

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 119**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009** **E 09727643 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014** **EP 2260307**

54 Título: **Niveles de pro-endotelina-1 para la predicción de riesgo de episodios taquiarrítmicos**

30 Prioridad:

04.04.2008 EP 08154109

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

30.05.2014

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 2 464 119 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

Niveles de pro-endotelina-1 para la predicción de riesgo de episodios taquiarritmicos.

- 5 La invención se refiere a procedimientos *in vitro* para la estratificación de riesgo para la indicación de la implantación de dispositivo y/o terapia híbrida antiarrítmica para un paciente que presenta una cardiopatía tal como insuficiencia cardíaca. La invención se refiere además a la utilización de un procedimiento de este tipo.
- 10 Los cardioversores-desfibriladores implantables (ICD) ponen fin eficazmente a las arritmias ventriculares malignas previniendo la muerte súbita. Sin embargo, la implantación de ICD es costosa, invasiva y se asocia con efectos adversos tales como choques inapropiados, problemas psicosociales, problemas de derivación e infección (Ezekowitz *et al*, Ann Intern Med 2007; 147: 251-62; Rosenqvist *et al*, Circulation 1998; 98: 663-70; Sanders GD *et al*, N Engl J Med 2005; 353: 1471-80). Es de interés que se haya puesto en duda la rentabilidad de la implantación profiláctica de un ICD (Goldman *et al*, N Engl J Med 2005; 353: 1513-5), ya que hasta dos terceras partes de los
- 15 pacientes mueren sin recibir terapia con ICD previa (Ezekowitz *et al*, Ann Intern Med 2007; 147:251-62). Consecuentemente, resulta imperativa la estratificación de riesgo para la indicación adecuada de implantación de dispositivo y/o terapia híbrida antiarrítmica (Ezekowitz *et al*, Ann Intern Med 2007; 147:251-62).
- 20 La activación del sistema neurohumoral se ha asociado con el riesgo aumentado de taquiarritmias malignas (fibrilación ventricular o taquicardia ventricular rápida) en pacientes con disfunción ventricular izquierda (LV) sistólica. De hecho, niveles aumentados del péptido natriurético tipo B (BNP) indican riesgo aumentado de muerte súbita cardíaca (Berger *et al*, Circulation 2002; 105:2392-7; Brunner-La Rocca *et al*, Eur Heart J 2001; 22:1136-43). Sin embargo, el BNP es un marcador cuantitativo de la gravedad de la insuficiencia cardíaca e indica riesgo aumentado de muerte (Dao *et al*, J Am Coll Cardiol 2001; 37:379-85), aunque no es útil para predecir correctamente
- 25 acontecimientos taquiarritmicos que requieran antes de terapia con ICD.
- Se han observado niveles elevados de endotelina sérica y endotelina grande en pacientes que padecen o que han padecido taquiarritmia ventricular (Szucs *et al*, J Cardiovasc Pharmacol 2004, 44:S402-6).
- 30 Se ha especulado además, basándose en experimentos a corto plazo, que la ET y la ET grande podrían actuar como mediadores para arritmogénesis en conejos (Alexiou *et al*, JACC 1998, 32:1773-8).
- El documento US 2005/0177196 A1 especula sobre la utilización de biomarcadores para valorar el riesgo de que los pacientes adquieran taquiarritmia ventricular. Sin embargo, esta solicitud no proporciona en este contexto biomarcadores específicos.
- 35 Por tanto, un objetivo de la presente invención consiste en descubrir un marcador que prediga acontecimientos taquiarritmicos en pacientes que presentan una cardiopatía como por ejemplo insuficiencia cardíaca crónica.
- 40 Sorprendentemente, se descubre que niveles aumentados de CT-proET-1 pueden predecir la aparición de un primer acontecimiento taquiarritmico ventricular maligno que requiere terapia con dispositivo. Los niveles aumentados de CT-proET-1 predicen de manera independiente la aparición futura de taquiarritmias malignas en pacientes con ICD con insuficiencia cardíaca y LV-EF reducida. Además, la medición de los niveles de CT-proET-1 puede ser muy útil para la estratificación de riesgo de pacientes que requieren un ICD para la prevención primaria de muerte súbita
- 45 arrítmica.
- Por tanto, un objeto de la presente invención es un procedimiento *in vitro* para la estratificación de riesgo para la indicación de implantación de dispositivo ICD y/o una terapia híbrida antiarrítmica para un paciente que presenta una cardiopatía que comprende:
- 50
- determinar el nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos en una muestra obtenida de un paciente.
- 55 En caso de que se determine el nivel de fragmentos de CT-proET-1, estos fragmentos comprenden al menos 12 aminoácidos, preferiblemente al menos 20 aminoácidos, preferiblemente al menos 30 aminoácidos. La endotelina (ET)-1 es un potente vasoconstrictor endógeno derivado del endotelio (Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. J Hypertens Suppl. 1988;6:S188-91.). La ET-1 ejerce sus efectos vasculares mediante la activación de receptores ET(A) y ET(B) en células de músculo liso, lo que produce un aumento en el calcio intracelular (Yanagisawa *et al*, J Hypertens Suppl. 1988;6:S188-91). La endotelina madura-1 se deriva de un precursor más grande denominado pro-endotelina-1. La pro-endotelina-1 puede procesarse de manera proteolítica dando lugar a diversos fragmentos tal como se describe (Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor *in vivo*. Peptides. Diciembre de 2005; 26(12):2482-6.). Estos fragmentos se someten a degradación proteolítica en la circulación sanguínea, que puede producirse de manera
- 60 rápida o lenta, dependiendo del tipo de fragmento y del tipo y concentración/actividad de las proteasas presentes en la circulación. Un ejemplo de estos fragmentos es la pro-endotelina-1 C-terminal (CT-proET-1), que puede medirse
- 65

mediante un inmunoensayo de tipo sándwich (Papassotiropoulos J, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma, Clin Chem. Junio de 2006; 52(6):1144-5 1.)

