realizarse en combinación con otros marcadores y/o procedimientos. Esto significa que los procedimientos de medición según la presente invención pueden realizarse de manera particularmente ventajosa como diagnóstico de múltiples parámetros. En la presente memoria, por lo menos se determina adicionalmente un marcador adicional, preferentemente seleccionado del grupo de marcadores inflamatorios, marcadores cardiovasculares o marcadores isquémicos.

En una forma de realización preferida del procedimiento, el marcador inflamatorio se selecciona del grupo que comprende proteína-C reactiva (CRP), citocinas, tales como TNF-alfa, interleucinas, tales como IL-6, procalcitonina (1-116 o péptidos parciales de la misma) y moléculas de adhesión, tales como VCAM o ICAM.

En una forma de realización preferida del procedimiento, el marcador cardiovascular se selecciona del grupo que comprende por lo menos un marcador del grupo de mieloperoxidasa, péptidos completos o péptidos parciales de: proBNP, pro-endotelina-1, pro-adrenomedulina, pro-vasopresina, pro-péptido relacionado con la gastrina (proGRP), pro-leptina, pro-neuropéptido-Y, pro-somatostatina, pro-neuropéptido-YY, pro-opiomelanocortina.

En una forma de realización preferida del procedimiento, el marcador isquémico se selecciona del grupo que comprende por lo menos un marcador del grupo de troponina I o T, CK-MB, mioglobina.

En el contexto de la presente memoria, los marcadores pueden determinarse en paralelo o simultáneamente en el procedimiento según la presente invención. En las determinaciones de múltiples parámetros mencionadas anteriormente puede preverse que los resultados de medición para varios parámetros se evalúan simultáneamente o en paralelo y por ejemplo con la ayuda de un programa informático que utiliza correlaciones de parámetros diagnósticamente significativas.

En el procedimiento según la presente invención puede registrarse una ecocardiografía o un electrocardiograma como procedimiento adicional.

Tal como se expuso anteriormente, la cardiopatía del paciente puede ser pero no se limita a insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, síndrome coronario agudo o infarto de miocardio.

Tal como se trató anteriormente, por tanto está dentro del alcance de la presente invención desarrollar los procedimientos según la presente invención como ensayo de prueba rápida.

Por la presente memoria, la muestra proporcionada por un paciente que presenta una cardiopatía o que se sospecha que está desarrollando o que presenta una cardiopatía y opcionalmente que presenta un IMC igual a o mayor de 30 kg/m²:

- se aplica a la zona de aplicación de la muestra de un sistema de prueba rápida,
- se pone en contacto con dos anticuerpos que se unen específicamente a secuencias parciales de proANP amino-terminal de la región media en la zona de reacción, y mediante lo cual
- se detectan proANP amino-terminal o péptidos parciales derivados del mismo a los que están unidos los anticuerpos en la zona de detección.

Preferentemente, el sistema de prueba rápida puede ser un sistema de prueba microfluídico.

En una forma de realización adicional preferida, el sistema de prueba rápida puede ser un dispositivo de prueba de flujo lateral. Este sistema de prueba rápida puede ser un dispositivo de prueba de flujo lateral de fase sólida.

El procedimiento según la presente invención puede ejecutarse en un sistema de prueba rápida basado en inmunomigración y/o cromatografía.

Por tanto, una forma de realización adicional de la presente invención es un sistema de prueba rápida para la implementación del procedimiento según la presente invención en todas las formas de realización descritas en la presente memoria para la determinación de amino proANP de la región media o péptidos parciales del mismo en la muestra de un paciente con una cardiopatía o que se sospecha que está desarrollando o que presenta una cardiopatía y opcionalmente que presenta un IMC igual a o mayor de 30 kg/m², en el que se utilizan dos anticuerpos, que se unen específicamente a secuencias parciales del área de la región media de proANP amino-terminal. Preferentemente, las secuencias parciales son por lo menos de 12 aminoácidos de longitud en la zona de la región media de proANP amino-terminal, que comprende del aminoácido 50 al aminoácido 90.

A continuación la invención se explica con mayor detalle a partir de la descripción de los resultados obtenidos de la determinación de NT-proANP y NP-proBNP en muestras biológicas de pacientes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se utilizó un ensayo tal como se describió en [Morgenthaler, N.G. *et al.*, Clin Chem, 2004. 50(1): págs. 234-6]] para la medición de proANP amino-terminal. Se determinó NT-proBNP utilizando la prueba comercialmente disponible de Roche según el manual (Elecsys).

Se determinaron ambos marcadores en muestras de plasma de pacientes con insuficiencia cardiaca crónica. En particular se investigó adicionalmente el subgrupo de pacientes (n=144) con un índice de masa corporal \geq 30 kg/m². De estos 144 pacientes, 26 pacientes murieron en el transcurso de 24 meses debido a acontecimientos cardiovasculares. Para la evaluación de la eficacia pronóstica de ambos marcadores, se analizaron los datos mediante regresión de Cox (software StatView 5.0 para Windows; Abacus Concepts, Berkley, CA). La mediana de los valores para NT-proBNP (en pg/ml) era 5 veces mayor que para proANP amino-terminal (en pmol/l). Por tanto, se calculó la razón de riesgo para NT-proBNP en comparación con MR-proANP para un aumento 5 veces más grande en concentración en el análisis de Cox.

Resultados del análisis de riesgo proporcional de Cox de una sola variable:

Chi cuadrado del marcador	Razón de riesgo (IC del 95%)	p
NT-proANP (aumento de 100 pmol/l)	14,414 1,503 (1,217-1,855)	<0,0001
NT-proBNP (aumento de 500 pg/ml)	0,662 1,024 (0,963-1,094)	0,416

Independientemente del hecho de que no se obtuvo ningún resultado significativo para NT-proBNP (p=0,416), la razón de riesgo de 1,503 para NT-proANP en comparación con NT-proBNP (1,024) muestra claramente la ventaja en el subgrupo de pacientes con un IMC \geq 30. Una razón de riesgo de 1,000 indica que el riesgo de muerte por dosis unitaria de concentración no aumenta. Para NT-proANP, una razón de riesgo de 1,503 significa por tanto que el riesgo de muerte por unidad de concentración (en este caso 100 pmol/l) aumenta en un 50,3%. En comparación con NT-proBNP, este es un aumento mayor de 21 veces del riesgo.

