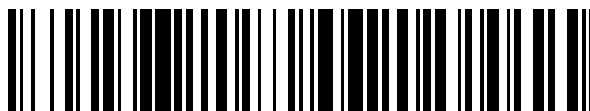


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 812**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/305** (2006.01)

**A61K 31/198** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2011 E 11702472 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2533653**

54 Título: **Homoarginina como un marcador biológico para el riesgo de mortalidad**

30 Prioridad:

**12.02.2010 EP 10153545**

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

**18.05.2015**

73 Titular/es:

**SYNLAB MEDIZINISCHES  
VERSORGUNGSZENTRUM HEIDELBERG GMBH  
(100.0%)  
Wasserturmstrasse 71  
69214 Eppelheim, DE**

72 Inventor/es:

**MAERZ, WINFRIED;  
MEINITZER, ANDREAS;  
DRECHSLER, CHRISTIANE;  
PILZ, STEFAN;  
KRANE, VERA y  
WANNER, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 535 812 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

Homoarginina como un marcador biológico para el riesgo de mortalidad

5 La presente invención se relaciona con el campo del diagnóstico de laboratorio. Específicamente, se divulgan medios y métodos para la determinación del riesgo de mortalidad en un paciente basados en homoarginina, y para reducir el riesgo de mortalidad por administración de homoarginina. Además, la presente especificación divulga el uso de homoarginina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que tiene un riesgo incrementado de mortalidad, causado por ataque cerebral o una causa cardíaca. Además, la presente solicitud describe una composición farmacéutica que incluye homoarginina y una composición para suplementos alimenticios, que incluye homoarginina.

10 Es un propósito de la medicina moderna el suministro personalizado de regímenes individualizados de tratamiento. Aquellos son los regímenes de tratamiento que toman en cuenta las necesidades o riesgos individuales de un paciente. Los regímenes individualizados de tratamiento ofrecen beneficios para el paciente individual así como para la sociedad como un todo. Para el paciente individual, el tratamiento personalizado evita el exceso de terapia, en tanto asegura que se toman las medidas necesarias. Como toda terapia puede causar efectos laterales perjudiciales indeseados, evitando las terapias innecesarias se resguarda al paciente de efectos laterales potencialmente perjudiciales. Por otro lado, la identificación de pacientes con necesidades especiales asegura que estos individuos reciben el tratamiento apropiado. Para el sistema de salud como un todo, evitar las terapias innecesarias permite un uso más económico de los recursos.

20 Los regímenes individualizados de tratamiento requieren herramientas apropiadas de diagnóstico, con objeto de separar aquellos pacientes que se benefician de ciertas medidas terapéuticas, de los pacientes que no lo hacen. Por ello, el desarrollo de regímenes individualizados de tratamiento depende críticamente del desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y procedimientos. Dado que la prevención de enfermedades futuras es frecuentemente más efectiva que la terapia de enfermedades existentes, son especialmente deseables herramientas y métodos de diagnóstico para la estratificación de riesgos respecto a las enfermedades futuras.

25 Las enfermedades cardiovasculares están entre las mayores causas de muerte en los países industrializados. La mortalidad por enfermedades cardiovasculares descendió sustancialmente en los países occidentalizados durante las pasadas cinco décadas (Ford, ES et al., 2007, N. Engl. J. Med. 356: 2388-2398). Sin embargo, independientemente de las medidas altamente efectivas para controlar los factores convencionales de riesgo, la incidencia de eventos cardiovasculares permanece alta. Esto resalta la necesidad de identificar factores de riesgo independientes no convencionales para eventos cardiovasculares agudos tales como infarto del miocardio, Angina pectoris inestable, y ataque cerebral.

30 La homoarginina es un aminoácido catiónico que se deriva de la lisina. La homoarginina incrementa la disponibilidad de NO (Bauersachs, J y Widder, JD, 2008; Pharmacol. Rep. 60: 1191-126; Chen, PY y Sanders, PW, 1993, Hypertension 22: 812-818) por dos vías; primero, la homoarginina en sí misma sirve como un precursor de NO. Segundo, incrementa la concentración intracelular de L-arginina, el principal sustrato para sintetasa NO, inhibiendo la enzima arginasa, la cual compite con la sintetasa NO por el sustrato clave L-arginina (Hrabak, A et al., 1994, Biochem. Biophys. Res. Comm. 198: 206-212; Knowles, RG et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5159-5162; Valtonen, P et al., 2008, Circ. J. 72: 1879-1884; Yang, Z y Ming, XF, 2006, Hypertens. Rep. 8: 54-59). La importancia de la homoarginina para el metabolismo de NO no ha sido completamente entendida, pero la evidencia reciente sugiere que la homoarginina está relacionada positivamente con la función endotelial (Valtonen et al., loc. cit.) La homoarginina puede ejercer además acciones que son relevantes para la salud cardiovascular, incluyendo la inhibición de agregación de plaquetas y la estimulación de la secreción de insulina.

35 Se ha descrito que los niveles de homoarginina están asociados independientemente con mortalidad cardiovascular y mortalidad por todas las causas, en pacientes referidos para angiografía coronaria y en pacientes sometidos a hemodiálisis. Sin embargo, se requieren estudios futuros para aclarar los mecanismos patológicos subyacentes (Marz, W et al., Circulation 2010; 122: 967-975).

40 Se han descrito valores de referencia para concentración en plasma de dimetilarginina (ADMA) asimétrica y otros metabolitos de arginina, en hombres después de validación de un método cromatográfico, con la conclusión de que la aplicación de un método evaluado a un grupo bien definido de sujetos saludables, debería suministrar una base para la comparación de concentraciones de ADMA en diferentes poblaciones de pacientes para estudios futuros (Meinitzer, A et al., Clinica Chimica Acta 384 (2007) 141-148).

45 Se ha descrito el análisis por HPLC de dimetilarginina asimétrica, dimetilarginina simétrica, homoarginina y arginina en pequeños volúmenes de plasma, usando una columna Gemini - NX a pH elevado (Jones, C et al., Journal of Chromatography B, 878 (2010), 8-12).

Además, se ha descrito que la dimetilarginina (ADMA) asimétrica tiene valor pronóstico más allá de los factores tradicionales de riesgo y nuevos marcadores biológicos, y valor para potencialmente guiar estrategias terapéuticas (Schnabel, R et al., Circulation Research 2005; 97: e53-e59), mientras se ha implicado la concentración en plasma de dimetilarginina (ADMA) asimétrica, para predecir morbilidad y mortalidad cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 1 con nefropatía diabética (Lajer, M et al., Diabetes Care, Vol. 31 (4), 2008, 747-752).

En consecuencia, el problema subyacente de la presente invención podría ser visto como la identificación de marcadores adicionales que permitan una estratificación de riesgo de pacientes respecto a eventos cardiovasculares agudos. El problema es resuelto por las realizaciones de la presente invención descritas en las reivindicaciones y en la especificación abajo.

10 La presente invención se relaciona con un método para la determinación del riesgo de mortalidad en un paciente, que incluye las etapas de

a) determinación de la cantidad de homoarginina en una muestra del paciente; y

b) comparación de la cantidad determinada con una cantidad de referencia, con lo cual se predice el riesgo de mortalidad en el paciente.

15 El método de la presente invención es un método in vitro. Además, puede incluir etapas adicionales a aquellas mencionadas explícitamente arriba. Por ejemplo, las etapas adicionales pueden relacionarse con toma de muestra a pre-tratamientos o evaluación de los resultados obtenidos por el método. El método puede ser llevado a cabo manualmente o asistido por automatización. Preferiblemente las etapas (a) y/o (b) pueden ser asistidas total o parcialmente por automatización, por ejemplo con un equipo robotizado y sensorial adecuado para la determinación en la etapa (a) o una comparación realizada por computador en la etapa (b).