5 Las variables continuas se expresan como media±desviación estándar (DE) o se expresan como mediana (intervalo) y estimación de punto (intervalos de confianza del 95%) tal como se indica. El objetivo fue examinar si la CT-proET-1 contribuye a predecir el tiempo hasta el primer acontecimiento taquiarritmico maligno. Se definieron las taquiarritmias malignas como taquiarritmias ventriculares rápidas (VT o VF) con duraciones de ciclo $\leq$ 250 ms (frecuencia cardiaca $\geq$ 240 lpm) lo que conduce probablemente a muerte si no se ponen fin mediante el dispositivo (Bocker D, Block M, Isbruch F, *et al.* Do patients with an implantable defibrillator live longer? J Am Coll Cardiol 1993;21:1638-44.). Se utilizaron modelos de riesgos proporcionales de Cox de una sola variable y de múltiples variables para evaluar las asociaciones entre las medidas del desenlace.

15 En una forma de realización del procedimiento según la presente invención, dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos se correlaciona con el riesgo de padecer primeras taquiarritmias malignas.

El objeto de dicho procedimiento es la estratificación de pacientes según su necesidad de un cardioversor-desfibrilador implantable (ICD) y/o una terapia híbrida antiarritmica.

20 Según una forma de realización preferida de la invención, dicha etapa de correlación comprende comparar dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos con un nivel umbral, mediante lo cual, cuando dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos supera dicho nivel umbral, dicho paciente está en alto riesgo de padecer taquiarritmia.

25 Se han estratificado pacientes con ICD en dos grupos según los niveles de CT-proET-1 o BNP y se ha realizado el análisis de Kaplan-Meier. El riesgo de padecer taquiarritmia fue significativamente superior en pacientes con niveles plasmáticos de CT-proET-1 $>$ 73 pmol/l (mediana) que en pacientes con valores de CT-proET-1 por debajo de este punto de corte (prueba de rangos logarítmicos, $p < 0,001$, figura 1A). No se descubrieron diferencias significativas en pacientes con niveles plasmáticos de BNP $\leq$ 183 pg/ml (mediana) o $>$ 183 pg/ml utilizando taquiarritmia maligna como criterio de valoración (prueba de rangos logarítmicos, $p = 0,10$, figura 1B). No se descubrieron asociaciones significativas de la fracción de eyección LV y los niveles de CT-proET-1 (figura 2). El área bajo la curva ROC que utilizó los niveles de CT-proET-1 para predecir la aparición de una primera taquiarritmia maligna fue de 0,69 (figura 1A, parte insertada). La concentración óptima de CT-proET-1 para el cálculo de la precisión de predicción positiva y negativa tal como se obtiene a partir de la curva ROC fue de 75,5 pmol/l (80,8% de sensibilidad, 64,4% de especificidad, 92,1% de valor predictivo negativo, 39,6% de valor predictivo positivo y una razón de verosimilitud positiva de 2,27). Los niveles plasmáticos de CT-proET-1 contribuyeron de manera significativa a los modelos de regresión de Cox de múltiples variables que predicen el riesgo de padecer la primera taquiarritmia maligna. Se ha calculado la razón del riesgo por incremento en pmol/l de los niveles de CT-proET-1 (tabla 2). La utilización del logaritmo de CT-proET-1 en análisis estadístico no cambió los resultados obtenidos. El análisis de regresión de Cox de múltiples variables reveló que el tratamiento con betabloqueantes indica un pronóstico favorable (tabla 2).

Por tanto, en una forma de realización preferida de la invención, dicho nivel umbral está en aproximadamente 73 +/- 20% pmol/l.

45 Según una forma de realización preferida, la cardiopatía es cualquier estado, para el que está indicada potencialmente la implantación de un ICD, incluyendo insuficiencia cardiaca de etiología o bien isquémica o bien no isquémica. Según una forma de realización preferida, los pacientes presentan una fracción de eyección LV $\leq$ 45%.

50 La muestra obtenida de un paciente es preferiblemente una muestra seleccionada del grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma.

Además, un objeto de la presente invención es un procedimiento que comprende adicionalmente combinar dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos con el nivel/estado de uno o más marcadores, parámetros o factores de pronóstico adicionales, mediante lo cual la combinación de dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos con dicho nivel/estado de uno o más marcadores, parámetros o factores de pronóstico adicionales aumenta el valor predictivo para el riesgo de dicho procedimiento.

60 En una forma de realización preferida, el marcador, parámetro o factor de pronóstico adicional se selecciona de un grupo que comprende todos los parámetros enumerados en la tabla 2, que muestran un $p < 0,05$ en el análisis de una sola variable o de múltiples variables, mediante lo cual el BNP es solo un ejemplo para proBNP o fragmentos del mismo de al menos 12 aminoácidos que incluyen BNP o NT-proBNP.

65 Preferiblemente, se mide dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos con un inmunoensayo de tipo sándwich. Preferiblemente, se mide el fragmento precursor de la ET-1 C-terminal (CT-proET-1), que estima indirectamente la actividad del sistema de endotelina. En una forma de realización preferida, se utilizan 2 anticuerpos en este ensayo, preferiblemente anticuerpos policlonales. En una forma de realización

preferida, los anticuerpos se dirigen a los aminoácidos 168-212 de pre-proET-1. Este procedimiento puede llevarse cabo con un inmunoensayo de tipo sándwich disponible comercialmente (CT-proET-1 LIA, B.R.A.H.M.S AG, Hennigsdorf, Berlín). El ensayo (intervalo de referencia normal: mediana: 44,3, intervalo: 10,5-77,4 pmol/l) presenta un límite de detección analítica de 0,4 pmol/l y el CV dentro del ensayo fue < del 10% para valores > 10 pmol/l (Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma. Clin Chem 2006; 52:11,44-51.).