Resultado del análisis de riesgo proporcional de Cox de múltiples variables:

Chi cuadrado del marcador	Razón de riesgo (IC del 95%)	p
LN NT-proANP	7,198 2,776(1,317-5,854)	0,007
LN NT-proBNP	0,005 0,985(0,644-1,506)	0,943

De nuevo, el resultado demuestra la ventaja de NT-proANP ya que persiste como factor pronóstico independiente de

muerte en el subgrupo de pacientes con el IMC ≥ 30 en un modelo con NT-proBNP ($p=0,007$). En contraposición con esto, NT-proBNP no es un factor pronóstico independiente.

5 Además en el análisis ROC, NT-proANP fue superior a NT-proBNP ($AUC=0,61$) para el pronóstico de mortalidad del subgrupo de pacientes con el IMC ≥ 30 con un AUC de 0,66. El umbral óptimo de NT-proANP para el pronóstico era de 199 pmol/l.

Ejemplo 2

10 Población de estudio

Se incluyeron de manera prospectiva pacientes consecutivos que se presentaron en el ED. Para que pudieran seleccionarse en el estudio, un paciente tenía que presentar disnea como el síntoma más prominente. Se excluyeron pacientes menores de 18 años de edad, pacientes en hemodiálisis y pacientes con traumatismo. Se llevó a cabo el estudio según los principios de la Declaración de Helsinki y se aprobó por el comité ético local. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes participantes.

15 Evaluación clínica de los pacientes

20 Se sometió a los pacientes a una evaluación clínica inicial que incluía historia clínica, examen físico, ECG, oximetría de pulso, análisis de sangre incluyendo análisis de gases en la sangre arterial (cuando esté indicado) y rayos X torácicos. En el ED estaban muy recomendadas las pruebas de ecocardiografía y de función pulmonar como paciente ambulatorio o en el hospital si el paciente estaba ingresado. Para cada paciente incluido en el estudio, Los médicos del ED evaluaron la probabilidad de que el paciente presentara HF (evaluando un valor del 0 al 100 por
25 ciento de certeza clínica) como la causa de su disnea incluyendo toda la información disponible del examen físico, ECG, rayos X torácicos y análisis de sangre incluyendo BNP.

30 Definición del patrón de referencia ("de oro") de insuficiencia cardiaca

Para determinar el diagnóstico real, dos cardiólogos independientes revisaron todas las historias clínicas relativas al paciente y clasificaron independientemente el diagnóstico como disnea debida a HF o disnea debida a otra causa distinta de HF. Ambos cardiólogos tenían acceso a los registros del ED y cualquier información adicional que estuviera disponible durante o tras la evaluación en el ED. Esta información incluía los niveles de BNP, rayos X torácicos, historia médica que no estaba disponible para los médicos del ED, los resultados de pruebas posteriores
35 tales como ecocardiografía, obtención de imagen mediante radionúclidos o ventriculografía izquierda, realizados en el momento de cateterismo cardiaco, prueba de la función pulmonar, TAC, ultrasonidos de compresión para la evaluación de embolia pulmonar, cateterismo cardiaco derecho, el transcurso en el hospital de los pacientes ingresados en el hospital, la respuesta a terapia, los datos de la autopsia en pacientes fallecidos y la información sobre acontecimientos clínicos o reingresos durante un seguimiento de 90 días. Se consideró el nivel de BNP como un marcador cuantitativo de HF y por tanto se interpretó como una variable continua para realizar el mejor uso de la información proporcionada por esta prueba. Cuanto mayor sea el nivel de BNP, mayor es la probabilidad de que HF esté presente y de que sea la causa de disnea. Se ajustaron los valores de BNP absolutos para la presencia de enfermedad renal y obesidad para maximizar la precisión de diagnóstico (Mueller, C. *et al.*, Swiss Med Wkly, 2007. 137(1-2): págs. 4-12.).

45 Medición de péptidos natriuréticos

Durante la evaluación inicial, se recogió una muestra de sangre en tubos que contenían potasio-EDTA. Se analizaron los MR-proANP y NT-proBNP de muestras de plasma congeladas inmediatamente a -80°C hasta el
50 análisis. Se realizó la detección de MR-proANP utilizando un inmunoensayo de tipo sándwich (MR-proANP LIA, B.R.A.H.M.S, Hennigsdorf/Berlín, Alemania) tal como se describe en detalle en otra parte (Morgenthaler, N.G., *et al.*, Clin Chem, 2004. 50(1): págs. 234-6.). La mediana de MR-proANP en 325 individuos sanos en investigaciones anteriores era de 45 pmol/l (intervalo de confianza (IC) del 95% de 43 a 49 pmol/l) (Morgenthaler, N.G., *et al.*, Clin Chem, 2004. 50(1): págs. 234-6.). Se determinaron los niveles de NT-proBNP mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia cuantitativo (Elecsys proBNP, Roche Diagnostics AG, Zug, Suiza). Se midió BNP mediante un inmunoensayo enzimático de micropartículas (AxSym, Abbott Laboratories, IL, EE.UU).

60 Análisis estadístico

Se compararon los datos de una variable sobre características demográficas y clínicas entre pacientes con disnea debida a HF y pacientes con disnea que no se debía a HF mediante la prueba de la U de Mann-Whitney no paramétrica o la prueba exacta de Fisher según fue apropiado. Se consideraron MR-proANP y NT-proBNP como variables continuas y se transformaron logarítmicamente para lograr la normalidad. El objetivo principal era comparar la precisión de MR-proANP con la de NT-proBNP. Como los niveles de BNP estaban disponibles para el diagnóstico de patrón de referencia ("de oro") de HF, se consideró que la comparación de MR-proANP con BNP estaba sesgada en favor de BNP y por tanto no se incluyó BNP en el análisis ROC. El objetivo secundario era investigar, si la adición