25 Como es usado aquí, el término "determinación del riesgo de mortalidad" se refiere a la evaluación de la probabilidad de acuerdo a la cual un sujeto morirá dentro de una cierta ventana de tiempo, es decir la ventana predictiva. De acuerdo con la presente invención, la ventana predictiva está, preferiblemente, dentro de 1 año, 2 años, 4 años, 6 años, 8 años, 10 años o más después de la determinación del riesgo de mortalidad. Del modo más preferido, la ventana predictiva está dentro de 4 años, 5 años o 6 años. Sin embargo, como será entendido por aquellos diestros en el tema, usualmente tal evaluación no es entendida como correcta para el 100% de los sujetos que son investigados. Sin embargo, el término requiere que la predicción pueda ser hecha de una manera correcta y apropiada para una porción estadísticamente significativa de sujetos. Si una porción es estadísticamente significativa puede ser determinado sin más preámbulos por la persona diestra en el tema, usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc.. En Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983 se encuentran detalles. Son intervalos de confianza preferidos por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99 %. Los valores p son preferiblemente 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, o 0.0001. Preferiblemente, la probabilidad prevista aquí permite que la predicción de un riesgo incrementado, normal o reducido sea correcta para por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, o por lo menos 90% de los sujetos de una dada cohorte o población. Preferiblemente, el término se relaciona con la determinación de si existe o no un riesgo incrementado de mortalidad, comparado con el riesgo promedio de mortalidad en una población de sujetos, más que en el suministro de una probabilidad precisa para dicho riesgo.

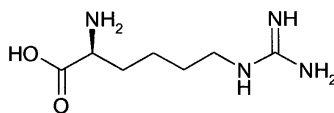
40 Preferiblemente, el término "paciente", se refiere a un mamífero, más preferiblemente a un humano. En un ejemplo preferido, el paciente es saludable respecto a enfermedades que incrementan el riesgo de muerte por causas cardíacas. Preferiblemente, tales enfermedades son hipertensión, falla renal, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares tales como por ejemplo ataque cerebral. En un ejemplo preferido adicional, el paciente sufre de enfermedades cardiovasculares crónicas o agudas, que incluyen síndromes coronarios agudos. Aún en otro ejemplo preferido, el paciente sufre de falla renal que requiere hemodiálisis y diabetes tipo 2.

45 El término "síndrome coronario agudo" se refiere a infarto del miocardio o Angina pectoris inestable. El infarto del miocardio resulta de isquemia prolongada del miocardio debida a suministro insuficiente de sangre. La isquemia prolongada induce necrosis de las áreas afectadas del miocardio y, así, causa daño al miocardio. La Angina pectoris es causada por isquemia transitoria del miocardio. Su principal síntoma es dolor en el pecho. La Angina pectoris inestable (en oposición a la Angina pectoris estable) ocurre en reposo, es severa y de reciente comienzo o incrementa en severidad.

50 El término "muestra" se refiere a una muestra de un fluido corporal, a una muestra de células separadas o una muestra de un tejido o un órgano. Las muestras de fluidos corporales pueden ser obtenidas por técnicas bien conocidas e incluyen, preferiblemente, muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferible muestras de sangre, plasma o suero. Pueden obtenerse muestras de tejidos u órganos a partir de cualquier tejido u órgano por, por ejemplo, biopsia. Pueden obtenerse células separadas a partir de los fluidos corporales o los órganos o tejidos

mediante técnicas de separación tales como centrifugación o clasificación celular. Preferiblemente, las muestras de células, tejidos u órganos son obtenidas de aquellas células, tejidos u órganos que producen el marcador al que se hace referencia aquí.

- 5 El término "homoarginina" se refiere a un compuesto químico que es descrito en la fórmula (I) abajo. Preferiblemente, la homoarginina es L-homoarginina.



(I)

- 10 La determinación de la cantidad de homoarginina se relaciona con la medición de la cantidad o concentración, preferiblemente de modo semicuantitativo o cuantitativo. La medición puede ser hecha directa o indirectamente. La medición directa se relaciona con la medición de la cantidad o concentración de homoarginina, basada en una señal que es obtenida del aminoácido en sí mismo y cuya intensidad se correlaciona directamente con el número de moléculas del aminoácido presentes en la muestra. Tal señal - denominada aquí a veces como señal de intensidad - puede ser obtenida por ejemplo midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del aminoácido. La medición indirecta incluye la medición de una señal obtenida de un componente secundario (es decir un componente que no es el aminoácido en sí mismo) o un sistema de lectura biológica, por ejemplo respuestas celulares medibles, ligandos, etiquetas, o productos de reacción enzimática. Además, para la determinación del marcador se prefiere el uso de inmunoensayos.

La determinación de la cantidad de homoarginina puede ser lograda por todos los medios conocidos de determinación de la cantidad de un aminoácido en una muestra. Preferiblemente, dichos medios incluyen métodos de detección por cromatografía o métodos basados en la formación de productos de reacción coloreados.

- 20 Para la determinación de la cantidad de homoarginina se prefiere especialmente el empleo de métodos de cromatografía. Los más preferidos son cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (GC). Preferiblemente, la cromatografía de gases y cromatografía líquida están acopladas a espectrometría de masas (GC-MS, HPLC-MS) para la identificación del aminoácido. Estos métodos son bien conocidos por la persona diestra en la técnica. Además, para la determinación de la cantidad de homoarginina se prefiere al máximo el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con detección por fluorescencia, con lo cual se extraen homoarginina y un estándar interno de la muestra biológica, mediante extracción de intercambio iónico en fase sólida (SPE). A continuación, se convierte el extracto en un derivado fluorescente empleando los reactivos orto-ftalaldehído y mercaptanos (por ejemplo 2-mercaptoetanol, ácido 3-mercaptopropiónico). Los derivados fluorescentes son separados por HPLC y determinados cuantitativamente usando detector de fluorescencia (Meyer, J et al, 1997, Anal Biochem, 247:11-6). La persona diestra en el tema está bien consciente de diferentes modificaciones a este método (WO 2006/128419).

- 35 Los métodos de separación por cromatografía más preferidos para la determinación de la cantidad de homoarginina incluyen electroforesis capilar acoplada con detección por fluorescencia, cromatografía de gases en tándem con espectrometría de masas, a continuación de la extracción y formación del derivado (como derivado metiléster de tri(N-pentafluoropropionilo)), o tándem de cromatografía líquida y espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) que involucra el uso de dos espectrómetros de masas, en tándem como el detector de un HPLC.

También preferiblemente, la determinación de la cantidad de homoarginina incluye la etapa de medición de una señal de intensidad específica que puede ser obtenida de la homoarginina en la muestra.

- 40 La determinación de la cantidad de homoarginina, incluye preferiblemente las etapas de (a) puesta en contacto de la homoarginina con un ligando específico, (b) remoción opcional de ligando no unido, (c) medición de la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una señal de intensidad. La unión incluye tanto unión covalente como no covalente. Un ligando puede ser cualquier compuesto, por ejemplo un péptido, polipéptido, ácido nucleico, o molécula pequeña unida a la homoarginina. Los ligandos preferidos incluyen anticuerpos, ácido nucleicos, péptidos o polipéptidos tales como receptores o asociados de unión para la homoarginina, y fragmentos de los mismos que incluyen los dominios de unión para homoarginina. Los métodos para la reparación de tales ligandos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados es entonces ofrecida por proveedores comerciales. La persona diestra en la técnica es familiar con métodos para desarrollar derivados de tales ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias dentro de los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Puede probarse entonces la unión de estos derivados de acuerdo con procedimientos de tamización conocidos en la técnica, un ejemplo despliegue de fagos. Como se hace referencia aquí, los anticuerpos incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales,

así como fragmentos de ellos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub> que son capaces de fijarse al antígeno o hapteno. Se incluyen anticuerpos de cadena simple y anticuerpos híbridos transformados en humanos donde las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que exhibe una especificidad de antígeno deseada, se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptante humano. Usualmente las secuencias donantes  
 5 incluirán por lo menos los residuos de aminoácido del donante que se unen al antígeno pero pueden incluir también otros residuos de aminoácido estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Tales híbridos pueden ser preparados por varios métodos bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, el ligando o agente se une de manera específica a la homoarginina. Unión específica significa que el ligando o agente no debería ligarse de manera sustancial a ("reaccionan de manera cruzada" con) otro aminoácido, péptido, polipéptido o sustancia  
 10 presente en la muestra que va a ser analizada. Preferiblemente, la homoarginina unida de manera específica debería ligarse con por lo menos 3 veces más alta, más preferiblemente por lo menos 10 veces más alta e incluso más preferiblemente por lo menos 50 veces más alta afinidad que cualquier otra sustancia relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si ella puede ser distinguida y medida de manera inequívoca, un ejemplo de acuerdo con su tamaño sobre una Mancha Occidental, o por su abundancia relativamente alta en la muestra. La unión del  
 15 ligando puede ser medida por cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente, dicho método es semi-cuantitativo o cuantitativo. A continuación se describen métodos adecuados.

Primero, puede medirse directamente la unión de un ligando, por ejemplo por RMN o resonancia de plasmón de superficie.