En el contexto de la presente invención, una "cardiopatía" es un estado patológico que está relacionado con el sistema cardiaco, por ejemplo el corazón y/o los vasos sanguíneos, de un paciente. Tales cardiopatías pueden ser por ejemplo defectos cardiacos congénitos, coronariopatía, insuficiencia cardiaca y/o valvulopatía cardíaca.

En la presente invención, el término "prevención primaria" significa evitar el desarrollo de una enfermedad en un individuo por lo demás sano o al menos asintomático.

En el contexto de la presente invención, una taquiarritmia maligna se define preferiblemente como taquiarritmia ventricular rápida (VT o VF) con una duración de ciclo ≤ 250 ms (frecuencia cardiaca ≥ 240 lpm).

En la presente invención, el término "estratificación de riesgo" indica una asignación de una probabilidad de que un individuo experimente determinados acontecimientos adversos. A partir de la presente memoria, el individuo puede considerarse preferiblemente en una determinada categoría de riesgo, en donde las categorías comprenden por ejemplo alto riesgo frente a bajo riesgo o categorías de riesgo basadas en valores numéricos, tales como categoría de riesgo 1, 2, 3, etc.

En el contexto de la presente invención, términos tales como "valor predictivo" se refieren a la significación estadística de un resultado determinado que se determinó de una medición. Por tanto, un aumento en el valor predictivo o el poder de predicción en el contexto de la presente invención significa que aumenta la probabilidad de un diagnóstico, pronóstico, estratificación o similar correcto basándose en un determinado valor que se determinó de la medición del nivel de un determinado marcador en una muestra.

Tal como se menciona en la presente memoria, un "ensayo" o un "ensayo diagnóstico" pueden ser de cualquier tipo aplicado en el campo de la diagnosis, comprendiendo de manera no limitativa procedimientos de ensayo basados en reacciones enzimáticas, luminiscencia, fluorescencia o productos radioquímicos. Los procedimientos de detección preferidos comprenden pruebas de tira, radioinmunoanálisis, inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, ensayos de inmunotransferencia, ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA), matrices de perlas basadas en Lumine, y ensayos de micromatrices de proteínas. Los tipos de ensayo pueden estar adicionalmente basados en placas de microtitulación, basados en chips, basados en perlas, en los que los marcadores pueden estar unidos a la superficie o en disolución. Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos de tipo sándwich, ensayos competitivos y no competitivos. En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo es en la forma de un ensayo tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en el que la molécula que va a detectarse y/o cuantificarse se une a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede estar unido a una fase sólida, por ejemplo una perla, una superficie de un pocillo u otro envase, 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 resto reactivo o catalíticamente activo. Luego se mide la cantidad de anticuerpo marcado en el sitio mediante un procedimiento apropiado. La composición y procedimientos generales implicados con los "ensayos de tipo sándwich" están bien establecidos y son bien conocidos por el experto 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. Febrero de 2006; 10 (1): 4-10. PMID: 16376134), que se incorpora a la presente memoria como referencia.

En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferiblemente anticuerpos que están ambos presentes como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en el que un primer componente de marcaje se une a la primera molécula de captura, en el que dicho primer componente de marcaje forma parte de un sistema de marcaje basado en la extinción o en la amplificación de la fluorescencia o de la quimioluminiscencia, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje se une a la segunda molécula de captura, de manera que con la unión de ambas moléculas de captura a dicha proteasa o dicho inhibidor endógeno o dicho complejo de la proteasa con un inhibidor endógeno, se genera una señal medible que permite la detección de los complejos de tipo sándwich formados en la disolución 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 colorante de quimioluminiscencia, en particular un colorante del tipo cianina.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia comprenden la utilización de colorantes, que pueden seleccionarse por ejemplo del 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-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G (RG6), rodamina, verde de rodamina, rojo de rodamina, rodamina 110, colorantes BODIPY, tales como BODIPY TMR, verde de Oregón, cumarinas tales como umbeliferona, benzimidaz, tales como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como rojo de Texas, amarillo de Yakima, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina y similares.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en quimioluminiscencia comprenden la utilización de colorantes, basándose en los principios físicos que se describen 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, pág. 518-562, que incluye menciones en las páginas 551-562.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “terapia híbrida” se refiere a una terapia de combinación, en la que se combinan la terapia farmacéutica y la terapia con dispositivo en un paciente.

Debe apreciarse que los “pacientes” en el contexto de la invención, son todas las personas o animales independientemente de que muestren o no cambios patológicos, a menos que se establezca otra cosa. En el significado de la invención, cualquier muestra recogida de células, tejidos, órganos, organismos o similares puede ser una muestra de un paciente que va a diagnosticarse. En una forma de realización preferida, el paciente según la invención es un ser humano.

Tal como se menciona en la presente memoria en el contexto de proteínas o péptidos, el término “fragmento” se refiere a proteínas o péptidos más pequeños que pueden derivarse de proteínas o péptidos más grandes, que por lo tanto comprenden una secuencia parcial de la proteína o el péptido más grande. Dichos fragmentos pueden derivarse de las proteínas o péptidos más grandes mediante saponificación de uno o más de sus enlaces peptídicos.