de MR-proANP al criterio clínico en el ED, incluyendo rayos X torácicos e información de BNP, aumentaría adicionalmente la precisión de diagnóstico. Para determinar la precisión de diagnóstico de MR-proANP y NT-proBNP para HF, se analizaron curvas de característica operativa del receptor (ROC) y se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) para ambos marcadores. Se compararon las AUC según el procedimiento por Hanley y McNeil (Hanley, J.A. *et al.*, *Radiology*, 1983. 148(3): págs. 839-43.). Se alcanzó el punto límite óptimo seleccionando el punto en la curva ROC que maximizaba tanto la sensibilidad como la especificidad. El punto de corte óptimo para la certeza clínica en el ED de HF se eligió a $\geq 80\%$, un punto de corte que proporciona certeza razonable y factible, McCullough, P.A., *et al.*, *Circulation*, 2002. 106(4): págs. 416-22. Se compararon las precisiones diagnósticas de ambos ensayos a concentraciones límite óptimas según se determinaron mediante análisis ROC mediante la prueba de McNemar (comparación de parejas discordantes de clasificaciones bioquímicas falsas). Para determinar cocientes de probabilidades para la detección de HF con respecto a umbrales de MR-proANP y NT-proBNP de la precisión de diagnóstico más alta, se realizó un análisis de regresión logística sin ajustar y ajustado para covariables significativas (edad, CHF anterior, infarto de miocardio anterior, tasa de filtración glomerular estimada, hemoglobina, estertores pulmonares, edema periférico e ingurgitación venosa yugular). Se utilizó el coeficiente de correlación de rangos de Spearman para evaluar la relación de las concentraciones de MR-proANP y NT-proBNP en la población de estudio. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) utilizando la fórmula convencional de peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros. Se definió peso normal como un IMC $< 25 \text{ kg/m}^2$, sobrepeso como un IMC entre 25 kg/m^2 y $29,9 \text{ kg/m}^2$ y obesidad como un IMC de 30 kg/m^2 o superior, según la definición de la Organización Mundial de la Salud. Se calculó la tasa de filtración glomerular utilizando la fórmula de modificación de dieta en enfermedad renal (MDRD) (Stevens, L.A. *et al.*, *N Engl J Med*, 2006. 354(23): págs. 2473-83.). Se analizaron estadísticamente los datos con software SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EE.UU) y el paquete MedCalc 9.3.9.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica). Todas las probabilidades eran bilaterales y se consideró $p < 0,05$ como significativo.

Resultados

Se incluyó un total de 287 en este estudio (figura 3). La mediana de la edad era de 77 años. Había 149 hombres (52%) y 138 mujeres (48%). La hipertensión arterial estaba presente en el 68% de los pacientes, el 28% presentaba cardiopatía coronaria y el 34% presentaba enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Los diuréticos (52%) eran la medicación crónica prescrita más común, seguida por inhibidores de ACE o bloqueantes del receptor de AT-II (49%) y beta-bloqueantes (39%). En el examen, el 54% de los pacientes presentaban estertores en los campos pulmonares inferiores, el 42% presentaban edema de las extremidades inferiores y el 28% presentaba ingurgitación venosa yugular.

El diagnóstico de patrón de oro adjudicado fue HF en 154 (54%) pacientes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica en 71 (25%) pacientes, neumonía en 33 (11%) pacientes, tumor maligno en 10 (3%) pacientes, embolia pulmonar en 8 (3%) pacientes, hiperventilación en 7 (2%) pacientes y otras causas tales como enfermedad pulmonar intersticial, asma o bronquitis en 14 (5%) pacientes. Existían varios pacientes con dos razones principales para la disnea tal como exacerbación de enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía.

Los niveles de MR-proANP y NT-proBNP en pacientes con y sin un diagnóstico de patrón de oro adjudicado de HF se muestran en la figura 4. La mediana de la concentración de MR-proANP de los pacientes con HF (400 pmol/l, IQR 246 - 642 pmol/l) era significativamente más alta que la de los sin HF (92 pmol/l, IQR 92 - 173 pmol/l; $p < 0,001$ para la diferencia). La mediana de la concentración de NT-proBNP en pacientes con HF era de 5757 pg/ml (IQR 1924 - 13243 pg/ml) frente a 300 pg/ml (IQR 76 - 974 pg/ml) en pacientes sin HF ($p < 0,001$ para la diferencia). El coeficiente de correlación de rangos de Spearman era de 0,899 entre MR-proANP y NT-proBNP ($p < 0,001$). El AUC de MR-proANP era de 0,92 (IC del 95% de 0,88 a 0,95) para el diagnóstico de HF, idéntico al AUC de NT-proBNP con 0,92 (IC del 95% de 0,89 a 0,95; $p = 0,791$; figura 6a). Basándose en el análisis ROC, el valor límite de diagnóstico óptimo para MR-proANP y NT-proBNP para alcanzar la precisión de diagnóstico más alta era de 206 pmol/l y 1540 pg/ml, respectivamente. En este límite, la precisión, la sensibilidad y la especificidad para MR-proANP eran todas del 84%. El análisis de regresión logística confirmó MR-proANP como un potente factor pronóstico de HF en análisis tanto de una variable como de múltiples variables (figura 5).

El AUC para la combinación de probabilidad en el ED con MR-proANP era significativamente más alta que la probabilidad en el ED sola ($p=0,016$, figura 6b). La precisión de diagnóstico del criterio clínico con alta probabilidad en el ED de HF (certeza clínica del 80% al 100%) era del 79,4%. Por tanto, como una medida global de valor de diagnóstico, niveles de MR-proANP $> 206 \text{ pmol/l}$ añadidos a la probabilidad en el ED habrían aumentado la precisión de diagnóstico considerablemente hasta el 87,8% ($p < 0,001$, figura 7). En términos generales, MR-proANP a un valor límite de 206 pmol/l y la probabilidad en el ED $\geq 80\%$ de certeza eran indicadores relativamente independientes, tal como se refleja mediante un valor kappa de Cohens de 0,47 ($p < 0,001$).

Tal como se muestra en la figura 8, MR-proANP y NT-proBNP diferían con respecto a su asociación con el IMC. En los pacientes con HF, los niveles de MR-proANP medios no eran diferentes en pacientes con sobrepeso y obesos en comparación con individuos con IMC normal ($p = 0,346$ para ambos), mientras que los niveles de NT-proBNP eran más bajos en pacientes con sobrepeso y obesos que en pacientes de peso normal ($p = 0,025$ para ambos).