Segundo, el ligando puede exhibir en sí mismo propiedades enzimáticas y el complejo "ligando/péptido o polipéptido"  
 20 o el ligando que estaba unido a la homoarginina, respectivamente, pueden entrar en contacto con un sustrato adecuado permitiendo la detección por la generación de una señal de intensidad. Para la medición de productos de reacción enzimática, preferiblemente la cantidad de sustrato es tal que satura. El sustrato puede estar también etiquetado con una etiqueta detectable, antes de la reacción. Preferiblemente, se pone en contacto la muestra con el sustrato por un periodo adecuado de tiempo. Un periodo adecuado de tiempo se refiere al tiempo necesario para  
 25 que se produzca una cantidad detectable, preferiblemente medible, del producto. En lugar de la medición de la cantidad de producto, puede medirse el tiempo necesario para la aparición de una cantidad dada (por ejemplo detectable) de producto.

Tercero, el ligando puede estar acoplado de manera covalente o no covalente a una etiqueta, permitiendo la  
 30 detección y medición del ligando. El etiquetado puede ser hecho por métodos directos o indirectos. El etiquetado directo involucra el acoplamiento de la etiqueta directamente (de manera covalente o no covalente) al ligando. El etiquetado indirecto involucra la unión (de manera covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debería unirse de manera específica al primer ligando. Dicho ligando secundario puede estar acoplado con una etiqueta adecuada y/o ser el objetivo (receptor) del ligando terciario que se une al  
 35 ligando secundario. El uso de ligandos de orden secundario, terciario o incluso superior es usado frecuentemente para incrementar la señal. Los ligandos de orden secundario y superiores adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios, y el bien conocido sistema de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato puede ser también "señalizado" con una o más balizas según se conoce en la técnica. Tales señales pueden ser entonces objetivos para ligandos de orden superior. Las señales adecuadas incluyen biotina, digoxigenina, señal His, glutation-S-transferasa, FLAG, GFP, señal myc, hemaglutinina de virus de influenza A (HA), proteína que se une a la maltosa, y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la señal está preferiblemente  
 40 en el extremo N y/o en el extremo C. Las etiquetas adecuadas son cualquier etiqueta detectable por un método apropiado de detección. Las etiquetas típicas incluyen partículas de oro, esferas de látex, ésteres de acridan, luminol, rutenio, etiquetas enzimáticamente activas, etiquetas radioactivas, etiquetas magnéticas ("por ejemplo esferas magnéticas", incluyendo etiquetas paramagnéticas y superparamagnéticas), y etiquetas fluorescentes. Las  
 45 etiquetas enzimáticamente activas incluyen por ejemplo peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa, y derivados de ellas. Los sustratos adecuados para la detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro azul tetrazolio y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, disponibles como soluciones madre listas para el uso de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación adecuada de enzima sustrato puede  
 50 generar un producto de reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que pueden ser medidos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo usando una película sensible a la luz o un sistema adecuado de cámara). En cuanto a la medición de la reacción enzimática, aplican de manera análoga los criterios dados arriba. Las etiquetas fluorescentes típicas incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Texas Red, fluoresceína, y los pigmentos Alexa (por ejemplo Alexa 568). Están disponibles otras etiquetas  
 55 fluorescentes como por ejemplo de Molecular Probes (Oregon). También se contempla el uso de puntos cuánticos, como etiquetas fluorescentes. La etiquetas radioactivas típicas incluyen <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y similares. Una etiqueta radioactiva puede ser detectada por cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo una película sensible a la luz o un formador de imágenes de fósforo. Los métodos de medición adecuados incluyen también precipitación (particularmente inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia generada eléctricamente),  
 60 RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo de inmunosorbente ligado a la enzima), pruebas inmunes de emparejado de enzima, inmunoensayo de emparejado de electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroinmunoensayo de disociación aumentada de lantánidos (DELFA), ensayo de proximidad de escintilación (SPA), turbidimetría,

nefelometría, turbidimetría aumentada de látex o nefelometría, o pruebas de inmunidad de fase sólida. Pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica (tales como electroforesis en gel, electroforesis en gel en 2D, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDSPAGE), formación de Manchas Occidentales, y espectrometría de masas), solos o en combinación con etiquetado u otros métodos de detección, como se describió arriba.

5 La cantidad de homoarginina puede ser, también preferiblemente, determinada como sigue: (a) poniendo en contacto un soporte sólido que incluye un ligando para la homoarginina como se especifica arriba, con una muestra que incluye homoarginina y (b) midiendo la cantidad de homoarginina que está unida al soporte. El ligando, elegido preferiblemente de entre el grupo que consiste en ácido nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está presente preferiblemente sobre un soporte sólido en forma inmóvil. Los materiales para la producción de  
10 soportes sólidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, materiales de columna comercialmente disponibles, esferas de poliestireno, esferas de látex, esferas magnéticas, partículas de coloides metálicos, perlas y superficies de vidrio y/o silicona, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitas, bandejas de pozos y paredes de reacción, tubos plásticos, etc. El ligando o agente puede estar unido a diferentes vehículos. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextran, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas, y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, pero no están limitados a, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. También se contempla el uso de "arreglos en suspensión" como arreglos [Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12]. En tales arreglos en suspensión, el vehículo, por ejemplo una microesfera o microbola, está presente en suspensión. El  
20 arreglo consiste en diferentes microbolas or microesferas, posiblemente etiquetadas, que portan diferentes ligandos. Los métodos para producir tales arreglos, por ejemplo basados en química de fase sólida y grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (US 5,744,305).

Como se usa aquí, el término "comparación" engloba la comparación de la cantidad de homoarginina comprendida por la muestra que va a ser analizada, con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada en otra  
25 parte en esta descripción. Debe entenderse que, como se usa aquí, la comparación se refiere a la comparación de parámetros o valores correspondientes, por ejemplo se compara una cantidad absoluta con una cantidad absoluta de referencia, mientras se compara una concentración con una concentración, o se comparan una señal de intensidad de referencia, obtenida de una muestra de prueba, con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación a la que se hace referencia en la etapa (b) del método de la presente invención, puede ser llevada a cabo manualmente o con ayuda de computador. Para una comparación con ayuda de  
30 computador, el valor de la cantidad determinada puede ser comparado con valores correspondientes a referencias adecuadas, que son almacenadas en una base de datos por un programa de computador. El programa de computador puede además evaluar el resultado de la comparación, es decir suministrar automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Con base en la comparación de las cantidades determinadas en la etapa a) y la cantidad de referencia del método de la presente invención, es posible predecir el riesgo que tiene el sujeto de sufrir de una o más de las complicaciones a las que se hace referencia aquí. Por ello, debe elegirse la cantidad de referencia de modo que bien sea una diferencia o una similitud en las cantidades comparadas permita identificar aquellos pacientes cuyo riesgo de mortalidad está incrementado.

De acuerdo con ello, el término "cantidad de referencia" como es usado aquí se refiere a una cantidad que permite  
40 determinar si un paciente tiene un riesgo incrementado de mortalidad. De acuerdo con ello, la referencia puede ser (i) derivada de un paciente del que se sabe que está en un riesgo incrementado de mortalidad o (ii) puede ser derivada de un paciente del que se sabe no está en un riesgo incrementado de mortalidad. Preferiblemente, la cantidad de referencia es determinada sobre la base de una cantidad mediana promedio, obtenida de un grupo de pacientes que satisfacen el criterio bien sea de (i) o de (ii), descritos arriba. Además, la cantidad de referencia puede definir una cantidad umbral, por la cual una cantidad menor que el umbral será indicativo de que un sujeto está en un riesgo incrementado de mortalidad. La cantidad de referencia aplicable para un sujeto individual puede variar, dependiendo de varios parámetros fisiológicos tales como edad, género o subpoblación, así como de los medios usados para la determinación del aminoácido al que se hace referencia aquí. Una cantidad de referencia adecuada puede ser determinada por el método de la presente invención, a partir de una muestra de referencia que sea  
50 analizada conjuntamente, es decir simultáneamente o a continuación, con la muestra de prueba. Una cantidad de referencia preferida que sirve como un umbral puede ser derivada del límite inferior o normal (LLN), es decir el límite inferior de la cantidad fisiológica que es encontrado en muestras de una población de sujetos que no está en riesgo incrementado de mortalidad. El LLN para una población dada de sujetos puede ser determinado por varias técnicas bien conocidas. Una técnica adecuada puede ser determinar la mediana o promedio de la población para las  
55 cantidades de aminoácido que va a ser determinado en el método de la presente invención.