En el contexto de la presente invención, el término “nivel” en expresiones tales como “nivel de una proteasa”, “nivel de analito” y expresiones similares, se refiere a la cantidad de la entidad molecular mencionada en el contexto respectivo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, términos tales como “marcador” “marcador(es), parámetro(s) o factor(es) pronóstico” o “biomarcador” o “marcador biológico” se utilizan de manera intercambiable y se refieren a parámetros biológicos medibles y cuantificables (por ejemplo, concentración de enzima específica, concentración de hormona específica, distribución fenotípica génica específica en una población, presencia de sustancias biológicas) que sirven como índices para valoraciones relacionadas con la salud y la fisiología, tales como riesgo de enfermedad, trastornos psiquiátricos, exposición al medioambiente y sus efectos, diagnóstico de enfermedad, procesos metabólicos, abuso de sustancias, embarazo, desarrollo de líneas celulares, estudios epidemiológicos, etc. Además, 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 de una intervención terapéutica. Un biomarcador puede medirse en una biomuestra (como un análisis de sangre, de orina o de tejido), puede ser un registro obtenido de una persona (tensión arterial, ECG o Holter), o puede ser una prueba de obtención de imágenes (ecocardiograma 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 el tipo de exposición a un factor medioambiental, susceptibilidad genética, respuestas genéticas a exposiciones, biomarcadores de enfermedad subclínica o clínica o indicadores de respuesta a terapia. Por tanto, una manera simplista de considerar los biomarcadores es como indicadores del rasgo de enfermedad (factor de riesgo o biomarcador de riesgo), del estado de la enfermedad (preclínica o clínica) o de la velocidad de la enfermedad (progresión). Por consiguiente, los biomarcadores pueden clasificarse como biomarcadores antecedentes (que identifican el riesgo de desarrollar una dolencia), biomarcadores de detección (que detectan la enfermedad subclínica), biomarcadores de diagnóstico (que reconocen la enfermedad manifiesta), biomarcadores de estadiaje (que categorizan la gravedad de la enfermedad) o biomarcadores de pronóstico (que predicen el curso futuro de la enfermedad, incluyendo recurrencia y respuesta a la terapia y eficacia de monitorización de la terapia). Los biomarcadores también pueden servir como criterios de valoración sustitutos. Un criterio de valoración sustituto es uno que puede utilizarse como desenlace en ensayos clínicos para evaluar la seguridad y la eficacia de las terapias en lugar de la medición del desenlace real de interés. El principio subyacente es que las alteraciones en el criterio de valoración sustituto siguen fielmente los cambios en el desenlace de interés. Los criterios de valoración sustitutos presentan la ventaja de que pueden reunirse en un periodo de tiempo más corto y con menos gasto que criterios de valoración tales como morbilidad, que requieren ensayos clínicos grandes para la evaluación. Los valores adicionales de los criterios de valoración sustitutos incluyen el hecho que están más próximos a la exposición/intervención de interés y pueden ser más fáciles de relacionar de un modo causal que acontecimientos clínicos más distantes. Una desventaja importante de los criterios de valoración sustitutos es que si el desenlace clínico de interés está influido por muchos factores (además del criterio de valoración sustituto), la confusión residual puede reducir la validez del criterio de valoración sustituto. Se ha sugerido que la validez de un criterio de valoración sustituto es mayor si puede explicar al menos el 50% del efecto de una exposición o intervención en el desenlace de interés. Por ejemplo, un biomarcador puede ser una proteína, un péptido o una molécula de ácido nucleico.

Descripción de las figuras

Figura 1

Se han estratificado pacientes con insuficiencia cardiaca en dos grupos según los niveles de CT-proET-1 y de BNP y se ha realizado el análisis de Kaplan Meier. A) Los pacientes con niveles plasmáticos de CT-proET-1 > 73 pmol/l (mediana) presentaron un desenlace significativamente peor que los pacientes con valores de CT-proET-1 por debajo de este punto de corte (prueba de rangos logarítmicos) en cuanto a acontecimientos taquiarritmicos malignos como criterio de valoración. B) Los pacientes con niveles plasmáticos de BNP $\geq$ 183 pg/ml (mediana) no presentaron una tasa superior de acontecimientos taquiarritmicos ventriculares malignos que los pacientes por debajo de este punto de corte (prueba de rangos logarítmicos). Los análisis de la curva ROC respectiva se muestra en las partes insertadas.

Figura 2

Análisis de regresión lineal de la fracción de eyección LV y los niveles de CT-proET-1 en 123 pacientes con insuficiencia cardiaca con cardioversores-desfibriladores implantables.

Ejemplos

Procedimientos

Pacientes, diseño del estudio

La población del estudio consistió en 123 pacientes con desfibrilador con insuficiencia cardiaca de etiología isquémica o no isquémica que se reclutaron de manera prospectiva en la clínica para pacientes ambulatorios con desfibrilador de la University of Marburg entre junio de 2002 y septiembre de 2003 (Christ *et al*, Eur J Heart Fail 2007; 9: 272-9). El estudio se llevó a cabo según los principios de la Buena Práctica Clínica y la Declaración de Helsinki, y los pacientes dieron su consentimiento informado antes de su inclusión en el estudio (Christ *et al*, Eur J Heart Fail 2007; 9: 272-9).

Electrocardiografía y ecocardiografía

Se registraron electrocardiogramas (ECG) de 12 derivaciones normalizados a una velocidad de papel de 50 mm/segundo de cada paciente y se interpretaron por un único investigador experimentado ciego para el desenlace. Los pacientes se clasificaron presentando un ritmo marcado por marcapasos si más del 50% de los latidos se sometieron a electroestimulación cardiaca durante el registro del ECG. Se obtuvieron imágenes ecocardiográficas bidimensionales del corazón al final del periodo espiratorio utilizando una máquina Vingmed Vivid Five (GE Medical Systems, Solingen, Alemania) y se midieron los parámetros utilizando procedimientos convencionales (Christ *et al*, Eur J Heart Fail 2007; 9: 272-9).