Descripción de las figuras

- Figura 1: muestra la secuencia de NT-proANP.
- 5 Figura 2: muestra la secuencia de proANP. La tabla ilustra las características iniciales de 287 pacientes.
- Figura 3: La tabla ilustra las características iniciales de 287 pacientes; eGRF = tasa de filtración glomerular estimada; MR-proANP = pro-péptido natriurético auricular de la región media; NT-proBNP = pro-péptido natriurético de tipo B N-terminal
- 10 Figura 4: Gráficos de cajas que muestran niveles de NT-proBNP y MR-proANP para pacientes con disnea provocada por insuficiencia cardiaca (n = 154) y pacientes con disnea que puede atribuirse a otras causas (n = 133); todos $p < 0,001$.
- 15 NT-proBNP = pro-péptido natriurético de tipo B N-terminal; MR-proANP = pro-péptido natriurético auricular de la región media.
- Las cajas representan el percentil 25 y 75, mientras que los bigotes representan la concentración de mínima a máxima, excluyendo resultados discrepantes que se presentan como puntos separados.
- 20 Figura 5: La tabla ilustra análisis de regresión logística para la predicción de insuficiencia cardiaca mediante MR-proANP y NT-proBNP; MR-proANP = pro-péptido natriurético auricular de la región media; NT-proBNP = pro-péptido natriurético de tipo B N-terminal. La tabla ilustra análisis de regresión logística para la predicción de insuficiencia cardiaca mediante MR-proANP y NT-proBNP.
- 25 Figura 6a: Curva de característica operativa del receptor (ROC) para la precisión de NT-proBNP y MR-proANP para diagnosticar insuficiencia cardiaca en pacientes con disnea. Área bajo la curva (AUC): para NT-proBNP = 0,92; para MR-proANP = 0,92 ($p=0,791$ para comparación).
- 30 Figura 6b: Curva de característica operativa del receptor (ROC) para la probabilidad en el servicio de urgencias (ED), MR-proANP, y ambos en la detección de insuficiencia cardiaca. (Área bajo la curva (AUC): para MR-proANP = 0,92; para probabilidad en el ED = 0,90; para combinación = 0,96; $p=0,016$ para la comparación de probabilidad en el ED y combinación de probabilidad en el ED con MR-proANP)
- 35 Figura 7: Precisión de diagnóstico del criterio clínico (alta probabilidad en el servicio de urgencias de insuficiencia cardiaca), MR-proANP utilizando un valor límite de 206 pmol/l, y ambos combinados en la detección de insuficiencia cardiaca ($p < 0,001$).
- 40 Figura 8: Niveles de NT-proBNP y MR-proANP medios en pacientes con y sin insuficiencia cardiaca, agrupados por el índice de masa corporal (IMC).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *in vitro* para el diagnóstico médico, el pronóstico y el seguimiento terapéutico para pacientes que presentan una cardiopatía o que se sospecha que están desarrollando o que presentan una cardiopatía que comprende las etapas siguientes:
- proporcionar una muestra de un paciente que presenta una cardiopatía o que se sospecha que está desarrollando o que presenta una cardiopatía,
 - 10 • determinar la zona de la región media de proANP amino-terminal, que comprende del aminoácido 50 al aminoácido 90, o péptidos parciales del mismo en dicha muestra con un inmunoensayo de tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos que se unen específicamente a secuencias parciales diferentes de dicha zona de la región media de proANP amino-terminal,
 - 15 • atribuir el nivel de proANP amino-terminal determinado o el nivel de los péptidos parciales del mismo a un cuadro clínico en el que la atribución a un cuadro clínico se lleva a cabo con la ayuda de un valor límite independiente del IMC de desde 190 hasta 260 pmol/l.
- 20 2. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1, en el que la cardiopatía se selecciona de entre el grupo que comprende insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, síndrome coronario agudo e infarto de miocardio.
- 25 3. Procedimiento *in vitro* según las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho procedimiento es un procedimiento para el diagnóstico médico.
4. Procedimiento *in vitro* según las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paciente presenta síntomas de disnea y se sospecha por tanto que presenta insuficiencia cardíaca.
- 30 5. Procedimiento *in vitro* según las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paciente o el grupo de pacientes presenta un IMC igual o superior a 30 kg/m² y la muestra es proporcionada por un paciente que presenta un IMC igual o superior a 30 kg/m².
- 35 6. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 5, en el que el procedimiento es un procedimiento de pronóstico.
7. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 5 o 6, en el que la enfermedad es la insuficiencia cardíaca crónica.
- 40 8. Procedimiento *in vitro* según las reivindicaciones 1 a 7, en el que la muestra proporcionada de un paciente se selecciona de entre un grupo que comprende plasma, suero, sangre y orina.
9. Procedimiento *in vitro* según las reivindicaciones 1 a 8, en el que el procedimiento se lleva a cabo en combinación con otros marcadores y/o procedimientos.
- 45 10. Procedimiento *in vitro* según las reivindicaciones 1 a 9, en el que se determina por lo menos otro marcador en una muestra de paciente, seleccionándose el marcador de entre un grupo que comprende un marcador inflamatorio, un marcador cardiovascular y un marcador isquémico.
- 50 11. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 10, en el que el marcador inflamatorio se selecciona de entre un grupo que comprende proteína-C reactiva (CRP), citocinas tales como por ejemplo TNF-alfa, interleucinas tales como por ejemplo IL-6, procalcitonina 1-116 o péptidos de la misma que presentan de 12 a 116 aminoácidos, que presentan preferentemente de 100 a 116 aminoácidos y moléculas de adhesión tales como por ejemplo VCAM o ICAM.
- 55 12. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 10, en el que el marcador cardiovascular se selecciona de entre un grupo que comprende mieloperoxidasa, el proBNP completo o fragmentos de péptido de proBNP de por lo menos 12 residuos de aminoácido de longitud incluyendo BNP y NT-proBNP, pro-endotelina-1, pro-adrenomedulina, pro-vasopresina, pro-péptido liberador de gastrina (proGRP), pro-leptina, pro-neuropéptido-Y, pro-somatostatina, pro-neuropéptido-YY, pro-opiomelanocortina.
- 60 13. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 10, en el que el marcador isquémico se selecciona de entre un grupo que comprende troponina I o T, CK-MB, mioglobina.
14. Procedimiento *in vitro* según las reivindicaciones 1 a 13, en el que el procedimiento se realiza como ensayo de prueba rápida.