Preferiblemente, una cantidad de homoarginina por encima de aproximadamente 1.40  $\mu\text{M}$  indica un bajo riesgo de mortalidad mientras que una cantidad de homoarginina por debajo de este nivel indica un riesgo incrementado de mortalidad. Una cantidad de homoarginina por debajo de aproximadamente 1.10  $\mu\text{M}$ , preferiblemente, indica un riesgo incrementado de mortalidad.

Se entiende que el término "aproximadamente" indica +/- 30% de la cantidad indicada, preferiblemente +/- 20% de la cantidad indicada, más preferiblemente +/- 10% de la cantidad indicada, preferido al máximo +/- 5% de la cantidad indicada.

5 De manera ventajosa, la presente invención suministra un marcador biológico confiable para determinar el riesgo de mortalidad. La identificación de pacientes de alto riesgo permite una vigilancia más cercana de este grupo, de modo que pueden administrarse tratamientos preventivos a aquellos pacientes con la necesidad máxima. Además, la homoarginina incrementa la disponibilidad de óxido nítrico y probablemente está relacionada positivamente con la función endotelial. Este hecho, tomado junto con el hallazgo del estudio subyacente de la presente invención de que bajas cantidades de homoarginina están correlacionadas con incremento en la mortalidad, además, sugiere medidas preventivas específicas: pacientes con bajas cantidades de homoarginina deberían recibir terapias que busquen incrementar los niveles de homoarginina y/o NO y soportar la función endotelial. Otro hallazgo del estudio es la asociación del estado de homoarginina y riesgo de ataque cerebral, con lo cual se identifican bajos niveles de homoarginina en el suero como un nuevo factor de riesgo de ataque cerebral. Así, la presente invención contribuye al desarrollo de regímenes individualizados de tratamiento.

15 Se entiende que las definiciones y explicaciones de los métodos, medidas y términos hechas arriba aplican mutatis mutandis para todos los aspectos descritos en esta especificación a continuación, excepto que se indique de otro modo.

Además, el método de la presente invención, preferiblemente, incluye además los pasos de

20 c) determinación de la cantidad de los siguientes marcadores seleccionados de entre el grupo consistente en: TnT, NT-proBNP, BNP, ANP, CRP, SAA, Neopterin, ADMA, y/o SDMA en dicha muestra, simultáneamente con la cantidad de homoarginina en la etapa a),

d) comparación de la cantidad de marcador determinada en la etapa c) con una cantidad de referencia, con lo cual se determina el riesgo de mortalidad en el paciente.

25 La presente divulgación toma ventaja de otros ciertos marcadores. Para la persona diestra en la técnica, el término "marcador" es conocido. En particular, los marcadores son productos de expresión de genes que son expresados de manera diferencial, es decir regulados hacia arriba o regulados hacia abajo en presencia o ausencia de una cierta condición, enfermedad o complicación. Usualmente, se define un marcador como un ácido nucleico (incluyendo mARN), una proteína, péptido, o compuesto de molécula pequeña. La cantidad de un marcador adecuado puede indicar la presencia o ausencia de la condición, enfermedad o complicación, y permitir así el diagnóstico.

30 Preferiblemente, dichos marcadores son seleccionados de entre el grupo consistente en TnT, NT-proBNP, BNP, ANP, CRP, SAA, Neopterin, ADMA, y/o SDMA

35 Como se usa aquí, el término "Troponina (TnT) cardíaca" se refiere a todas las isoformas de Troponina expresadas en células del corazón y, preferiblemente, las células subendocardiales. Éstas isoformas están bien caracterizadas en la técnica como se describe, por ejemplo en Anderson 1995, Circulation Research, vol. 76, no. 4: 681-686 y Ferrieres 1998, Clinical Chemistry, 44: 487-493. Preferiblemente, Troponina cardíaca se refiere a Troponina T y/o Troponina I, y, preferido al máximo a Troponina T. Se entiende que las isoformas de las Troponinas pueden ser determinadas en el método de la presente invención junto, es decir simultáneamente o secuencialmente, o individualmente, es decir sin determinar en absoluto la otra isoforma. Las secuencias de aminoácidos para Troponina T humana y Troponina I humana son divulgadas en Anderson, en la localización citada y Ferrieres 1998, Clinical Chemistry, 44: 487-493. El término "Troponina cardíaca" abarca también variantes de las Troponinas específicas mencionadas arriba, es decir preferiblemente, de Troponina I, y más preferiblemente de Troponina T. Tales variantes tienen por lo menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que las Troponinas cardíacas específicas. En particular, ellas comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si ellas son detectables por los mismos ensayos específicos mencionados en esta especificación, por ejemplo por ensayos ELISA que usan anticuerpos policlonales o monoclonales se reconocen específicamente dichas Troponinas cardíacas. Además, debe entenderse que una variante tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a por lo menos una sustitución, borrado y/o adición de aminoácido, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante es aún, preferiblemente, por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la Troponina específica. Las variantes pueden ser variantes de alelos o cualesquiera otros homólogos, parálogos, u ortólogos específicos de especies. Además, las variantes a las que se hace referencia aquí incluyen fragmentos de las Troponinas cardíacas específicas o de los tipos arriba mencionados de las variantes, en tanto estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales a las que se hace referencia arriba. Tales fragmentos pueden ser, por ejemplo productos de degradación de las Troponinas. Además se incluyen variantes que difieren debido a modificaciones post-translacionales tales como adición de grupos fosfato o miristilo.

50

55

Como se usan aquí, los términos "péptido (ANP) natriurético atrial" y "péptido (BNP cerebral natriurético)" incluyen péptidos tipo ANP y BNP y variantes de ellos (Bonow 1996, *Circulation* 93, 1946). Los péptidos tipo ANP incluyen pre-proANP, proANP, NT-proANP, y ANP. Los péptidos tipo BNP incluyen pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP, y BNP. Los péptidos pre-pro (134 aminoácidos en el caso de pre-proBNP) incluyen un péptido corto de señal, el cual es escindido enzimáticamente liberando el péptido pro (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El péptido pro es escindido adicionalmente hasta un péptido pro terminal en N (péptido pro NT, 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de BNP, 28 aminoácidos en el caso de ANP). Preferiblemente, los péptidos natriuréticos de acuerdo con la presente invención son NT-proANP, ANP, y más preferiblemente, NT-proBNP, BNP, y variantes de ellos. ANP y BNP son las hormonas activas y tienen una vida media más corta que sus respectivas contrapartes inactivas, NT-proANP y NT-proBNP. BNP es metabolizado en la sangre, mientras NT-proBNP circula en la sangre como una molécula intacta y como tal es eliminada por vía renal. La vida media in-vivo de NTproBNP es 120 min más larga que la de BNP, la cual es 20 min (Smith 2000, *J Endocrinol* 167, 239). Los pasos previos al análisis son más robustos con NT-proBNP permitiendo un transporte fácil de la muestra hasta un laboratorio central (Mueller 2004, *Clin Chem Lab Med* 42, 942). Las muestras de sangre pueden ser almacenadas a temperatura ambiente por varios días, o pueden ser enviadas por correo o embarcadas sin pérdida de recuperación. En contraste, el almacenamiento de BNP por 48 horas a temperatura ambiente o a 4° Celsius conduce a una pérdida de concentración de por lo menos 20 % (Wu 2004, *Clin Chem* 50, 867). Por ello, dependiendo del curso de tiempo o de las propiedades de interés, puede ser ventajosa la medición de las formas bien sea activa o inactiva de los péptidos natriuréticos. Los péptidos natriuréticos más preferidos de acuerdo con la presente invención son NT-proBNP o variantes del mismo. El NT-proBNP humano, como se le hace referencia acuerdo con la presente invención, es un polipéptido que incluye, preferiblemente, 76 aminoácidos en longitud correspondiente a la porción terminal en N de la molécula de NT-proBNP humano. La estructura de BNP y NT-proBNP humanos ha sido descrita ya en detalle en la técnica previa (WO 02/089657, WO 02/083913, o Bonow 1996, *Circulation* 93, 1946). Preferiblemente, el NT-proBNP humano como es usado aquí es NT-proBNP humano como se divulga en EP 0648228 B1. El NT-proBNP abarca también la variante de alelo y otras variantes de dicha secuencia específica para NT-proBNP humano discutido arriba. Específicamente, se prevén polipéptidos de variante que son a nivel de aminoácidos preferiblemente, por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, o 99% idénticos a NT-proBNP humano. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede ser determinado mediante algoritmos bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, el grado de identidad es determinado comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre una ventana de comparación, donde el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede incluir adiciones o eliminaciones (por ejemplo brechas o trechos que sobresalen), comparando la alineación óptima con la secuencia de referencia (la cual no incluye adiciones o eliminaciones). El porcentaje es calculado determinando el número de posiciones en las cuales ocurre el residuo idéntico de aminoácidos en ambas secuencias, para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. La alineación óptima de secuencias por comparación puede ser conducida por el algoritmo de homología local (Smith y Waterman 1981, *Add APL Math* 2, 482), por el algoritmo de alineación de homología (Needleman y Wunsch 1970, *J Mol Biol* 48, 443), por la búsqueda del método de similitud (Pearson y Lipman 1988, *Proc Natl Acad Sci* 85, 2444), por ejecuciones por computador de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual. Dado que dos secuencias han sido identificadas por comparación, se emplean preferiblemente GAP y BESTFIT para determinar su alineación óptima y, así, el grado de identidad. Preferiblemente, por defecto se usan los valores de 5.00 para peso de brecha y 0.30 para longitud de peso de brecha. Las variantes a las que se hace referencia arriba pueden ser variantes de alelo o cualesquiera otros homólogos, parálogos, u ortólogos específicos de especies. Los productos de degradación proteolítica son sustancialmente similares y también previstos, los cuales son reconocidos aún por los medios diagnósticos o por ligandos dirigidos contra el péptido respectivo de longitud total. También se abarcan polipéptidos de variante que tienen eliminaciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos comparadas con la secuencia de aminoácidos de NT-proBNP humano, en tanto dichos polipéptidos tienen propiedades de NT-proBNP. Las propiedades NT-proBNP, tales como se hace referencia aquí, son propiedades inmunológicas y/o biológicas. Preferiblemente, las variantes NT-proBNP tienen propiedades inmunológicas (es decir composición de epítipo) comparables a aquellas de NT-proBNP. Así, las variantes serán reconocibles por los medios arriba mencionados o por ligandos usados para la determinación de la cantidad de los péptidos natriuréticos. Las propiedades biológicas y/o inmunológicas de NT-proBNP pueden ser detectadas por el ensayo descrito en (Karl 1999, *Scand J Clin Invest* 230,177; Yeo 2003, *Clinica Chimica Acta* 338, 107). Las variantes también incluyen péptidos modificados por vía post-translacional tales como péptidos glicosilados. Además, una variante es también un péptido o polipéptido que ha sido modificado después de la toma de la muestra, por ejemplo por unión covalente o no covalente de una etiqueta, particularmente una etiqueta radioactiva o fluorescente, al péptido. Se conocen ejemplos de variantes. Por ejemplo se han descrito variantes de NT-proANP y NT-proBNP y métodos para su medición (Ala-Kopsala 2004, *Clin Chem* 50, 1576). La heterogeneidad molecular tiene un impacto mayor sobre la medición de fragmentos terminales en N circulantes de péptidos natriuréticos tipo A y tipo B.