Procedimientos de laboratorio

Tras el ayuno durante la noche, se extrajeron muestras de sangre venosa entre las 8:30 h y las 10:30 h a través de una cánula de calibre 21 insertada en una vena antecubital utilizando tubos Monovettes que contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sarstedt, Nuembrecht, Alemania). Los pacientes se tendieron, durante al menos 15 min, en una posición corporal de supino. Se transfirieron inmediatamente las muestras de sangre con EDTA a hielo refrigerado, se separó el plasma utilizando una centrífuga y se almacenó el plasma a -80°C hasta el análisis.

Se determinaron los niveles de BNP utilizando un inmunoensayo de quimioluminiscencia (Bayer AG, Fernwald, Alemania). El límite de detección analítica del ensayo fue de 2 pg/ml. Los coeficientes de variación (CV) dentro del ensayo fueron del 1,8-4,3% a 29,4-1763 pg/ml y los CV dentro del ensayo fueron del 2,3-4,7% a BNP 29,4-1736 pg/ml (Christ *et al*, Eur J Heart Fail 2007; 9: 272-9). La endotelina-1 es difícil de medir debido a la inestabilidad y la unión del receptor. Se midió el fragmento precursor de la ET-1 C-terminal (CT-proET-1), que estima indirectamente la actividad del sistema de endotelina, con un inmunoensayo de tipo sándwich nuevo (CT-proET-1 LIA, B.R.A.H.M.S AG, Hennigsdorf, Berlín, Alemania) (Papassotiriou *et al*, Clin Chem 2006; 52: 1144-51)) utilizando 2 anticuerpos policlonales dirigidos a los aminoácidos 168-212 de pre-proET-1. El ensayo (intervalo de referencia normal: mediana: 44,3, intervalo: 10,5-77,4 pmol/l) presenta un límite de detección analítica de 0,4 pmol/l y el CV dentro del ensayo fue < 10% para valores > 10 pmol/l (Papassotiriou *et al*, Clin Chem 2006; 52: 1144-51).

Implantación de desfibrilador y programación del dispositivo

Exclusivamente, se utilizaron ICD con sistemas de derivación sin toracotomía y formas de onda de choque bifásico con energía de choque máxima de 27 a 34 J. Todos los sistemas de ICD utilizados proporcionaron electrogramas intracardiacos almacenados además de intervalos de latido a latido de episodios que desencadenan la acción del

dispositivo (Guidant, St. Paul, Minnesota; Medtronic, Minneapolis, Minnesota). El intervalo de tiempo para la detección de VF osciló entre uno y tres segundos en dispositivos de Guidant; se programaron los dispositivos de Medtronic para que requiriesen de 18 de 24 latidos por debajo de la duración del ciclo de detección programado (intervalo 240 – 280 ms) con el fin de iniciar la carga del condensador en la zona de VF. Se detectaron taquiarritmias ventriculares más lentas y se trataron en una o dos zonas de VT separadas con electroestimulación cardíaca antitaquicardia en ráfagas seguido por hasta 4 choques de cardioversión (Grimm *et al*, J Am Coll Cardiol 2002; 39: 780-7).

Seguimiento

Todos los datos de características clínicas de nivel inicial, incluyendo los resultados de la evaluación cardíaca y los datos de implantación se habían recogido de manera prospectiva en la base de datos de desfibrilador de Marburg (Christ *et al*, Eur J Heart Fail 2007; 9: 272-9, Grimm *et al*, J Am Coll Cardiol 2002; 39: 780-7). El seguimiento en este estudio empezó en el momento de la medición del biomarcador, fue hasta de 60 meses y pudo completarse en todos los pacientes incluidos. Se realizó un seguimiento de los pacientes principalmente en la clínica para pacientes ambulatorios con desfibrilador en intervalos de tres a seis meses o tan pronto como fue posible tras los choques de ICD espontáneos para la comprobación del dispositivo y la recuperación de los electrocardiogramas almacenados. Dos electrofisiólogos experimentados clasificaron todos los electrocardiogramas almacenados de episodios que desencadenan la terapia con ICD o inapropiados utilizando los criterios descritos previamente (Christ *et al*, Eur J Heart Fail 2007; 9: 272-9; Marchlinski *et al*, Pacing Clin Electrophysiol 1993; 16: 527-34).

Análisis estadístico

Las variables continuas se expresan como media±desviación estándar (DE) o se expresan como mediana (intervalo) y estimación de punto (intervalos de confianza del 95%) tal como se indica. El objetivo primario fue examinar si los niveles de biomarcador que incluían CT-proET-1 o BNP contribuyen a predecir el tiempo hasta el primer acontecimiento taquiarrítmico maligno. Se definieron las taquiarritmias malignas como taquiarritmias ventriculares rápidas (VT o VF) con duraciones de ciclo ≤ 250 ms (frecuencia cardíaca ≥ 240 lpm) lo que conduce probablemente a muerte si no se ponen fin mediante el dispositivo (Bocker *et al*, J Am Coll Cardiol 1993; 21: 1638-44.). Se utilizaron modelos de riesgos proporcionales de Cox de una sola variable y de múltiples variables para evaluar las asociaciones entre las medidas del desenlace.

Para construir un primer modelo de regresión de Cox, se utilizó por esa razón un procedimiento gradual con un nivel de entrada de 0,05. Se fijó el valor p para permanecer en el modelo a 0,05. Se estimaron las probabilidades de acontecimiento con el procedimiento de Kaplan-Meier y se utilizó la prueba de rangos logarítmicos para las comparaciones de curvas. Se utilizaron análisis estadísticos adicionales para exploración, descripción e interpretación. Se realizaron comparaciones entre grupos mediante la prueba de la t de Student, la prueba de la U o la prueba de la chi cuadrado según fueron aplicables. Todos los valores p notificados son bilaterales, se consideró significativo un valor p $< 0,05$.

Se construyeron curvas de característica operativa del receptor (ROC) para valorar la sensibilidad y la especificidad de biomarcadores en todas las concentraciones para detectar los criterios de valoración respectivos. Se realizaron todos los cálculos estadísticos utilizando el paquete de software estadístico SPSS (versión 14,0; SPSS Inc., Chicago, IL).