Fig. 1:

Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Asn Leu Leu Asp His Leu Glu Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val
 20 25 30

Val Pro Pro Gln Val Leu Ser Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala
 35 40 45

Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro
 50 55 60

Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser
 65 70 75 80

Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala
 85 90 95

Pro Arg

Fig. 2:

Asn	Pro	Met	Tyr	Asn	Ala	Val	Ser	Asn	Ala	Asp	Leu	Met	Asp	Phe	Lys
1				5					10					15	
Asn	Leu	Leu	Asp	His	Leu	Glu	Glu	Lys	Met	Pro	Leu	Glu	Asp	Glu	Val
			20					25					30		
Val	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Ser	Glu	Pro	Asn	Glu	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala
		35					40					45			
Leu	Ser	Pro	Leu	Pro	Glu	Val	Pro	Pro	Trp	Thr	Gly	Glu	Val	Ser	Pro
	50					55					60				
Ala	Gln	Arg	Asp	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Trp	Asp	Ser	Ser
65					70					75					80
Asp	Arg	Ser	Ala	Leu	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Thr	Ala
				85					90					95	
Pro	Arg	Ser	Leu	Arg	Arg	Ser	Ser	Cys	Phe	Gly	Gly	Arg	Met	Asp	Arg
			100					105					110		
Ile	Gly	Ala	Gln	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Asn	Ser	Phe	Arg	Tyr	Arg	Arg
		115					120								

Fig. 3

Tabla 1. Características iniciales				
Característica	Todos los pacientes (n=287)	Insuficiencia cardiaca (n = 154, 54 %)	Sin insuficiencia cardiaca (n =133, 46%)	Valor de p
Edad - años [†]	77 (68-83)	80 (75-85)	71 (58-79)	<0,001
Género masculino (%)	52	51	53	0,906
Índice de masa corporal - kg/m ² *	26±6	27±6	26±7	0,124
<i>Historia (%)</i>				
Hipertensión	68	78	56	<0,001
Historia de insuficiencia cardiaca	24	40	7	<0,001
Arteriopatía coronaria	28	38	16	<0,001
Diabetes	18	24	11	0,006
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	34	27	42	0,006
Enfermedad renal crónica	28	44	11	<0,001
<i>Disnea (%)</i>				
Subiendo una ligera pendiente	20	9,7	32	<0,001
Caminando en terreno llano	40	45	35	
En reposo	40	46	33	
<i>Hallazgos de la exploración física (%)</i>				
Frecuencia cardiaca, lpm*	93±23	93±25	92±19	0,495
Tensión arterial sistólica, mmHg *	138±26	135±27	140±25	0,098
Tensión arterial diastólica, mmHg *	83±16	82±17	83±14	0,455
Frecuencia respiratoria [†]	24 (20-28)	24 (20-28)	24 (18-28)	0,678
Estertores	54	64	43	0,001
Edema de las extremidades inferiores	42	57	26	<0,001
Reflujo hepatoyugular	8,0	12	3,8	0,016
Ingurgitación yugular	28	44	11	<0,001

Tabla 1. Continuación				
Característica	Todos los pacientes (n=287)	Insuficiencia cardiaca (n = 154)	Sin insuficiencia cardiaca (n = 133)	Valor de p
Medicación crónica (%)				
Betabloqueantes	39	57	17	<0,001
Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina/ bloqueantes del receptor de angiotensina	49	62	34	<0,001
Diuréticos de asa	52	64	38	<0,001
Antagonistas de calcio	18	21	14	0,070
Digoxina	4,9	5,2	4,5	0,169
Espironolactona	2,4	3,9	0,8	0,041
Hallazgos de laboratorio				
Creatinina sérica - $\mu\text{mol/l}^{\ddagger}$	85 (66-120)	99 (79-147)	71 (56-96)	<0,001
eGFR - $\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2^{\ddagger}$	67 (44-89)	54 (36-73)	80 (63-112)	<0,001
Nitrógeno ureico en sangre - mmol/l^{\ddagger}	7,3 (5,4-12,0)	9,7 (6,7-15,6)	6,0 (4,4-7,7)	<0,001
Sodio - mmol/l^{\ddagger}	137 (134-139)	137 (135-139)	137 (134-140)	0,238
Hemoglobina g/l^{\ddagger}	133 (118-145)	129 (112-141)	138 (125-150)	<0,001
Troponina T $\mu\text{g/l}^{\ddagger}$ (n=192)	0,01 (0,01-0,03)	0,01 (0,01-0,04)	0,01 (0,01-0,01)	<0,001
BNP $\text{pg}/\text{ml}^{\ddagger}$	349 (90-1120)	976 (467-1925)	81 (39-181)	<0,001
NT-proBNP $\text{pg}/\text{ml}^{\ddagger}$	1656 (314-6105)	5757 (1924-13243)	300 (76-974)	<0,001
MR-proANP pmol/l^{\ddagger}	221 (93-441)	400 (246-643)	92 (60-173)	<0,001
Hallazgos de ecocardiografía (%)				
Fración de eyección del ventrículo izquierdo [§]	(n=116) 56 (35-65)	(n=89) 50 (33-60)	(n=27) 65 (60-65)	<0,001

* medias \pm DE, \ddagger mediana (percentil 25 - 75)

Fig. 4:

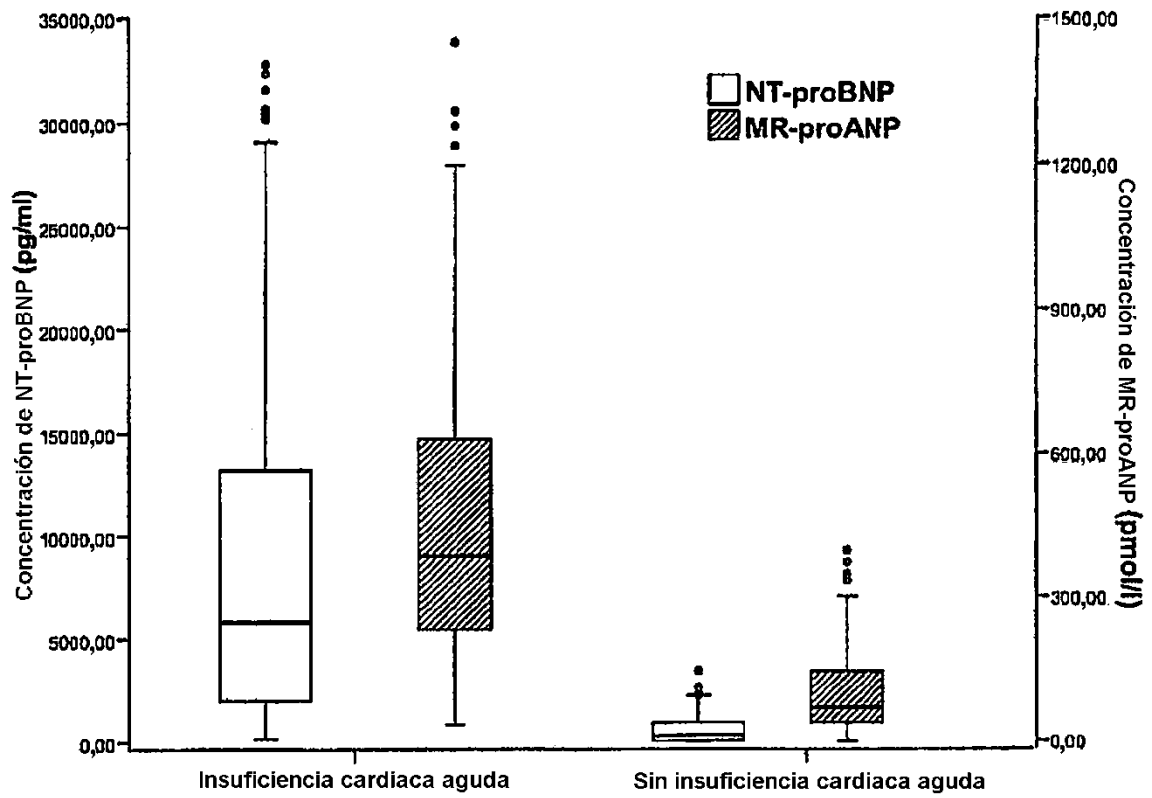


Fig. 5:

Tabla 2. Analisis de regresion logistica para la prediccion de insuficiencia cardiaca mediante MR-pro ANP y NT-proBNP							
Analito	Concentración límite óptima	Razón de probabilidades (CI del 95%)	p	Precisión de diagnóstico, %	Falsos positivos, n	Falsos negativos, n	
<i>Modelo no ajustado</i>							
MR-proANP (pmol/l)	206	26 (14-50)	<0,001	84	22	25	
NT-proBNP (pg/ml)	1540	30 (16-56)	<0,001	85	21	23	
<i>Modelo ajustado</i>							
MR-proANP (pmol/l)	206	20 (9-45)	<0,001	83	25	23	
NT-proBNP (pg/ml)	1540	19 (9-42)	<0,001	83	24	23	

* Ajustado por edad, historia de insuficiencia cardiaca, infarto de miocardio anterior, tasa de filtración glomerular, hemoglobina, estertores pulmonares, edema periférico, ingurgitación yugular