Como se usa aquí, el término "proteína reactiva C (CRP)" se refiere al residuo de proteína de 224 aminoácidos con una masa molar de monómero de 25106 Da, que tiene una forma de disco anular pentamérico (Thompson, D et al, 1999, *Structure* 7, 169-177). Además, CRP es un miembro de la familia de pentraxinas pequeñas.



Como se usa aquí, el término " amiloide de suero humano A (SAA)" se relaciona con la proteína SAA madura que incluye SAA1 (A-SAA), SAA2 (A-SAA), o SAA4 (C-SAA) humanos que varían en tamaño desde 104 a 112 aminoácidos derivados de productos de traslación primaria con péptidos conductores de 18 aminoácidos (Uhlir, C. M., et al, 1999, Eur. J. Biochem. 265, 501-523). Los SAAs son producidos predominantemente por el hígado y pertenecer a una familia de apolipoproteínas asociadas con lipoproteína (HDL) de alta densidad, en plasma. Diferentes isoformas de SAA son expresadas de manera constitutiva (SAAs constitutivos (C-SAA)) a diferentes niveles o en respuesta a estímulos inflamatorios (SAAs de fase aguda (A-SAA)).

Como se usa aquí, el término "Neopterina" se refiere a 2-amino-6-(1,2,3-trihidroxipropil)-1H-pteridin-4-ona y es un producto catabólico de guanosin-trifosfato (GTP), un nucleótido de purina.

Además, como se usa aquí, el término " dimetil arginina (ADMA) asimétrica se refiere a N',N'-dimetilarginina, o ácido (2S)-2-amino-5-[(amino-dimetilaminometil)amino]-pentanoico y el término " dimetilarginina (SDMA) simétrica, como se usa aquí, se refiere a N',N"-dimetilarginina un isómero de ADMA.

Dependiendo del respectivo marcador descrito adicionalmente arriba, una cantidad de dicho marcador diferente de la respectiva cantidad de referencia indica un riesgo incrementado o disminuido de mortalidad determinado en la etapa d.

En una realización preferida de la presente invención, el riesgo de mortalidad que va a ser determinado de acuerdo con el método de la presente invención, es debido a mortalidad cardiovascular. La mortalidad cardiovascular se refiere a todos los casos de muerte que están relacionados con causas cardiovasculares. Preferiblemente, estas causas cardiovasculares son infarto del miocardio, muerte por falla cardíaca congestiva, muerte por ataque cerebral, muerte que sigue cirugía de injerto de bypass de arteria coronaria y muerte que sigue a intervención coronaria percutánea.

Debe entenderse que puede determinarse el riesgo que tiene un paciente de sufrir eventos cardiovasculares adversos no letales. Dado que no todo evento cardiovascular adverso es letal, un riesgo incrementado de muerte por causas cardíacas en pacientes con bajos niveles de homoarginina indica también un riesgo general incrementado de eventos cardiovasculares adversos no letales.

El término "enfermedad arterial coronaria" o "CAD" se refiere a una condición también conocida como enfermedad aterosclerótica de corazón. Esta condición está caracterizada por la acumulación de placa aterosclerótica en las paredes de las arterias coronarias. Una vez la acumulación excede un cierto nivel, se afecta el flujo de sangre a través de la arteria. Esta condición causa Angina pectoris y puede causar infarto del miocardio, específicamente si la placa se rompe. La intervención común para tratar CAD incluye intervención coronaria percutánea (PCI) y cirugía de injerto de bypass de arteria coronaria.

En otro ejemplo preferido, la mortalidad es debida a una enfermedad de desgaste crónico. El término "enfermedad de desgaste" se refiere a toda enfermedad que induce la pérdida de músculos y/o grasa. Dicha pérdida puede estar localizada en ciertos órganos o partes del cuerpo o ser generalizada. Preferiblemente, el término "enfermedad de desgaste" se refiere a cáncer, tuberculosis, y otras enfermedades crónicas infecciosas o malnutrición.

Además, la presente invención se relaciona con un método para decidir si un paciente tiene un riesgo de mortalidad y si tiene necesidad de la administración de homoarginina, que incluye las etapas de

- a) determinación de la cantidad de homoarginina en una muestra del paciente;
- b) comparación de la cantidad determinada con una cantidad de referencia, en donde se decide si el paciente requiere la administración de homoarginina.

El vínculo entre bajas cantidades de homoarginina y un riesgo incrementado de mortalidad descubierto en el estudio subyacente de la presente invención, permite la identificación de aquellos pacientes cuyo riesgo incrementado de mortalidad es debido a una falta de homoarginina. Por esto, estos pacientes deberían recibir homoarginina adicional para disminuir dicho riesgo.

Otra realización preferida de la presente invención se relaciona con el uso de homoarginina para la determinación del riesgo de mortalidad en un paciente.

También se describe un dispositivo para predecir el riesgo de mortalidad en un paciente, que incluye

- a) una unidad de análisis para determinar la cantidad de homoarginina en una muestra del paciente; y

b) una unidad de evaluación para comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia adecuada y para predecir el riesgo de mortalidad del paciente.

5 Como se usa aquí, el término "dispositivo" se refiere a un sistema de medios que incluye por lo menos los medios arriba mencionados, unidos de manera operativa uno a otro, para practicar el método de la presente invención. Los medios preferidos para determinar las cantidades de los marcadores, y los medios para llevar a cabo la comparación, son divulgados arriba. La forma como se unan los medios de una manera operativa dependerá del tipo de medios que son incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, donde se aplique una unidad de análisis para la determinación automática de la cantidad de aminoácidos, los datos obtenidos por dicha unidad de análisis que opera de manera automática pueden ser procesados mediante, por ejemplo, un computador como unidad de evaluación, con objeto de obtener los resultados deseados. Preferiblemente, en tal caso los medios están incluidos en un solo dispositivo.