Resultados

Las características demográficas de la cohorte de estudio global se muestran en la tabla 1. Durante un seguimiento máximo de hasta 60 meses (mediana de 51 meses) tras la inclusión, 27 pacientes presentaron primeros acontecimientos taquiarrítmicos malignos, los niveles de CT-proET-1 fueron significativamente superiores en los pacientes con primeros acontecimientos taquiarrítmicos malignos (mediana: 90 pmol/l) en comparación con los pacientes sin un primer acontecimiento taquiarrítmico maligno (mediana: 67 pmol/l; p = 0,003). Por el contrario, no se encontraron diferencias entre los grupos para BNP (p = 0,55) (tabla 1).

Factores pronóstico de primeros acontecimientos taquiarrítmicos malignos

Se produjeron taquiarritmias malignas a una mediana de 18 meses tras la inclusión en el estudio (IQR: 8-41 meses). Los niveles de CT-pro-ET-1, la clase de la NYHA, la presión venosa yugular aumentada y el tratamiento con betabloqueantes contribuyeron significativamente a los modelos de regresión de Cox de una sola variable para predecir el criterio de valoración primario. Ni el BNP, ni la tensión arterial sistólica, ni el diámetro diastólico final del LV, ni la LV-EF ni la presencia de un bloqueo de rama izquierda (LBBB) predijeron el riesgo de padecer taquiarritmias malignas que requieran terapia con ICD (tabla 2). Se han estratificado pacientes con ICD en dos grupos según los niveles de CT-proET-1 o de BNP y se ha realizado el análisis de Kaplan-Meier. El riesgo de padecer taquiarritmia fue significativamente superior en pacientes con niveles plasmáticos de CT-proET-1 > 73 pmol/l (mediana) que en pacientes con valores de CT-proET-1 por debajo de este punto de corte (prueba de rangos logarítmicos, p $< 0,001$, figura 1A). No se encontraron diferencias en pacientes con niveles plasmáticos de BNP ≤ 83

pg/ml (mediana) o > 183 pg/ml utilizando taquiarritmia maligna como criterio de valoración (prueba de rangos logarítmicos, $p = 0,10$, figura 1B). No se encontraron asociaciones significativas de la fracción de eyección LV y los niveles de CT-proET-1 (figura 2).

El área bajo la curva ROC que utilizó los niveles de CT-proET-1 para predecir la aparición de una primera taquiarritmia maligna fue de 0,69 (figura 1A, parte insertada). La concentración óptima de CT-proET-1 para el cálculo de la precisión de predicción positiva y negativa tal como se obtiene a partir de la curva ROC fue de 75,5 pmol/l (80,8% de sensibilidad, 64,4% de especificidad, 92,1% de valor predictivo negativo, 39,6% de valor predictivo positivo y una razón de verosimilitud positiva de 2,27). Los niveles plasmáticos de CT-proET-1 contribuyeron de manera significativa a los modelos de regresión de Cox de múltiples variables que predicen el riesgo de padecer la primera taquiarritmia maligna. Se ha calculado la razón del riesgo por incremento en pmol/l de los niveles de CT-proET-1 (tabla 2). La utilización del logaritmo de CT-proET-1 en análisis estadístico no cambió los resultados obtenidos. El análisis de regresión de Cox de múltiples variables reveló que el tratamiento con betabloqueantes indica un pronóstico favorable (tabla 2).

Tabla 1

Características clínicas de pacientes con implantación del cardioversor/desfibrilador implantable a la entrada del estudio.

Variable	Todos los pacientes	Taquiarritmia maligna		P =
		Acontecimiento	Libre de acontecimiento	
Número	123	27	96	
Edad, años	63±12	64±13	63±12	0,66
Sexo masculino (%)	104 (85)	21 (78)	83 (87)	0,36
Peso, kg	82±14	82±13	82±14	0,83
Índice de masa corporal, kg/m ²	26,8±4,2	27,6±4,0	26,6±4,2	0,29
Tensión arterial sistólica, mm Hg	132±21	130±18	132±22	0,53
Disnea Clase I/II de la NYHA (%)	75 (61)	13 (48)	62 (65)	0,08
clase III de la NYHA (%)	45 (37)	12 (44)	33 (34)	
clase IV de la NYHA (%)	3 (2)	2 (7)	1 (1)	
Causa de la IC no isquémica (%)	63 (51)	15 (56)	48 (53)	0,83
Química clínica				
Hemoglobina, g/l	141±16	144±17	140±16	0,21
Sodio, mmol/l	139±3	139±3	140±4	0,29
Potasio, mmol/l	4,0±0,4	4,0±0,5	4,0±0,4	0,61
Magnesio, mmol/l	0,8±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,54
Aclaramiento de creatinina, ml/min	90±37	89±37	90±38	0,89
Pro-endotelina 1 CT, pmol/l (mediana)	73	90	67	0,003
IQR	59-95	76-99	57-92	
Péptido natriurético tipo B, pg/ml (mediana)	183	221	177	0,55
IQR	77-395	75-482	78-357	
Electrocardiograma de 12 derivaciones (%)				
Ritmo sinusal	69 (55)	15 (56)	54 (56)	1,0
Fibrilación auricular	31 (25)	7 (26)	24 (25)	1,0
Estimulación de marcapasos	37 (30)	6 (22)	31 (32)	0,35
Bloqueo de rama izquierda	42(34)	9 (33)	33(34)	1,0
Estudio ecocardiográfico				
LV EDD, mm	66±10	67±9	65±11	0,45
Fracción de eyección LV, %	29±10	28±9	29±10	0,53
Medicación				
Diuréticos (%)	103 (83,7)	23 (85,2)	80 (83,3)	1,00
ACE-I, ARB (%)	100 (81,3)	19 (70,4)	81 (84,4)	0,16
Betabloqueante (%)	92 (74,8)	15 (55,6)	77 (80,2)	0,01
Digitálicos (%)	76 (61,8)	18 (66,7)	58 (60,4)	0,66
Espironolactona (%)	43 (35,0)	7 (25,9)	36 (37,5)	0,36
Amiodarona (%)	29 (23,6)	5 (18,5)	24 (25,0)	0,61
Estatinas (%)	46 (37,4)	7 (25,9)	39 (40,6)	0,18
Antiarrítmicos de clase I (%)	4 (3,3)	1 (3,7)	3 (3,1)	1,00

NYHA, New York Heart Association (Asociación cardiaca de Nueva York); LV, ventricular izquierda; CT, C-terminal, EDD, diámetro diastólico final, ACE-I, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, ARB, bloqueante del receptor de angiotensina. Se ha realizado el análisis estadístico tal como se explicó resumidamente en la sección de estadística. Se presentan los valores como media±DE o tal como se indica.

Tabla 2: Acontecimientos taquiarritmicos en pacientes con ICD durante el seguimiento

	Parámetro	Primer acontecimiento taquiarritmico maligno		
		Razón de riesgo Estimación de punto (IC del 95%)	P de una sola variable	P de múltiples variables
	Edad, años	1,01 (0,98-1,05)	0,51	-
	Sexo masculino	0,58 (0,23-1,43)	0,24	-
	Índice de masa corporal kg/m ²	1,05 (0,95-1,16)	0,32	-
Historia médica	Coronariopatía/ infarto de miocardio anterior	0,83 (0,38-1,78)	0,63	-
	Reanimación satisfactoria antes de la implantación de ICD	0,52 (0,20-1,36)	0,18	-
	Síncope antes de la implantación de ICD	1,54 (0,72-3,29)	0,27	-
	Presencia de arritmias malignas antes de la inclusión	1,14 (0,51-2,55)	0,74	-
	ICD para la prevención primaria de arritmias malignas	1,13 (0,52-2,43)	0,76	-
	Tabaquismo	0,63 (0,22-1,83)	0,40	-
	Hipertensión	0,57 (0,26-1,28)	0,17	-
	Diabetes mellitus	1,45 (0,68-3,09)	0,33	-
	Presión venosa yugular aumentada	3,92 (1,34-11,48)	0,01	0,38
	Tensión arterial sistólica, mm Hg	0,99 (0,97-1,01)	0,50	-
	Asociación cardiaca de Nueva York	2,16 (1,13-4,14)	0,02	0,08
Medicación	En tratamiento con ACI o ARB	0,48 (0,21-1,09)	0,08	-
	En tratamiento con diuréticos con acción sobre el asa de Henle	1,48 (0,69-3,15)	0,31	-
	En tratamiento con espironolactona	0,59 (0,25-1,40)	0,23	-
	En tratamiento con betabloqueantes	0,29 (0,14-0,63)	0,002	0,01
	En tratamiento con amiodarona	0,81 (0,31-2,15)	0,68	-
	En tratamiento con estatinas	0,53 (0,22-1,25)	0,14	-
ECG de 12 derivaciones	Presencia de fibrilación auricular	1,06 (0,45-2,50)	0,90	-
	Bloqueo de rama izquierda	0,93 (0,42-2,06)	0,85	-
Ecocardiografía	Diámetro diastólico final LV mm	1,02 (0,98-1,05)	0,32	-
	Fracción de eyección LV, %	0,99 (0,95-1,02)	0,42	-
Química clínica	Hemoglobina g/l	1,02 (0,99-1,04)	0,27	-
	Potasio, mmol/l	0,71 (0,30-1,68)	0,43	-
	Magnesio, mmol/l	0,24 (0,002-27,08)	0,55	-
	Aclaramiento de creatinina (ml/min)	0,99 (0,98-1,01)	0,59	-
	Pro-endotelina-1 C-terminal, pmol/l	1,03 (1,01-1,04)	< 0,001	0,02
	Péptido natriurético tipo, B pg/ml	1,001 (1,000-1,002)	0,19	-
Razones de riesgo para el criterio de valoración primario (primer acontecimiento taquiarritmico maligno) durante 60 meses de seguimiento (n = 123; LV, ventricular izquierda; ICD, cardioversor-desfibrilador implantable)				

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para la estratificación de riesgo para la aparición de taquiarritmias malignas para un paciente que presenta una cardiopatía que comprende:
5
 - determinar el nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos en una muestra obtenida de un paciente.
2. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1, en el que dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos se correlaciona con el riesgo de taquiarritmias malignas que requieren la implantación de un cardioversor-desfibrilador implantable (ICD) y/o una terapia híbrida antiarrítmica.
10
3. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 2, para la prevención primaria de la muerte súbita arrítmica.
4. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, en el que dicha etapa de correlación comprende comparar dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos con un nivel umbral, encontrándose así, cuando dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos o fragmentos de la misma supera dicho nivel umbral, dicho paciente en alto riesgo de taquiarritmia.
15
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicho nivel umbral está en aproximadamente 73 +/- 20% pmol/l.
20
6. Procedimiento según las reivindicaciones 1-5, en el que la cardiopatía es la insuficiencia cardiaca de etiología o bien isquémica o bien no isquémica.
25
7. Procedimiento según las reivindicaciones 1-6, en el que los pacientes presentan una fracción de eyección LV $\leq$ 45%.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, 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.
30
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además combinar dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos con el nivel/estado de uno o más marcadores, parámetros o factores de pronóstico adicionales, aumentando así la combinación de dicho nivel de CT-proET-1 o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos con dicho nivel/estado de marcador(es), parámetro(s) o factor(es) de pronóstico adicional(es) el valor predictivo para el riesgo de dicho procedimiento.
35
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el marcador, parámetro o factor de pronóstico adicional se selecciona de entre un grupo que comprende todos los parámetros enumerados en la tabla 2, que muestran un $p < 0,05$ en el análisis de una sola variable o de múltiples variables, siendo así el BNP únicamente un ejemplo para proBNP o fragmentos del mismo de por lo menos 12 aminoácidos que incluyen BNP o NT-proBNP.
40
11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho nivel de HCT-proET-1 o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos se mide con un inmunoensayo de tipo sándwich.

Fig. 1

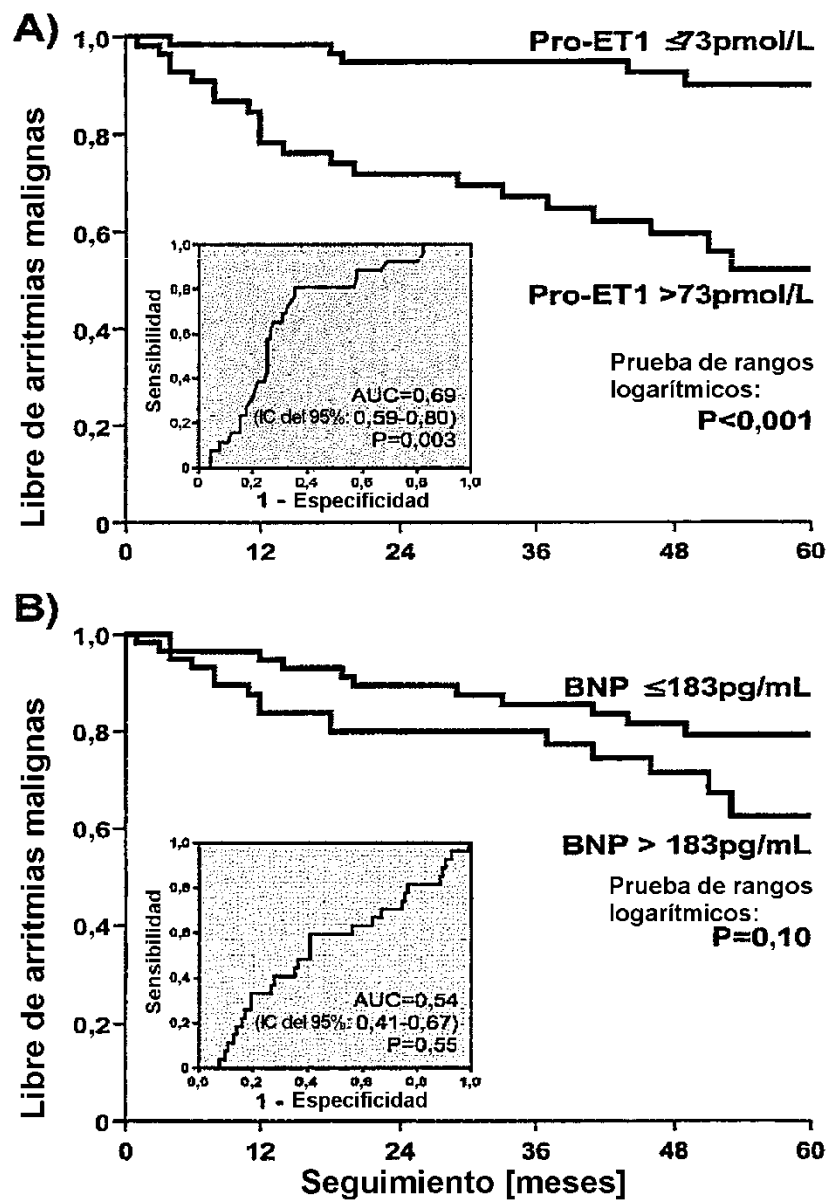


Fig. 1 ↑

Fig. 2

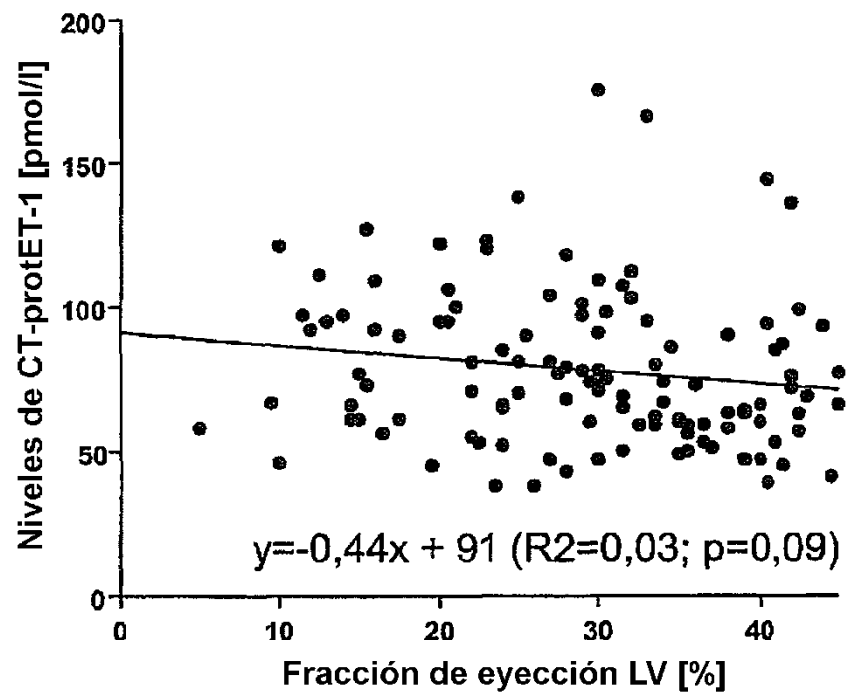


Fig. 2 ↑