Fig. 6 a

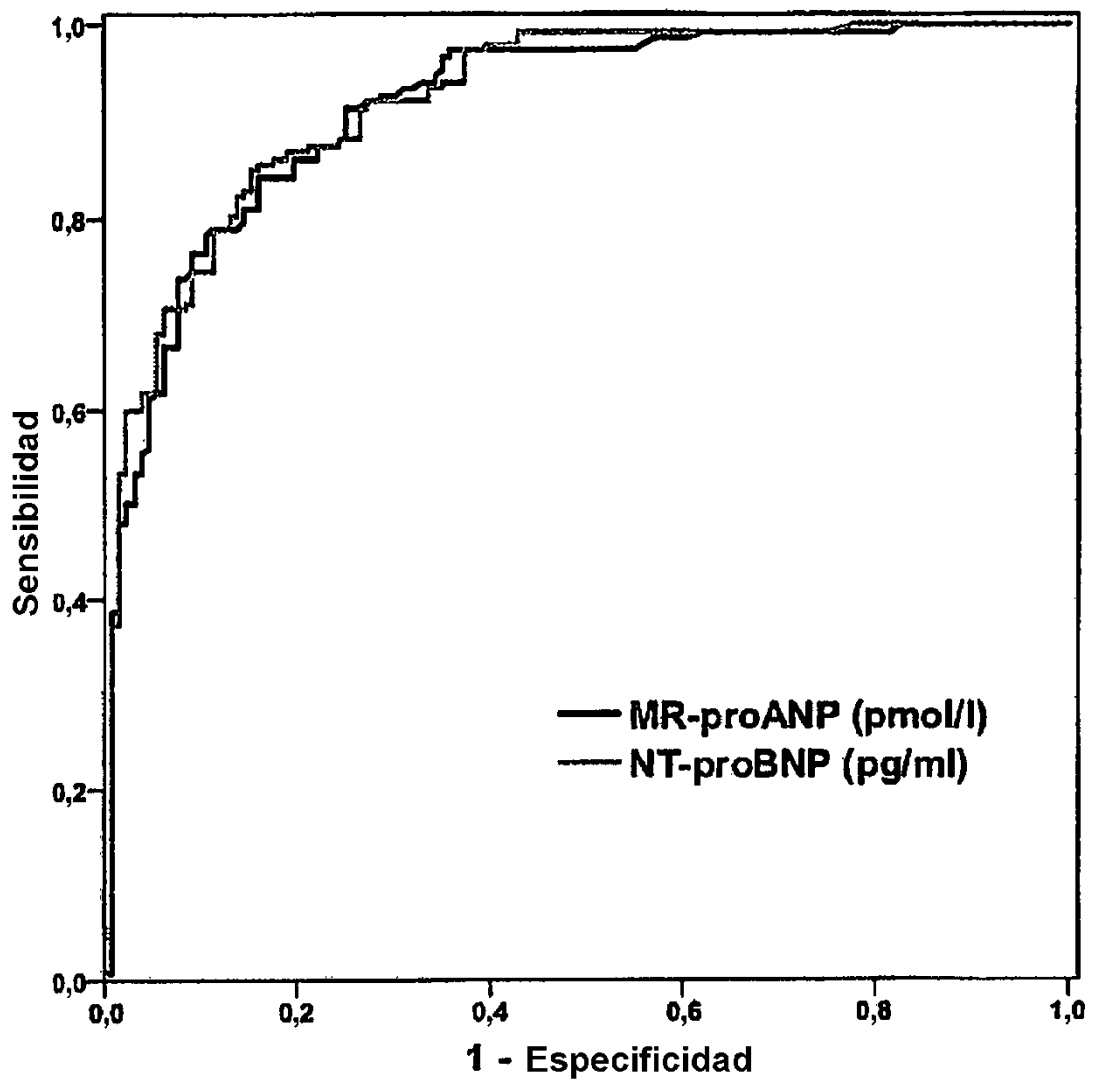


Fig. 6 b:

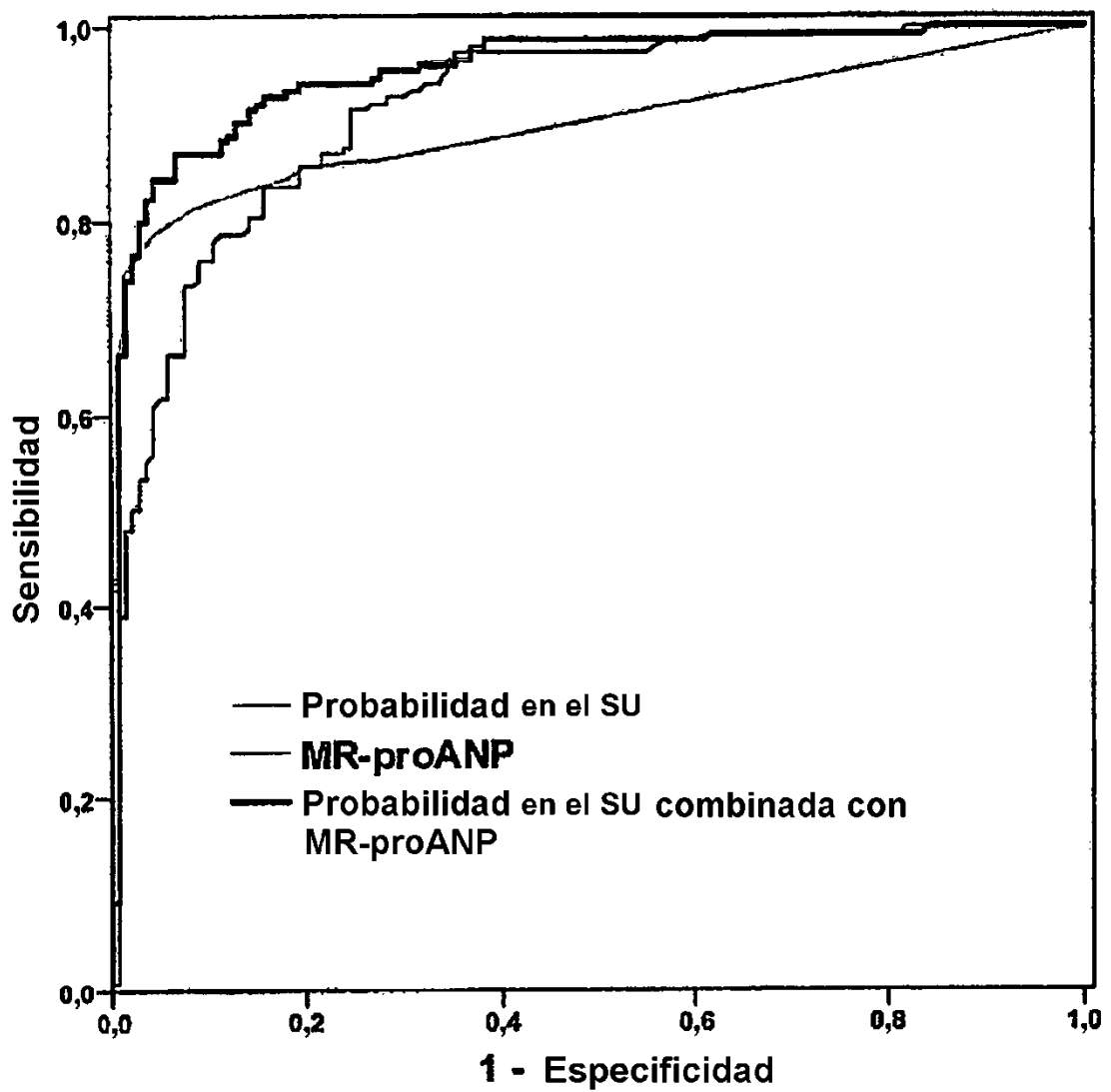
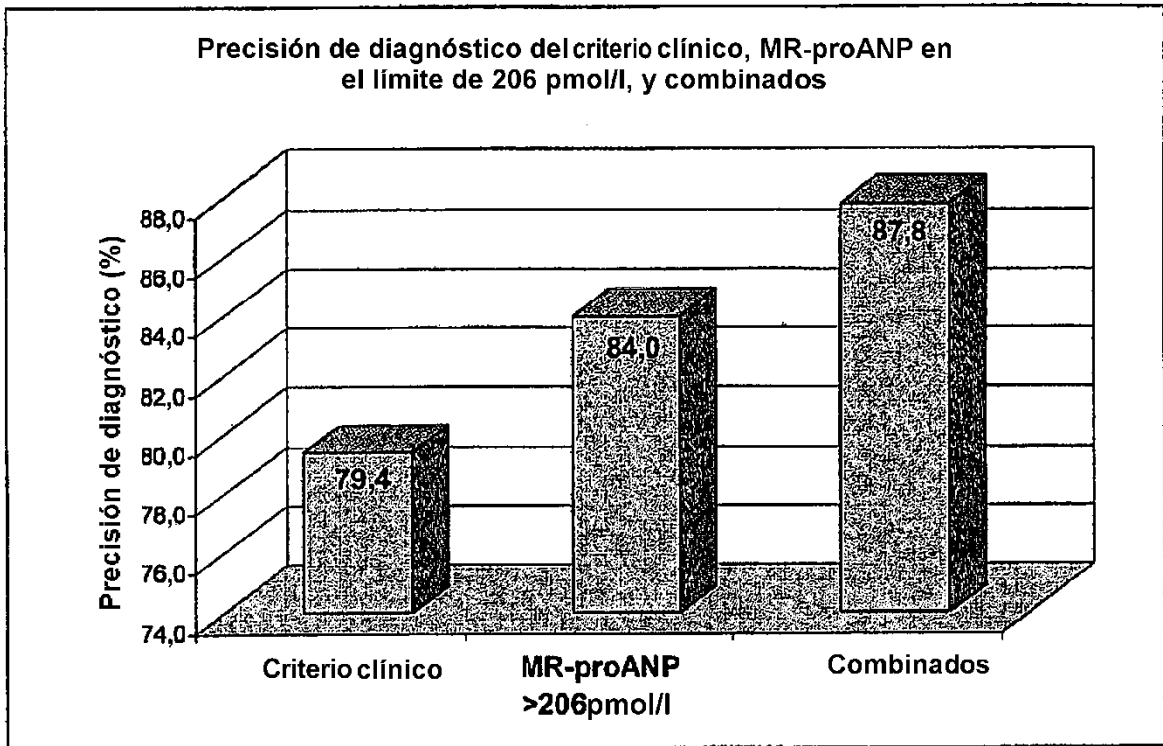