15 Dicho dispositivo incluye, preferiblemente, una unidad de análisis para la medición de la cantidad de homoarginina en una muestra aplicada y una unidad de evaluación para el procesamiento de los datos resultantes. Preferiblemente, la unidad de evaluación incluye una base de datos con las cantidades de referencia almacenadas y un código de programa de computador el cual, cuando está incorporado de manera tangible en un computador, lleva a cabo la comparación de las cantidades determinadas y las cantidades de referencia almacenadas en la base de datos. Más preferiblemente, la unidad de evaluación incluye un código de programa de computador adicional el cual asigna el resultado de la comparación a una predicción de riesgo. En tal caso, también preferiblemente se prevé que la unidad de evaluación incluya una base de datos adicional en donde las cantidades de referencia son asignadas a los riesgos.

25 De manera alternativa, donde se usan medios tales como tiras de prueba para determinar la cantidad de homoarginina, la unidad de evaluación pueden incluir tiras de control o tablas que asignan la cantidad determinada a una cantidad de referencia. Preferiblemente las tiras de prueba están acopladas a ligandos que ligan específicamente a homoarginina. Preferiblemente la tira o dispositivo incluyen medios para la detección de la unión de dicha homoarginina a dichos ligandos. Se divulgan los medios preferidos para la detección. En tal caso, la unidad de análisis y la unidad de evaluación están unidas de manera operativa, en que el usuario del sistema junta los resultados de la determinación de la cantidad y los valores de diagnóstico o pronóstico de ellos debido a las instrucciones e interpretaciones dadas en un manual. La unidad de análisis y la unidad de evaluación pueden aparecer como dispositivos separados y están, preferiblemente, empacados juntos como un kit. La persona diestra en la técnica se dará cuenta de cómo enlazar los medios sin mayores preámbulos. Son dispositivos preferidos a aquellos que pueden ser aplicados sin el conocimiento particular de un doctor especializado, por ejemplo tiras de prueba o dispositivos electrónicos que requieren solamente que la muestra sea cargada. Los resultados pueden ser dados como salida de datos brutos que necesitan interpretación del doctor. Preferiblemente, la salida del dispositivo son sin embargo datos brutos procesados, es decir evaluados, cuya interpretación no requiere un doctor.

30 Dispositivos adicionales preferidos incluyen las unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo, biosensores, arreglos, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen de manera específica homoarginina, dispositivos de resonancia superficial de plasmón, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masa, etc.) o unidades/dispositivos de evaluación relacionados arriba de acuerdo con el método de la invención.

También se describe un kit para la predicción del riesgo de mortalidad en un paciente, que incluye

40 a) un agente de análisis para la determinación de la cantidad de homoarginina en una muestra del paciente; y

b) una unidad de evaluación para comparar la cantidad determinada por el agente de análisis con una cantidad adecuada de referencia, donde dicha unidad permite además la predicción del riesgo que tiene el paciente de sufrir de mortalidad.

45 Como se usa aquí, el término "kit" se refiere a una colección de los componentes mencionados arriba, los cuales pueden o no estar empacados juntos. Los componentes del kit pueden estar incluidos por viales separados (es decir como un kit de partes separadas) o suministrados en un vial individual. Además, debe entenderse que el kit está para ser usado para practicar los métodos relacionados aquí arriba. Se prevé, preferiblemente, que todos los componentes sean suministrados de una manera lista para el uso, para practicar los métodos mencionados arriba. Además, preferiblemente el kit contiene instrucciones para llevar a cabo dichos métodos. Las instrucciones pueden ser suministradas por un manual del usuario en forma de papel o electrónica. Por ejemplo, el manual puede incluir instrucciones para la interpretación de los resultados obtenidos cuando se llevan a cabo los métodos arriba mencionados, usando el kit de la presente invención. El kit incluirá un agente de análisis. Este agente es capaz de reconocer de manera específica homoarginina en una muestra del sujeto. Además, dicho(s) agente(s) será(n) capaces por unión a homoarginina, preferiblemente, de generar una señal detectable cuya intensidad está correlacionada con la cantidad de homoarginina presente en la muestra. Dependiendo del tipo de señal que se genera, pueden aplicarse métodos para la detección de la señal, los cuales son bien conocidos en la técnica. Los agentes de análisis que son usados preferiblemente en el kit incluyen anticuerpos o aptámeros. El agente de análisis

puede estar presente sobre una tira de prueba como se describió en otra parte aquí. La cantidad de homoarginina así detectada puede entonces ser evaluada adicionalmente en la unidad de evaluación. Las unidades de evaluación preferidas que van a ser usadas en el kit incluyen aquellas relacionadas en otra parte aquí.

- 5 Debe entenderse que las definiciones y explicaciones de los métodos, mediciones y términos hechas arriba aplican mutatis mutandis para todos los aspectos descritos en esta especificación a continuación, excepto que se indique de otro modo.

En una realización, la invención se relaciona con un método para la determinación del riesgo de mortalidad en un paciente, que incluye las etapas de

a) determinación de la cantidad de homoarginina o sus precursores metabólicos en una muestra del paciente; y

- 10 b) comparación de la cantidad determinada con una cantidad de referencia, en donde se predice el riesgo de mortalidad en el paciente.

En otra realización, la invención se relaciona con un método para decidir si un paciente tiene un riesgo de mortalidad y si necesita de la administración de homoarginina, que incluye las etapas de

a) determinación de la cantidad de homoarginina o sus precursores metabólicos en una muestra del paciente;

- 15 b) comparación de la cantidad determinada con una cantidad de referencia, en donde se decide si el paciente requiere la administración de homoarginina.

En una realización adicional preferida, la presente invención se relaciona con el uso de homoarginina o sus precursores metabólicos para la determinación del riesgo de mortalidad en un paciente.

También se describe un dispositivo para predecir el riesgo de mortalidad en un paciente, que incluye

- 20 a) una unidad de análisis para determinar la cantidad de homoarginina o sus precursores metabólicos en una muestra del paciente; y

b) una unidad de evaluación para comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia adecuada y para predecir el riesgo de mortalidad del paciente.

También se describe un kit para predecir el riesgo de mortalidad en un paciente, que incluye

- 25 a) un agente de análisis para determinar la cantidad de homoarginina o sus precursores metabólicos en una muestra del paciente; y

b) una unidad de evaluación para comparar la cantidad determinada por el agente de análisis con una cantidad de referencia adecuada, donde dicha unidad permite adicionalmente la predicción del riesgo que tiene el paciente de sufrir de mortalidad.

- 30 También se describe el uso de homoarginina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que tiene un riesgo incrementado de mortalidad, causado por ataque cerebral o una causa cardíaca.

También se describe una composición farmacéutica que incluye homoarginina.

- 35 Como se usa aquí, el término "medicamento" se refiere, en un aspecto, a una composición farmacéutica que contiene homoarginina como compuesto farmacéutico activo, en donde la composición farmacéutica puede ser usada para terapia humana o no humana de varias enfermedades o desórdenes, en una dosis terapéuticamente efectiva.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas relacionadas aquí son administradas por lo menos una vez con objeto de tratar o mejorar o prevenir una enfermedad o condición citada en esta especificación. Sin embargo, dichas composiciones farmacéuticas pueden ser administradas más de una vez.

- 40 Las composiciones farmacéuticas específicas son preparadas de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica e incluyen por lo menos un compuesto activo relacionado aquí arriba, en mezcla o de otro modo asociado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Para hacer aquellas composiciones farmacéuticas específicas, el(los) compuesto(s) activo(s) será(n) mezclado(s) usualmente con un vehículo o el

diluyente. Las formulaciones resultantes están para ser adaptadas al modo de administración. Las recomendaciones de dosificación serán indicadas en las instrucciones de quien prescribe o del usuario, con objeto de anticipar ajustes de dosis dependiendo del recipiente considerado.

5 Como se usa aquí, una composición farmacéutica incluye homoarginina y, preferiblemente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

10 La composición farmacéutica es, preferiblemente, administrada en formas de dosificación convencionales, preparadas por combinación de los medicamentos con vehículos farmacéuticos estándar de acuerdo a procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden involucrar mezcla, granulación y compresión o disolución de los ingredientes según sea apropiado, hasta dar la preparación deseada. Se apreciará que la forma y carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables son dictadas por la cantidad de compuesto activo con el cual él va a ser combinado, la ruta de administración y otras variables bien conocidas. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y el modo de acción de un compuesto activo, la composición farmacéutica puede ser administrada también por otras vías.

15 El(los) vehículo(s) tiene(n) que ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser dañinos para el recipiente de los mismos. El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido, un gel o un líquido. Son ejemplos de vehículos sólidos lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Son ejemplos de vehículos líquidos solución salina tamponada de fosfato, jarabe, aceites tales como aceite de maní y aceite de oliva, agua, emulsiones, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles y similares. De modo similar, el vehículo o diluyente puede incluir materiales para retardo de tiempo bien conocidos por la técnica, tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solos o con una cera. Dichos vehículos adecuados incluyen aquellos mencionados arriba y otros bien conocidos en la técnica, ver por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

25 El(los) diluyente(s) es/son seleccionados de modo que no afecten la actividad biológica de la combinación. Son ejemplos de tales diluyentes agua destilada, solución salina fisiológica, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Adicionalmente, la formulación o composición farmacéutica puede incluir también otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

30 Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a una cantidad de compuesto farmacéuticamente activo que va a ser usado en una composición farmacéutica de la presente invención, el cual previene, mejora o trata los síntomas que acompañan una enfermedad o condición relacionada en esta especificación. La eficacia terapéutica y toxicidad del compuesto puede ser determinada por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50 % de la población) y LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéutico y tóxico es el índice terapéutico, y puede ser expresada como la relación LD50/ED50.

35 El régimen de dosificación será determinado por el médico que atiende y por otros factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área superficial corporal, edad, el compuesto particular que va a ser administrado, sexo, tiempo y ruta de administración, salud general y otras medicinas que son administradas de manera concurrente. El progreso puede ser vigilado por evaluación periódica.

40 Preferiblemente, el medicamento puede incluir medicinas adicionales a homoarginina las cuales son adicionadas a la composición farmacéutica durante su formulación. Finalmente, debe entenderse que la formulación de una composición farmacéutica tiene lugar bajo condiciones estandarizadas de BPM o similares, con objeto de asegurar calidad, seguridad farmacéutica, y efectividad del medicamento.

45 El término "composición" se refiere a cualquier composición formulada en forma sólida, líquida (o gaseosa). Dicha composición incluye homoarginina opcionalmente junto con compuestos auxiliares adecuados tales como diluyentes o vehículos o ingredientes adicionales. En este contexto, se distingue entre compuestos auxiliares, es decir compuestos que no contribuyen a los efectos suscitados por el compuesto aplicado de la composición para su propósito deseado, e ingredientes adicionales, es decir compuestos que contribuyen a un efecto adicional o a modular el efecto del compuesto. Los diluyentes y/o vehículos adecuados dependen del propósito para el cual va a ser usada la composición, y de los otros ingredientes. La persona diestra en la técnica puede terminar tales diluyentes y/o vehículos adecuados, sin mayores preámbulos. Son ejemplos de vehículos y/o diluyentes adecuados los divulgados en otra parte aquí. Las composiciones adecuadas para administración oral pueden ser presentadas como unidades discretas tales como cápsulas, sellos, tabletas, o pastillas, donde cada una contiene una cantidad predeterminada de homoarginina descrita aquí. Otras composiciones incluyen suspensiones en licores acuosos o  
55 líquidos no acuosos tales como un jarabe, un elixir, o una emulsión.

La composición antes mencionada es un medicamento como se especifica en otra parte en la descripción en más detalle. Dicho medicamento puede ser usado para reducir el riesgo de mortalidad causado por ataque cerebral o causa cardíaca.

- 5 La composición puede ser para suplementos alimenticios que incluyen homoarginina, que pueden ser formulados en una manera equivalente a la descrita para una composición farmacéutica arriba. La composición para suplementos alimenticios puede incluir adicionalmente componentes grado alimenticio.

- 10 Como se usa aquí, una cantidad efectiva de homoarginina es una dosificación lo suficientemente grande para producir el efecto terapéutico deseado para reducir el riesgo de mortalidad. Sin embargo, una cantidad efectiva no es una dosificación tan larga como para causar efectos secundarios adversos. Generalmente, una cantidad efectiva puede variar con la edad del paciente, condición, peso y sexo así como con la extensión de la condición que es tratada, y puede ser determinada por alguien diestro en la técnica. La dosificación puede ser ajustada por el facultativo individual en el evento de cualquier complicación.

### Ejemplo

#### Diseño y participantes del estudio

- 15 El estudio 4D fue un ensayo controlado prospectivo hecho de manera aleatoria incluyendo 1255 pacientes con diabetes mellitus tipo 2, edad 18 - 80 años, y tratados por hemodiálisis por menos de 2 años. Entre marzo de 1998 y octubre de 2002, se reclutaron pacientes en 178 centros de diálisis en Alemania. Se asignaron pacientes aleatoriamente a tratamientos dobles ciegos con bien sea 20 mg de atorvastatina (n=619) o placebo (n=636) una vez al día, y se les hizo seguimiento hasta la fecha de su muerte, censura, o final del estudio en marzo de 2004. El punto
- 20 final primario del estudio 4D fue definido como un compuesto de muerte por causas cardíacas, ataque cerebral e infarto del miocardio (MI), cualquiera que ocurriera primero. Los puntos finales del estudio 4D fueron adjudicados centralmente por tres miembros del comité de punto final, ciegos al tratamiento de estudio y de acuerdo con criterios predefinidos. En ambos estudios las muertes cardiovasculares incluyeron muerte cardíaca súbita, infarto fatal del miocardio, muerte debida a falla cardíaca congestiva, muerte después de intervención para tratar CAD, otras
- 25 muertes debidas a causas cardíacas y ataque cerebral fatal.

#### Recolección de datos

- La información sobre edad, género y estado fumador fue obtenida a través de entrevistas con los pacientes. El estado de fumador fue clasificado como nunca, previo o actual. Se reportaron comorbilidades por los médicos que
- 30 trataban los pacientes. Se midió la presión sanguínea en posición de sentado. Se diagnosticó hipertensión si la presión sanguínea sistólica y/o diastólica excedía 140 y/o 90 mm de Hg o si había una historia de hipertensión, evidente a través del uso de medicinas contra la hipertensión.

- Se tomaron muestras de sangre antes de iniciar la diálisis en pacientes 4D. Se midió la homoarginina de manera uniforme con un método HPLC en fase reversa en suero almacenado a -80°C. Los coeficientes de variación dentro del día (CV) fueron 4.7% (1.21 mM) y 2.2% (3.53 mM), y entre día CV fueron 7.9% (1.25 mM) y 6.8% (3.66 mM),
- 35 respectivamente. Se midió la proteína reactiva C con una inmunonefelometría de alta sensibilidad (Dade Behring Marburg, Alemania).

#### Análisis estadístico

- Se expresaron variables continuas como media con desviación estándar o mediana con rango intercuartil (IQR) según fuera apropiado, y se expresaron variables categóricas como porcentajes.
- 40 Se calculó la asociación de homoarginina con muerte cardiovascular y muerte por toda causa, usando homoarginina como variable continua (transformada de manera logarítmica), y como variable categórica de acuerdo a cuartiles. Se calcularon tasas absolutas (incidencia), y riesgos relativos derivados de análisis de regresión de Cox. Se hicieron ajustes multivariable como se describe en la leyenda de la tabla 2. Se evaluaron los coeficientes de correlación de Pearson. Se ajustaron análisis de regresión lineal adicional para factores de riesgo cardiovascular común,
- 45 incluyendo presión sanguínea, hábito de fumar, índice de masa corporal y niveles de colesterol.

Todos los valores p están reportados con dos colas. Los análisis fueron realizados usando SPSS versión 16.0.

| Tabla 1: Características de línea base de individuos participantes en el estudio 4D (diabéticos tipo 2 en hemodiálisis) |                |
|---|----------------|
| Edad [años]   | 65.7 (8.3)     |
| Sexo [% masculino]  | 54             |
| Hipertensión arterial [%]   | 89             |
| Presión sanguínea sistólica [mm Hg]   | 146 (22)       |
| Presión sanguínea diastólica [mm Hg]  | 76 (11)        |
| Fumador/ Ex- fumador [%]  | 41             |
| Índice de masa corporal [kg/m <sup>2</sup> ]  | 27.5 (4.8)     |
| Enfermedad arterial coronaria [%]   | 29             |
| Falla congestiva del corazón* [%]   | 35             |
| Homoarginina [mM]   | 1.2 (0.5)      |
| Colesterol LDL [mg/dl]  | 126 (30)       |
| Colesterol HDL [mg/dl]  | 36 (13)        |
| Albúmina [g/dl]   | 3.8 (0.3)      |
| Hemoglobina [g/dl]  | 10.9 (1.3)     |
| HbA1c [%]   | 6.7 (1.3)      |
| Proteína reactiva C [mg/dl]   | 5.0 (2.3-12.4) |
| Los valores están presentados como media (SD) o mediana (rango intercuartil) o %  |                |
| *falla congestiva de corazón como se definió por NYHA II a IV   |                |

| Tabla 2: Relaciones de peligro (intervalos de confianza 95%) para mortalidad por toda causa y cardiovascular de acuerdo a cuartiles de concentración de homoarginina en suero en la línea base en participantes en el estudio 4D |         |                           |        |                           |        |
|--|---------|---------------------------|--------|---------------------------|--------|
| Modelo   | Cuartil | Mortalidad por toda causa |        | Mortalidad cardiovascular |        |
|  |         | HR (95% CI)               | P      | HR (95% CI)               | P      |
| Crudo  | 1       | 2.1 (1.7-2.7)             | <0.001 | 2.2 (1.5-3.0)             | <0.001 |
|  | 2       | 1.9 (1.5-2.4)             | <0.001 | 2.2 (1.5-3.0)             | <0.001 |

Tabla 2: Relaciones de peligro (intervalos de confianza 95%) para mortalidad por toda causa y cardiovascular de acuerdo a cuartiles de concentración de homocisteína en suero en la línea base en participantes en el estudio 4D

| Modelo  | Cuartil | Mortalidad por toda causa |        | Mortalidad cardiovascular |        |
|---|---------|---------------------------|--------|---------------------------|--------|
|   |         | HR (95% CI)               | P      | HR (95% CI)               | P      |
|   | 3       | 1.3 (1.0-1.6)             | 0.07   | 1.4 (1.0-2.1)             | 0.05   |
|   | 4       | 1                         |        | 1                         |        |
| Ajustado <sup>1</sup>   | 1       | 2.0 (1.6-2.6)             | <0.001 | 2.0 (1.4-2.9)             | <0.001 |
|   | 2       | 1.8 (1.4-2.3)             | <0.001 | 2.1 (1.5-3.0)             | <0.001 |
|   | 3       | 1.2 (1.0-1.6)             | 0.11   | 1.4 (1.0-2.0)             | 0.08   |
|   | 4       | 1                         |        | 1                         |        |
| Ajustado <sup>2</sup>   | 1       | 1.7 (1.4-2.2)             | <0.001 | 1.8 (1.2-2.5)             | 0.002  |
|   | 2       | 1.7 (1.4-2.2)             | <0.001 | 2.0 (1.4-2.8)             | <0.001 |
|   | 3       | 1.2 (1.0-1.6)             | 0.14   | 1.4 (1.0-2.0)             | 0.08   |
|   | 4       | 1                         |        | 1                         |        |
| Ajustado <sup>1</sup> : los ajustes fueron por edad y sexo  |         |                           |        |                           |        |
| Ajustado <sup>2</sup> : los ajustes fueron por edad, sexo, presión sanguínea sistólica, falla cardíaca congestiva, estado de fumador, índice de masa corporal, colesterol LDL, hemoglobina, albúmina, hemoglobina glicosilada A1c   |         |                           |        |                           |        |
| *La mortalidad cardiovascular incluyó muerte cardíaca repentina, infarto fatal del miocardio, muerte debida a falla cardíaca, muerte después de intervención para tratar enfermedad arterial coronaria, ataque cerebral fatal y otras muertes debidas a causas cardíacas. |         |                           |        |                           |        |

Tabla 3: resultados del estudio 4D

|  | Mortalidad por toda causa | Mortalidad cardiovascular* |
|--|---------------------------|----------------------------|
| Eventos                                | 617                       | 310                        |
| Persona -años                          | 3558                      | 3558                       |
| Grado de incidencia/ 100 personas-años | 17.3                      | 8.7                        |
| 1er cuartil (< 0.87 mM)                | 23.4                      | 11.2                       |
| 2º cuartil (0.87-1.10 mM)              | 20.8                      | 11.4                       |

| Tabla 3: resultados del estudio 4D   |                           |                            |
|--|---------------------------|----------------------------|
|  | Mortalidad por toda causa | Mortalidad cardiovascular* |
| 3er cuartil (1.10 - 1.40 mM)   | 14.3                      | 7.5                        |
| 4º cuartil (> 1.40 mM)   | 11.4                      | 5.3                        |
| * La mortalidad cardiovascular incluyó muerte cardíaca repentina, infarto fatal del miocardio, muerte debida a falla cardíaca congestiva, muerte después de intervención para tratar enfermedad arterial coronaria, ataque cerebral fatal y otras muertes debidas a causas cardíacas |                           |                            |

Resultados

5 En la tabla 1 se muestran las características de línea base de los pacientes. Los niveles de homoarginina fueron más altos en los masculinos que en los femeninos, y fueron inferiores con el incremento de la edad. Bajos niveles de

10 homoarginina estuvieron correlacionados con baja albúmina, bajo índice de masa corporal, bajo colesterol LDL, presencia de falla cardíaca congestiva, mayor duración de diabetes mellitus tipo 2. Durante un seguimiento de mediana de 4 años, 617 pacientes murieron, de los cuales 310 murieron por causas cardiovasculares (ver tabla 3). Bajos niveles de homoarginina estuvieron fuertemente asociados con incremento en la mortalidad: los riesgos relativos de muerte cardiovascular y muerte por toda causa fueron más del doble (+120 %) por unidad de descenso en homoarginina transformada a logaritmo ( $HR_{CV \text{ muerte}} 2.2, 95\% \text{ CI}, 1.7-3.0; HR_{\text{muerte}} 2.2, 95\% \text{ CI}, 1.8-2.7$ ). De acuerdo con ello, en pacientes en el más bajo cuartil de homoarginina (<0.87 mmol/L) la mortalidad fue >2 veces más alta que en pacientes en el cuartil más alto (>1.4 mmol/L). Tales fuertes asociaciones persistieron después de ajustes multivariable (Tabla 2).



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar el riesgo de mortalidad en un paciente, que incluye los pasos de
  - a) determinación de la cantidad de homoarginina o sus precursores metabólicos en una muestra del paciente; y
  - b) comparación de la cantidad determinada con una cantidad de referencia, con lo cual se determina el riesgo de mortalidad en el paciente.
- 5
2. El método de la reivindicación 1, que incluye además los pasos de
  - c) determinación de la cantidad de los siguientes marcadores seleccionados de entre el grupo consistente en: Troponina (TnT) cardíaca, pro-péptido terminal en N de péptido (NT-proBNP) natriurético cerebral, péptido (BNP) natriurético cerebral, péptido (ANP) natriurético atrial, proteína (CRP) reactiva en C, suero humano A amiloide (SAA), Neopterin, dimetilarginina asimétrica (ADMA), y/o dimetilarginina (SDMA) simétrica, en dicha muestra simultáneamente con la cantidad de homoarginina o sus precursores metabólicos en la etapa a),
  - d) comparación de la cantidad del marcador determinado en la etapa c) con una cantidad de referencia, donde se determina el riesgo de mortalidad en el paciente.
- 10
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la muerte es causada por un ataque cerebral o una causa cardíaca.
- 15
4. El método de la reivindicación 3, en donde la causa cardíaca es muerte cardíaca repentina, infarto del miocardio, falla cardíaca o muerte después de intervención para tratar enfermedad coronaria arterial.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el paciente sufre de una condición que incrementa el riesgo de resultados cardiovasculares adversos.
- 20
6. El método de la reivindicación 5, en donde el paciente sufre de síndrome coronario agudo o de diabetes tipo 2 y falla renal que requiere hemodiálisis.
7. Un método para decidir si un paciente tiene un riesgo de mortalidad y necesita la administración de homoarginina, que incluye las etapas de
  - a) determinación de la cantidad de homoarginina o su precursor metabólico en una muestra del paciente;
  - b) comparación de la cantidad determinada con una cantidad de referencia, con lo cual se decide si el paciente requiere la administración de homoarginina.
- 25
8. Uso de homoarginina o su precursor metabólico para la determinación del riesgo de mortalidad en un paciente.