Fig. 7:



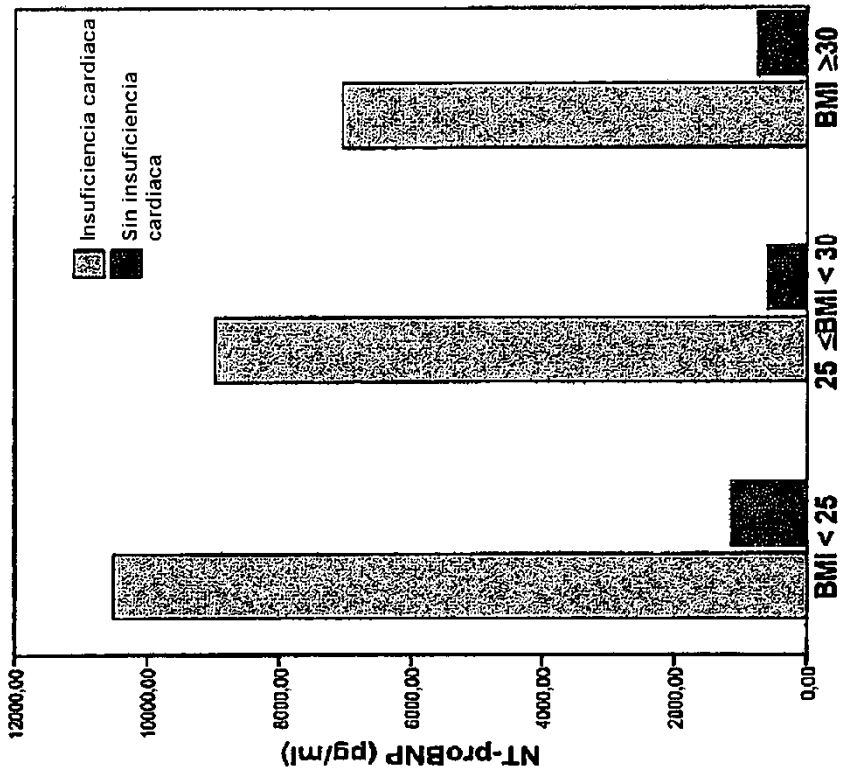
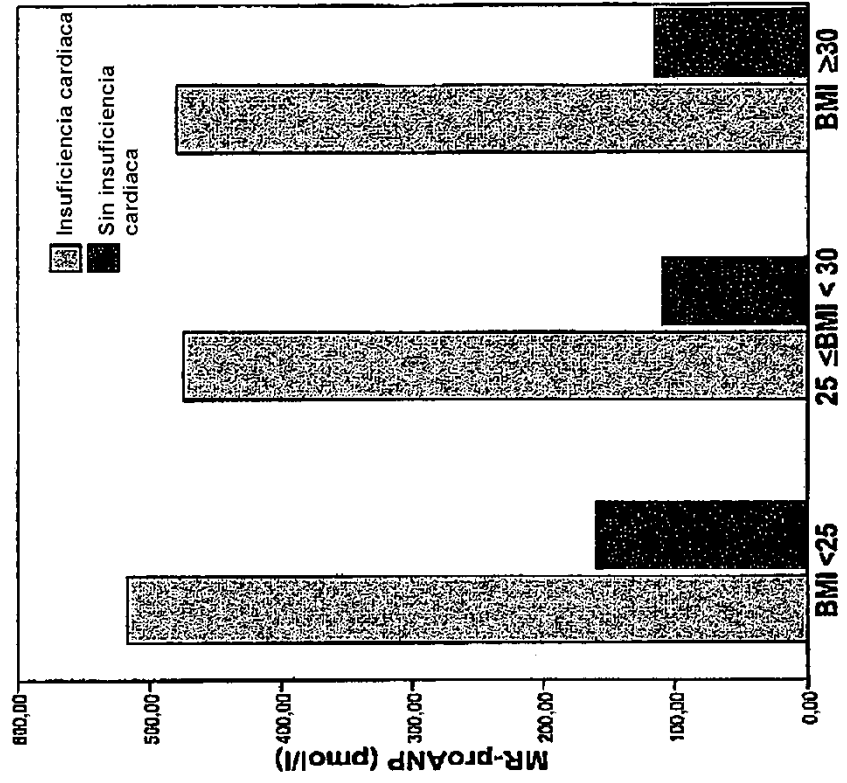


Fig. 8: