

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 226**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2012** **E 12152603 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015** **EP 2620773**

54 Título: **Método para la diferenciación de la insuficiencia cardiaca anterógrada y retrógrada**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.06.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HESS, GEORG;**  
**GALLUSER, ANDREAS;**  
**HORSCH, ANDREA;**  
**KLEMT, VOLKER y**  
**ZDUNEK, DIETMAR**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 538 226 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

Método para la diferenciación de la insuficiencia cardiaca anterógrada y retrógrada

- 5 La presente invención se refiere al campo del diagnóstico de laboratorio. Concretamente, se dan a conocer métodos para diferenciar en un paciente de insuficiencia cardiaca: (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, basados en los marcadores biológicos proPS-B y/o NT-proPNO.
- 10 La insuficiencia cardiaca (IC) representa un problema importante de salud pública en los países industrializados y aparentemente es la única condición cardiovascular común cuya prevalencia e incidencia siguen aumentando. En los Estados Unidos, la insuficiencia cardiaca es responsable de prácticamente 1 millones de admisiones hospitalarias y 40.000 muertes cada año. Las manifestaciones principales de la insuficiencia cardiaca son la disnea y la fatiga. La insuficiencia cardiaca aparece secundariamente a anomalías de la estructura y/o funcionamiento del corazón que alteran la capacidad del ventrículo izquierdo de llenarse o eyectar sangre. Ahora se reconoce que dicha enfermedad es un síndrome sistémico caracterizado por procesos metabólicos e inflamatorios neurohormonales maladaptativos. El reconocimiento de estas rutas ha llevado a evaluar algunos de sus componentes como marcadores biológicos tanto en la insuficiencia cardiaca crónica como en la insuficiencia cardiaca aguda descompensada.
- 15 Por ejemplo, Lüers *et al.* (Med. Klin. 2010, 105, 611) han utilizado los marcadores biológicos PS-B, SP-D y NT-proPNO para el diagnóstico diferencial de la disnea aguda. Se ha encontrado en este estudio que los niveles plasmáticos de NT-proPNO eran significativamente más altos en los pacientes con un origen cardiaco de la disnea aguda en comparación con los pacientes con un diagnóstico no cardiaco. Los niveles de SP-D eran máximos en los pacientes con un origen cardiaco de la disnea aguda. Sin embargo, tras realizar el análisis de regresión, dicho resultado aparentemente resultaba de menor importancia para el diagnóstico diferencial de disnea aguda, comparado con NT-proPNO. Además, se encontró que los niveles plasmáticos de PS-B no eran diferentes en los cuatro subgrupos analizados en este estudio.
- 20 Magri *et al.*, (Circ. Heart Fail. 2:175, 2009) han descrito en otro estudio que los valores circulantes de PS-B se encontraban incrementados en los pacientes con insuficiencia cardiaca. Los pacientes que sufrían de la insuficiencia cardiaca más grave presentaban los niveles más altos de SPB. Además, se ha considerado que PS-B en el plasma es un marcador biológico del daño a la barrera alveolo-capilar. También se ha informado de que un incremento de PS-B en pacientes con insuficiencia cardiaca se debía a un incremento agudo aunque transitorio de la presión microvascular (Pmv) pulmonar, tal como la observada, por ejemplo, durante un edema cardiogénico agudo. El incremento de la presión microvascular pulmonar resultó en una alteración mecánica de la barrera alveolo-capilar con una fuga incrementada de PS-B hacia el torrente sanguíneo.
- 25 Guazzi *et al.* (Therapy 2:641-2005) han informado de que los niveles elevados de PS-B se asocian a edema pulmonar cardiogénico.
- 30 El documento nº WO 2004/077056 describe un método de diagnóstico de la insuficiencia cardiaca utilizando los marcadores biológicos NT-proPNO y PS-B o proPS-B y un método correspondiente de seguimiento del desarrollo de la insuficiencia cardiaca. Las proteínas surfactantes, en particular la proteína surfactante B (PS-B) que mantiene la salud alveolar, se ha encontrado que está asociada a la insuficiencia cardiaca y a las clases de la NYHA. Además, se ha encontrado que los niveles de PS-B se encuentran elevados en los pacientes de insuficiencia cardiaca crónica. Dichos niveles cayeron tras el tratamiento con un diurético intravenoso.
- 35 Para proporcionar un tratamiento eficaz a los pacientes de insuficiencia cardiaca, resulta necesaria una diferenciación rápida y exacta de las causas y consecuencias de la misma. Sin embargo, dichos medios y métodos adecuados todavía no se encuentran disponibles debido a la dificultad para identificar los mecanismos principales subyacentes.
- 40 De acuerdo con lo anterior, el problema técnico subyacente a la presente invención puede considerarse la provisión de medios y métodos para satisfacer las necesidades anteriormente indicadas. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y posteriormente en la presente memoria.
- 45 La presente invención proporciona métodos de diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardiaca anterógrada y/o la insuficiencia cardiaca retrógrada como consecuencia de la insuficiencia cardiaca, basados en la determinación de los marcadores biológicos proPS-B (y/o el fragmento C de proPS-B) y NT-proPNO. De esta manera, dichos métodos proporcionan una guía terapéutica mejorada para los médicos que tratan los pacientes que sufren de insuficiencia cardiaca. Además, la invención se refiere a métodos de seguimiento que permiten cribar para las modulaciones de los niveles sanguíneos de proPS-B (y/o del fragmento C de proPS-B) y NT-proPNO en un paciente de insuficiencia cardiaca. De esta manera, los métodos de seguimiento de la invención pueden utilizarse para realizar un seguimiento de la insuficiencia cardiaca y/o de la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en un paciente de insuficiencia cardiaca, por ejemplo durante el tratamiento.

Más concretamente, la presente invención se refiere a un método para diferenciar en un paciente de insuficiencia cardiaca entre (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, comprendiendo el método las etapas de:

- a) determinar en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca la proporción entre la cantidad de proPS-B y la cantidad de NT-proPNO, y
- b) comparar la proporción entre la cantidad de proPS-B y la cantidad de NT-proPNO determinada en la etapa a) con por lo menos una proporción de referencia de proPS-B y NT-proPNO,

diferenciando de esta manera entre: (i) insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.

En una realización preferente, el método para diferenciar en un paciente de insuficiencia cardiaca entre (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, comprende las etapas de:

- a) determinar en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca la proporción entre la proPS-B y la cantidad de NT-proPNO,
- b) calcular la proporción entre la cantidad de proPS-B y la cantidad de NT-proPNO, y
- c) comparar la proporción entre proPS-B y NT-proPNO determinada en la etapa b) con por lo menos una proporción de referencia de proPS-B y NT-proPNO,

diferenciando de esta manera entre: (i) insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.

En otra realización preferente de dicho método de la invención, la proporción o proporciones de referencia se derivan (i) de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo y/o (iii) de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. Resultará evidente para el experto en la materia que la proporción o proporciones anteriormente indicadas no sólo pueden derivarse de un único paciente de insuficiencia cardiaca de referencia sino también de un grupo o cohorte de pacientes de insuficiencia cardiaca de referencia, tal como se indica en otros sitios de la presente memoria.

Tal como se demuestra en los Ejemplos, posteriormente, se ha incluido en el presente estudio un total de 92 pacientes con una mediana de edad de 72 años con insuficiencia cardiaca patente. Entre estos pacientes, se analizaron en una muestra de suero las cantidades de NT-proPNO como marcador biológico de la función cardiaca y proPS-B como marcador biológico del daño pulmonar. Tal como se muestra en la figura 1 y en el Ejemplo 3, las cantidades de NT-proPNO no se correlacionaban con las cantidades de proPS-B, confirmando que ambos marcadores biológicos proporcionan información diferente. Los niveles de proPS-B se correlacionaban bastante bien con los niveles de fragmento C de proPS-B, excepto en unos cuantos pacientes que presentaban niveles elevados de proPS-B y de fragmento C de proPS-B, tal como se muestra en la figura 2. En los pacientes con descompensación cardiaca, las cantidades de proPS-B tendían a incrementarse con la presión arterial pulmonar sistólica, que se considera un signo de insuficiencia cardiaca retrógrada. Estos resultados pueden derivarse de la figura 3.

Aunque se ha asociado NT-proPNO y proPS-B a la insuficiencia cardiaca y el estado según la NYHA en estudios anteriores, no se ha proporcionado información hasta el momento respecto a las consecuencias o manifestaciones preferentes de la insuficiencia cardiaca. Mediante la determinación de las cantidades de proPS-B y NT-proPNO en muestras de pacientes de insuficiencia cardiaca, el cálculo de las proporciones de proPS-B y NT-proPNO y la comparación de dichos proporciones con proporciones de referencia de proPS-B y NT-proPNO, respectivamente, los presentes inventores han encontrado ventajosamente que resulta posible diferenciar entre: (i) insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en pacientes de insuficiencia cardiaca. Estos resultados se muestran en los Ejemplos siguientes. Inesperadamente, se ha encontrado además que el análisis de las cantidades de proPS-B y fragmento C de proPS-B en muestras de sangre (suero) de pacientes de insuficiencia cardiaca proporcionan información en gran medida idéntica, indicando que los datos obtenidos para dichos marcadores es comparable, tal como puede derivarse de la figura 2. Por lo tanto, el fragmento C de proPS-B puede utilizarse en lugar de proPS-B o además de proPS-B en los medios y métodos de la invención. Además, se ha encontrado en la presente invención que pueden detectarse niveles incrementados de NT-proPNO en dichas muestras de pacientes

de insuficiencia cardiaca que sufren de insuficiencia cardiaca anterógrada, aunque también en pacientes que presentan insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. Los niveles de NT-proPNO en pacientes que presentan insuficiencia cardiaca anterógrada son comparables a los de los pacientes con insuficiencia cardiaca de gasto bajo, mientras que los niveles de NT-proPNO en pacientes que presentan insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo son comparables a los de pacientes con insuficiencia cardiaca de gasto alto. La insuficiencia cardiaca de gasto alto puede convertirse en insuficiencia cardiaca de gasto bajo (Kress *et al.*, Harrison Principles of Internal Medicine, 17a edición, capítulo 261, página 1673 ff., figura 261-2). La insuficiencia cardiaca anterógrada se asocia a la incapacidad del corazón de bombear sangre a una tasa suficiente para satisfacer las demandas de oxígeno del cuerpo. En esta condición, el problema principalmente es suministrar una perfusión arterial adecuada frente a la precarga cardiaca. De acuerdo con lo anterior, puede encontrarse sólo un gasto bajo en la aorta en pacientes con insuficiencia cardiaca anterógrada. Como resultado inesperado adicional, la insuficiencia retrógrada del ventrículo izquierdo se asocia a un nivel incrementado de proPS-B, con toda probabilidad el resultado de la congestión de la vasculatura pulmonar, que conduce a la fuga de proPS-B hidrofílico de las células alveolares de tipo II hacia la circulación. En contraste, no se produce o hay menos congestión de la vasculatura pulmonar reflejada en niveles no elevados de proPS-B en los pacientes que sufren de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. De esta manera, un nivel incrementado de proPS-B es un marcador de la insuficiencia retrógrada del ventrículo izquierdo.

Los datos presentados en la presente memoria sugieren además que existe una correlación en relación al nivel cuantitativo de proPS-B (y/o el fragmento C de proPS-B) que se observa en la muestra de sangre de un paciente que sufre de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo y el grado de afectación del pulmón. Concretamente, cuanto más alto sea el nivel de dicho surfactante, aparentemente más severa será la afectación y daño de las células alveolares de tipo II del pulmón causados por la presión venosa incrementada tras la poscarga cardiaca.

A la luz de estos resultados, los métodos de la invención proporcionan un régimen de tratamiento más preciso de los pacientes de insuficiencia cardiaca que los descritos en la técnica anterior. Mediante el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardiaca anterógrada y/o la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en un paciente que sufre de insuficiencia cardiaca, se proporciona una guía terapéutica eficiente para el médico responsable al aclarar cuáles son las consecuencias de la insuficiencia cardiaca. Por ejemplo, la insuficiencia cardiaca anterógrada se asocia en general a un gasto bajo del ventrículo izquierdo e isquemia periférica. En este caso, puede estar indicada la sustitución de volumen para evitar el síndrome cardiorrenal, mientras que los diuréticos del asa podrían no resultar útiles desde un punto de vista terapéutico. Además, algunos inotrópicos tales como la dobutamina pueden resultar útiles en este contexto. Los dispositivos ASSIST también pueden resultar útiles para prestar soporte al gasto en casos que no responden a la farmacoterapia. En contraste, en el caso de congestión pulmonar, tal como es el caso de la insuficiencia cardiaca retrógrada, la reducción del volumen intravasal es la terapia de elección. Lo anterior incluye la utilización de diuréticos del asa o vasodilatadores, tales como nitratos. Al permitir una diferenciación rápida y exacta de las causas de la insuficiencia cardiaca, los medios y métodos de la invención proporcionan no sólo una terapia mejorada de los pacientes de insuficiencia cardiaca sino también un tratamiento de alta relación costo-eficacia de dichos pacientes.

El término "diferenciación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que diferencia entre (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo como la consecuencia de una insuficiencia cardiaca aparente en un sujeto. El término diferenciar tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente incluye diagnosticar diferencialmente cada una de las condiciones anteriormente indicadas. Diferenciar tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a evaluar la probabilidad en la que un sujeto sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. Tal como entenderá el experto en la materia, dicha evaluación habitualmente no se pretende que sea correcta para 100% de los sujetos que deben ser diagnosticados. Sin embargo, el término requiere que pueda diagnosticarse que una parte estadísticamente significativa de los sujetos sufra dicha enfermedad (por ejemplo una cohorte en un estudio de cohorte). Si una parte es estadísticamente significativa o no puede ser determinado sin ningún otro procedimiento por el experto en la materia utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Pueden encontrarse los detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes son: por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99%. Los valores de p preferentemente son 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Todavía más preferentemente, "diferenciar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a distinguir entre: (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada e (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, como consecuencia de una insuficiencia cardiaca aparente en un sujeto.

El término "diagnosticar" según la presente invención incluye detectar, seguir, confirmar, subclasificar y predecir para la enfermedad relevante indicada en la presente memoria, los síntomas o los riesgos de la misma. El término "seguimiento" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a mantener un registro de una enfermedad, o complicación, ya diagnosticada, por ejemplo para analizar la progresión o las consecuencias de la enfermedad o la influencia de un tratamiento particular sobre la progresión de la enfermedad o complicación. Por ejemplo, dicho

seguimiento comprende el cribado para la modulación de los niveles sanguíneos de proPS-B y/o el fragmento C de proSP-B y/o NT-proPNO en un paciente de insuficiencia cardiaca con el fin de detectar y/o seguir la insuficiencia cardiaca anterógrada y/o la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. Con este fin, puede determinarse la cantidad o proporción de dichos marcadores biológicos en diversos puntos temporales (PT o T) PT0/T0, PT1/T1, PT2/T2, PT3/T3, etc., por ejemplo durante la terapia de la insuficiencia cardiaca. El periodo de tiempo entre los puntos temporales indicados preferentemente es de aproximadamente 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, seis semanas, 2 meses, 3 meses o incluso más tiempo. Resulta evidente para el experto en la materia que la cantidad o la proporción de dichos marcadores biológicos se determina no sólo en dos, tres o cuatro puntos temporales, sino también en cinco, seis, siete o incluso más puntos temporales. Además, el periodo de tiempo entre dichos puntos temporales puede ser constante o puede variar. Por ejemplo, el periodo de tiempo entre PT0/T0, PT1/T1, PT2/T2, PT3/T3, etc. puede ser en todos los casos de 2 semanas. O el periodo de tiempo entre PT1/T1 y PT2/T2 puede ser, por ejemplo, de aproximadamente unas cuantas horas (por ejemplo aproximadamente 3, 4, 5, 6, 12 o 24 horas) y el periodo de tiempo entre PT2/T2 y PT3/T3 puede ser de aproximadamente 2, 3, 4 o 8 semanas. Dicha modulación de los niveles sanguíneos de proPS-B y/o del fragmento C de proPS-B y/o de NT-proPNO puede ser, por ejemplo, un incremento o una reducción de la cantidad o la proporción de los marcadores biológicos mencionados. Preferentemente, el incremento o la reducción es una modulación de por lo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o incluso más, en comparación con la cantidad o la proporción de dichos marcadores biológicos determinada en un punto temporal anterior. Por ejemplo, un incremento (estadísticamente significativo) de proPS-B y/o del fragmento C de proPS-B puede ser indicativo de insuficiencia cardiaca retrógrada. En el caso de que la cantidad de proPS-B y/o del fragmento C de proPS-B permanezca esencialmente estable, se considerará que no hay evidencia de insuficiencia cardiaca retrógrada. Un incremento significativo/fuerte de NT-proPNO es más bien indicativo de un cambio de la función cardiaca; ver, por ejemplo, los Ejemplos 4 y 5. La confirmación se refiere a la corroboración o respaldo de un diagnóstico ya realizado utilizando otros indicadores o marcadores. La subclasificación se refiere a definir adicionalmente un diagnóstico según diferentes subclases de la enfermedad diagnosticada, por ejemplo definir según formas leves o graves de la enfermedad. La predicción se refiere al pronóstico de una enfermedad o complicación antes de que otros síntomas o marcadores se pongan de manifiesto o se hayan alterado significativamente.

El término "sujeto" o "sujeto de ensayo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y más preferentemente, seres humanos. Sin embargo, se encuentra contemplado en la presente invención que el sujeto muestre, preferentemente, los síntomas clínicos aparentes de una insuficiencia cardiaca bien conocida de la técnica. Preferentemente, el sujeto o sujeto de ensayo es un paciente de insuficiencia cardiaca humano. Las manifestaciones principales de la insuficiencia cardiaca son la disnea y la fatiga. La insuficiencia cardiaca también puede estar asociada a una fracción de eyección anormal según evaluación ecocardiográfica, o puede presentar una fracción de eyección conservada (Hess y Carroll, Braun-Wald's heart disease, 9a edición, capítulo 23, 561 y ss.). En una realización preferente de los medios y métodos de la invención, el sujeto o sujetos (así como el sujeto o sujetos de los que se deriva la cantidad de referencia o la proporción de referencia) a los que se hace referencia en la presente memoria no presentan una función renal alterada. El modo de evaluar si un sujeto muestra una función renal alterada es bien conocido de la técnica. Los trastornos renales pueden ser diagnosticados mediante cualesquiera medios conocidos y considerados apropiados. Particularmente, la función renal puede evaluarse mediante la tasa de filtración glomerular (TFG). Por ejemplo, la TFG puede calcularse utilizando la fórmula de Cockcroft-Gault o la fórmula MDRD (Levey, Annals of Internal Medicine, 461-470, 1999). La TFG es el volumen de líquido filtrado por los capilares glomerulares renales en su paso a la cápsula de Bowman por unidad de tiempo. Clínicamente lo anterior es utilizado con frecuencia para determinar la función renal. La TFG fue estimada originalmente (la TFG no puede determinarse nunca; todos los cálculos derivados de fórmulas tales como la fórmula de Cockcroft-Gault de la fórmula MDRD proporcionan únicamente estimaciones y no la TFG "real") mediante la inyección de inulina en el plasma. Debido a que la inulina no es reabsorbida por el riñón tras la filtración glomerular, su tasa de excreción es directamente proporcional a la tasa de filtración del agua y los solutos a través del filtro glomerular. Sin embargo, en la práctica clínica para medir la TFG se utiliza la eliminación de la creatinina. La creatinina es una molécula endógena, sintetizada en el cuerpo, que es libremente filtrada por el glomérulo (aunque también es secretada por los túbulos renales en cantidades muy reducidas). Por lo tanto, la eliminación de la creatinina (ECr) es una aproximación ajustada de la TFG. La TFG típicamente se expresa en mililitros por minuto (ml/min). El intervalo normal de la TFG para varones es de entre 97 y 137 ml/min.; el intervalo normal de TFG para las mujeres es de entre 88 y 128 ml/min. De esta manera, se encuentra particularmente contemplado que la TFG de un sujeto que no muestre una función renal alterada se encuentre comprendido dentro de dichos intervalos. Además, dicho sujeto preferentemente presenta un nivel de creatinina en sangre (en particular un nivel de creatinina en el suero) inferior a 0,9 mg/dl, más preferentemente inferior a 1,1 mg/dl y todavía más preferentemente inferior a 1,3 mg/dl.

Preferentemente, los pacientes humanos que presentan insuficiencia renal o insuficiencia cardiaca del lado derecho están descartados o están excluidos de los medios y métodos de la invención. En otra realización preferente de los medios y métodos de la invención, el sujeto tal como se utiliza en la presente memoria no sufre de una enfermedad o trastorno pulmonar primario o secundario. Preferentemente el sujeto no sufre de trastornos pulmonares que son conocidos por el experto en la materia y que se describen en, por ejemplo, Harrison Principles of Internal Medicine, capítulos 245 a 260, páginas 1583 y ss. (17a edición). Concretamente, entre los trastornos pulmonares se incluyen

la neumonitis por hipersensibilidad, los trastornos pulmonares ambientales tales como la asbestosis, la silicosis, la alveolitis alérgica ("pulmón de granjero"), los trastornos pulmonares causados por agentes químicos tóxicos, tales como el humo del tabaco, el formaldehído y el ozono, la neumonía, la fibrosis quística, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el asma bronquial, la bronquiectasia y los trastornos pulmonares intersticiales, tales como el lupus eritematoso sistémico, la granulomatosis de Wegener y el síndrome de Goodpasture y el SDRA (síndrome del distrés respiratorio agudo) o sus precursores, frecuentemente asociados a infecciones sistémicas, traumatismos o ventilación.

"Determinar" la cantidad de un polipéptido al que se hace referencia en la presente memoria, por ejemplo un péptido natriurético tal como NT-proPNO y/o una proteína surfactante pulmonar tal como proPS-B o el fragmento C de proPS-B, se refiere a medir la cantidad o la concentración de dicho polipéptido, preferentemente de manera semicuantitativa o cuantitativa. La medición puede llevarse a cabo directa o indirectamente. La medición directa se refiere a medir la cantidad o la concentración del polipéptido basándose en una señal que se obtiene del polipéptido mismo y la intensidad de la cual se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presentes en la muestra. Dicha señal, en ocasiones denominada en la presente memoria señal de intensidad, puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química concreta del polipéptido. La medición indirecta incluye medir una señal obtenida de un componente secundario, es decir, un componente que no es el polipéptido mismo, o un sistema de lectura biológico, por ejemplo respuestas celulares medibles, ligandos, marcapos o productos de reacción enzimática.

Según la presente invención, determinar la cantidad del polipéptido, es decir, el marcador biológico tal como se denomina en la presente memoria puede conseguirse mediante todos los medios conocidos de determinación de la cantidad de un polipéptido o péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos de inmunoensayo y métodos que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de tipo sándwich, competitivos u otros formatos de ensayo. Dichos ensayos desarrollarán una señal que es indicativa de la presencia o ausencia del polipéptido. Además, la intensidad de la señal puede, preferentemente, correlacionarse directa o indirectamente (por ejemplo es inversamente proporcional) a la cantidad del polipéptido presente en una muestra. Los métodos adecuados adicionales comprenden medir una propiedad física o química específica del polipéptido, tal como su masa molecular precisa o el espectro de RMN. Dichos métodos comprenden, preferentemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos cromatográficos. Además, entre los métodos se incluyen métodos basados en ELISA de microplaca, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (disponibles en, por ejemplo, analizadores Elecsys<sup>TM</sup>), EUC (un ensayo enzimático de unión del cobalto, disponible en, por ejemplo, analizadores Roche-Hitachi<sup>TM</sup>) y ensayos de aglutinación en látex (disponible en, por ejemplo, los analizadores Roche-Hitachi<sup>TM</sup>).

También se encuentra contemplado que la determinación de la cantidad de un polipéptido comprenda las etapas de: (a) poner en contacto una célula capaz de inducir una respuesta celular la intensidad de la cual es indicativa de la cantidad del polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, y (b) medir la respuesta celular. Para medir respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade, preferentemente, a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión medible de un gen informador o la secreción de una sustancia, por ejemplo un péptido, polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia genera una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad del polipéptido.

También preferentemente, determinar la cantidad del polipéptido comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica obtenible de un polipéptido natriurético, tal como NT-proPNO, o una proteína surfactante pulmonar tal como proPS-B o el fragmento C de proPS-B, en la muestra.

Tal como se ha indicado anteriormente, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada a una m/z variable específica para el polipéptido observada en los espectros de masas o un espectro de RMN específico para el polipéptido.

Además, la determinación de la cantidad de un polipéptido preferentemente comprende las etapas de: (a) poner en contacto el polipéptido o péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, y (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una señal de intensidad. La unión según los métodos de la presente invención incluye la unión tanto covalente como no covalente. Un ligando según los métodos de la presente invención puede ser cualquier compuesto, por ejemplo un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña, de unión a los polipéptidos descritos en la presente memoria. Entre los ligandos preferentes se incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos, tales como receptores para el polipéptido y fragmentos del mismo que comprenden los dominios de unión para los péptidos, y aptámeros, por ejemplo ácidos nucleicos o aptámeros peptídicos. Los métodos para preparar dichos ligandos son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, la identificación y la producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también es ofrecida por proveedores comerciales. Al experto en la materia resultarán familiares los métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos de afinidad o especificidad más elevada. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. A continuación, dichos derivados pueden someterse a ensayo para la unión según los procedimientos de cribado conocidos de la técnica, por ejemplo la expresión fágica. Entre los anticuerpos

a los que se hace referencia en la presente memoria se incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como los fragmentos Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub> que son capaces de unirse a antígenos o haptenos. La presente invención también contempla la utilización de anticuerpos híbridos humanizados en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que muestre una especificidad de antígeno deseado se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donantes habitualmente incluyen por lo menos los residuos aminoácidos de unión a antígeno del donante aunque también pueden comprender otros residuos aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos pueden prepararse mediante varios métodos bien conocidos de la técnica. Preferentemente el ligando o agente se une específicamente al polipéptido tal como se denomina en la presente memoria. La unión específica según la presente invención se refiere a que el ligando o agente no debe unirse sustancialmente ("reaccionar cruzadamente") con otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra que debe analizarse. Preferentemente, el polipéptido unido específicamente debe unirse con una afinidad por lo menos 3 veces más alta, más preferentemente por lo menos 10 veces más alta y todavía más preferentemente por lo menos 50 veces más alta, que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, en caso de que todavía pueda distinguirse y medirse inequívocamente, por ejemplo según su tamaño en una transferencia western, o por su abundancia relativamente más alta en la muestra. La unión del ligando puede medirse mediante cualquier método conocido de la técnica. Preferentemente, dicho método es semicuantitativo o cuantitativo.

Se describen los métodos adecuados a continuación. En primer lugar, la unión de un ligando puede medirse directamente, por ejemplo mediante RMN, espectrometría de masas o resonancia de plasmón superficial. En segundo lugar, en el caso de que el ligando también sirva de sustrato de una actividad enzimática del polipéptido de interés, puede medirse un producto de la reacción enzimática (por ejemplo la cantidad de una proteasa puede medirse mediante la determinación de la cantidad de sustrato cortado, por ejemplo en una transferencia western). Alternativamente, el ligando puede mostrar propiedades enzimáticas él mismo y el complejo de ligando/polipéptido o el ligando unido al polipéptido, respectivamente, pueden ponerse en contacto con un sustrato adecuado, permitiendo la detección mediante la generación de una señal de intensidad. Para la medición de productos de reacción enzimática, preferentemente la cantidad de sustrato es saturante. El sustrato también puede marcarse con un marcaje detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca una cantidad de producto detectable, preferentemente medible. En lugar de medir la cantidad del producto, puede medirse el tiempo necesario para la aparición de una cantidad de producto dada (por ejemplo detectable). En tercer lugar, el ligando puede acoplarse covalentemente o no covalentemente con un marcaje, permitiendo la detección y la medición del ligando. El marcaje puede llevarse a cabo mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcaje directamente (covalente o no covalentemente) con el ligando. El marcaje indirecto implica la unión (covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con un marcaje adecuado y/o ser la diana (receptor) de un ligando terciario de unión al ligando secundario. Los ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior se utilizan con frecuencia para incrementar la señal. Entre los ligandos secundarios y de orden más alto adecuados se incluyen anticuerpos, anticuerpos secundarios, y el sistema de estreptavidina-biotina bien conocido (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también puede "etiquetarse" con una o más etiquetas conocidas de la técnica. Estas etiquetas pueden ser dianas para ligandos de orden más alto. Entre las etiquetas adecuadas se incluyen biotina, digoxigenina, etiqueta de His, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, etiqueta myc, hemaglutinina de virus de la influenza A (HA), proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un polipéptido la etiqueta preferentemente se encuentra en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Son marcajes adecuados cualesquiera marcajes detectables mediante un método de detección apropiado. Entre los marcajes típicos se incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridán, luminol, rutenio, marcajes enzimáticamente activos, marcajes radioactivos, marcajes magnéticos (por ejemplo "perlas magnéticas", incluyendo marcajes paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcajes fluorescentes. Entre los marcajes enzimáticamente activos se incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de los mismos. Entre los sustratos adecuados para la detección se incluyen diaminobencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP, (cloruro de nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como solución madre preparada, de Roche Diagnostics), CDP-Star<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences), ECF<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences). Una combinación de enzima-sustrato adecuado puede resultar en un producto de reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que puede medirse según métodos conocidos de la técnica (por ejemplo utilizando una película fotosensible o un sistema de cámaras adecuado). Respecto a la medición de la reacción enzimática, los criterios proporcionados anteriormente se aplican análogamente. Entre los marcajes fluorescentes típicos se incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo Texas, fluoresceína y los pigmentos Alexa (por ejemplo Alexa 568). Se encuentran disponibles marcajes fluorescentes adicionales, por ejemplo de Molecular Probes (Oregon). También se encuentra contemplada la utilización de puntos cuánticos a modo de marcajes fluorescentes. Entre los marcajes radioactivos típicos se incluyen <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y similares. Puede detectarse un marcaje radioactivo mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo una película fotosensible o una placa de fósforo fotoestimulable ("Phosphorimager"). Entre los métodos de medición adecuados según la presente invención se incluyen también la precipitación (particularmente la inmunoprecipitación), la electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), ensayos inmunológicos enzimáticos de tipo sándwich, inmunoensayos de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroinmunoensayos de lantánidos de disociación mejorada

(DELFIA), ensayo de centelleo de proximidad (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría incrementada por látex o nefelometría, o ensayos inmunológicos de fase sólida. Pueden utilizarse métodos adicionales conocidos de la técnica (tales como la electroforesis en gel, la electroforesis en gel 2D, la electroforesis en SDS-gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), transferencia western y espectrometría de masas), solos o en combinación con marcaje u otros métodos de detección tal como se indica en la presente memoria.

Además, determinar la cantidad de un polipéptido preferentemente comprende: (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el polipéptido tal como se especifica en otros sitios de la presente memoria con una muestra que comprende el polipéptido, y (b) medir la cantidad del polipéptido que se encuentra unida al soporte. El ligando, preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, preferentemente se encuentra presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para preparar soportes sólidos son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, entre otros, materiales de columna disponibles comercialmente, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, hojas, duracitos, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede unirse a muchos portadores diferentes. Entre los ejemplos de portadores bien conocidos se incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nilón, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas), agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, interacciones iónicas, hidrofóbicas, covalentes y similares. También se encuentra contemplado utilizar "matrices en suspensión" como matrices según la presente invención (Nolan J.P., Sklar L.A., Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. Trends Biotechnol. 20(1):9-12, 2002). En dichas matrices en suspensión, el portador, por ejemplo una microperla o microesfera, se encuentra presente en suspensión. La matriz consiste de diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que portan diferentes ligandos. Los métodos para producir dichas matrices, por ejemplo basadas en la química de fase sólida y los grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.744.305).

El término "cantidad" tal como se utiliza en la presente memoria comprende la cantidad absoluta de los polipéptidos a los que se hace referencia en la presente memoria, la cantidad relativa o la concentración de los polipéptidos a los que se hace referencia en la presente memoria, así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona con los mismos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de señal de intensidad de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas del polipéptido al que se hace referencia en la presente memoria mediante mediciones directas, por ejemplo valores de intensidad en los espectros de masas o espectros de RMN. Además, se encuentran comprendidos todos los valores o parámetros que se obtienen mediante mediciones indirectas especificadas en otros sitios de la presente descripción, por ejemplo niveles de expresión determinados en sistemas biológicos de lectura en respuesta a los polipéptidos a los que se hace referencia en la presente memoria o señales de intensidad obtenidos de ligandos unidos específicamente. Debe entenderse que los valores correlacionados con las cantidades o parámetros anteriormente indicados también pueden obtenerse mediante todas las operaciones matemáticas estándares.

La expresión "péptido natriurético" tal como se utiliza en la presente memoria comprende los péptidos de tipo péptido natriurético auricular (PNA) y de tipo péptido natriurético cerebral (PNC) y variantes de los mismos que presentan el mismo potencial diagnóstico (ver, por ejemplo, Bonow, Circulation 93: 1946-1950, 1996). Los péptidos de tipo PNA comprenden pre-proPNA, proPNA, NT-proPNA y PNA. Los péptidos de tipo PNC comprenden pre-proPNC, proPNC, NT-proPNC y PNC. El pre-propéptido (134 aminoácidos en el caso de preproPNC) comprende un péptido de señal corto que es escindido enzimáticamente para liberar el propéptido (108 aminoácidos en el caso de proPNC). El propéptido se corta adicionalmente en un propéptido N-terminal (NT-propéptido, 76 aminoácidos en el caso de NT-proPNC) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de PNC, 28 aminoácidos en el caso de PNA). PNA y PNC son las hormonas activas y presentan una semivida más corta que sus contrapartidas inactivas respectivas, NT-proPNA y NT-proPNC. El PNC es metabolizado en la sangre, mientras que NT-proPNC circula en la sangre en forma de una molécula intacta y como tal es eliminada renalmente. La semivida *in vivo* de NT-proPNC es 120 min. más larga que la de la PNC, que es de 20 min. (Smith, J. Endocrinol. 167: 239-46, 2000). La preanalítica es más robusta con NT-proPNC, permitiendo un fácil transporte de la muestra a un laboratorio central (Clin. Chem. Lab. Med. 42: 942-4, 2004). Pueden almacenarse las muestras de sangre a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o embarcarse sin pérdidas. En contraste, el almacenamiento de PNC durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C conduce a una pérdida de concentración de por lo menos 20% (Mueller loc. cit.; Wu, Clin. Chem. 50: 867-73, 2004). Por lo tanto, dependiendo del curso temporal o propiedades de interés, la medición de las formas activas o inactivas del péptido natriurético puede resultar ventajosa.

Los péptidos natriuréticos preferentes según la presente invención son NT-proPNC y variantes del mismo. Tal como se ha comentado brevemente anteriormente, el NT-proPNC humano, al que se hace referencia según la presente invención, es un polipéptido que comprende, preferentemente, 76 aminoácidos de longitud correspondiente a la parte N-terminal de la molécula de NT-proPNC humana. La estructura de la PNC y NT-proPNC humanas ya ha sido descrita en detalle en la técnica anterior, por ejemplo los documentos nº WO 02/089657, nº WO 02/083913 o Bonow,

*loc. cit.* Preferentemente, el NT-proPNC humano tal como se utiliza en la presente memoria es el NT-proPNC humano tal como se da a conocer en la patente EP nº 0 648 228 B1.

5 El NT-proPNC al que se hace referencia según la presente invención comprende además variantes alélicas y otras de dicha secuencia específica para el NT-proPNC humano comentado anteriormente. Concretamente se encuentran contempladas polipéptidos variantes que son, al nivel de aminoácidos, por lo menos 60% idénticos, más preferentemente por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idénticos al NT-proPNC humano, preferentemente respecto a la longitud completa del NT-proPNC humano. El grado de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos, en principio, puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos de la técnica. Preferentemente, el grado de identidad debe determinarse mediante la comparación entre dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la que el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (por ejemplo huecos o extremos protuberantes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se observa el residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el número por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias. Puede llevarse a cabo la alineación óptima de secuencias para la comparación mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman, *Add. APL. Math.* 2:482, 1981; mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para la comparación, preferentemente se utilizan GAP y BESTFIT para determinar la alineación óptima y, de esta manera, el grado de identidad. Preferentemente se utilizan los valores por defecto de 5,00 para el peso de hueco y de 0,30 para el peso de longitud de hueco. Son sustancialmente similares y también se encuentran contemplados los productos de degradación proteolítica que todavía se identifican por medios diagnósticos o mediante ligandos dirigidos contra el péptido de longitud completa respectivo. También se encuentran comprendidos polipéptidos variantes que presentan deleciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de NT-proPNC humano con la condición de que dichos polipéptidos presenten propiedades de NT-proPNC. Las propiedades de NT-proPNC a las que se hace referencia en la presente memoria son propiedades inmunológicas y/o biológicas. Preferentemente, las variantes de NT-proPNC presentan propiedades inmunológicas (es decir, composición de epitopos) comparables a las de NT-proPNC. De esta manera, las variantes pueden reconocerse mediante los medios o ligandos anteriormente mencionados utilizados para la determinación de la cantidad de péptidos natriuréticos. Las propiedades biológicas y/o inmunológicas de NT-proPNC pueden detectarse mediante el ensayo descrito en Karl *et al.* (*Karl, Scand. J. Clin. Invest.* 59:177-181, 1999) y Yeo *et al.* (Yeo, *Clinica Chimica Acta* 338:107-115, 2003). Entre las variantes también se incluyen los péptidos modificados post-traduccionalmente, tales como los péptidos glucosilados o miristilados. Además, una variante según la presente invención también es un péptido o polipéptido que ha sido modificado tras la recolección de la muestra, por ejemplo mediante la unión covalente o no covalente de un marcaje, particularmente un marcaje radioactivo o fluorescente, al péptido. Tal como se ha indicado anteriormente, puede utilizarse NT-proPNC y variantes del mismo para diagnosticar la insuficiencia cardiaca y para clasificar la gravedad de la insuficiencia cardiaca; ver, por ejemplo, el documento nº WO 2004/077056. Preferentemente, la cantidad de NT-proPNC en la muestra del paciente de insuficiencia cardiaca se determina en los métodos de la invención utilizando el ensayo ELISA de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia de Roche Elecsys proBNP II STAT (por sus siglas en inglés, tiempo de renovación corto) descrito en, por ejemplo, el Ejemplo 1.

50 Las proteínas surfactantes pulmonares son proteínas que bajo condiciones fisiológicas se encuentran principalmente en el surfactante pulmonar del sujeto. Los fosfolípidos surfactantes pulmonares son sintetizados por las células alveolares de tipo II y son almacenados en vesículas diferenciadas que se conocen como cuerpos lamelares. En respuesta a una diversidad de estímulo, en particular la distorsión física de las células de tipo II, el contenido de los cuerpos lamelares es liberado a la hipofase, en donde se hidratan formando una estructura de malla 3-D conocida como mielina tubular. La mielina tubular a su vez suministra la capa monomolecular en la interfaz gas/líquido que presentan la actividad biofísica. Los componentes de la capa monomolecular presentan una vida definida y son sustituidos constantemente. Se cree que los fosfolípidos disaturados reducen la tensión superficial a los valores muy bajos que se piensa que ocurren a volúmenes pulmonares bajos, mientras que el colesterol, el segundo lípido surfactante pulmonar más abundante, se cree que afecta a la tasa de adsorción y fluidez del material recién liberado. Hasta hoy se ha demostrado que cuatro proteínas, PS-A, -B, -C y -D, se encuentran asociadas exclusivamente al surfactante pulmonar de mamífero. Existe un consenso general en que las proteínas extremadamente hidrofóbicas PS-B y PS-C son componentes funcionales de la capa monomolecular, siendo PS-B esencial para la capacidad del surfactante de reducir la tensión superficial, mientras que la proteína más hidrofílica PS-A y PS-D, median principalmente en funciones de defensa del huésped.

65 Preferentemente la expresión "proteína surfactante pulmonar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a PS-B, más preferentemente a proPS-B y/o al fragmento C de proPS-B, que corresponde a los residuos aminoácidos

280 a 381 de PS-B, tal como se muestra en, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del número de acceso P07988.3. El péptido proPS-B es sintetizado en las células alveolares epiteliales de tipo II del pulmón en forma de un propéptido de 381 aminoácidos y experimenta cortes proteolíticos secuenciales tanto del extremo N-terminal como del extremo C-terminal y la glucosilación, rindiendo un péptido PS-B maduro de 79 aminoácidos. El término "proPS-B" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al propéptido hidrofílico de 381 aminoácidos, mientras que el término "PS-B" se refiere al péptido PS-B maduro hidrofóbico de 79 aminoácidos. Dichos términos preferentemente comprenden las proteínas humanas además de las variantes de las mismas, preferentemente variantes alélicas u homólogos, parálogos u ortólogos específicos de secuencia. Las proteínas surfactantes humanas han sido bien caracterizadas en la técnica anterior y se dan a conocer en, por ejemplo Hawgood, Am. J. Physiol. -Lung Cellular and Molecular Physiology, vol. 257, nº 2:13-L22, 1989 (para todas las proteínas surfactantes), Takahashi, Curr. Pharm. Des. 12(5):589-598, 2006 (para PS-A y PS-D) y Kurutz, Biochemistry 41(30):9627-9636, 2002; Guttentag, Am. J. Physiol. -Lung Cellular and Molecular Physiology, vol. 275, nº 3:L559-L566, 1998 (para PS-B). Concretamente, también se encuentran contempladas variantes de proteínas surfactantes pulmonares que al nivel de los aminoácidos son por lo menos 60% idénticas, más preferentemente por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% idénticas a las proteínas surfactantes pulmonares humanas, preferentemente PS-B, más preferentemente a proPS-B y/o el fragmento C de proPS-B. Resulta particularmente preferente que la identidad de secuencia sea a lo largo de la longitud completa de dichas proteínas o fragmentos. Son sustancialmente similares y también se encuentran contemplados los productos de degradación proteolítica que todavía se identifican por medios diagnósticos o mediante ligandos dirigidos contra el péptido de longitud completa respectivo. También se encuentran comprendidos polipéptidos variantes que presentan deleciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína surfactante pulmonar humana con la condición de que dichos polipéptidos presenten propiedades de proteína surfactante pulmonar. Las propiedades de las proteínas surfactantes pulmonares a las que se hace referencia en la presente memoria son propiedades inmunológicas y/o biológicas. Preferentemente, las proteínas surfactantes pulmonares variantes presentan propiedades inmunológicas (es decir, composición de epitopos) comparables a las de las proteínas surfactantes pulmonares a las que se hace referencia específicamente en la presente memoria. De esta manera, las variantes pueden reconocerse mediante los medios o ligandos anteriormente mencionados utilizados para la determinación de la proteína surfactante pulmonar. Entre las variantes también se incluyen las proteínas surfactantes pulmonares modificadas post-traduccionalmente, tales como las proteínas glucosiladas. Con la distorsión o daño físico de las células alveolares epiteliales de tipo II del pulmón, se libera proPS-B hidrofílico a la circulación. Dicha distorsión o daño físico puede producirse para condiciones fisiopatológicas, por ejemplo en la insuficiencia cardiaca (ver, por ejemplo, el documento nº WO 2004/077056), con la infección, con la respiración artificial o bajo condiciones tóxicas (por ejemplo con el tabaquismo). Preferentemente, la cantidad de proPS-B (y/o de fragmento C de proPS-B) en los métodos de la invención se determina en las muestras de pacientes de insuficiencia cardiaca mediante la utilización del ensayo ELECSYS descrito en, por ejemplo, el Ejemplo 1.

El término "muestra" se refiere a una muestra de un líquido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o de un órgano. Pueden obtenerse muestras de líquidos corporales mediante técnicas bien conocidas y entre ellas se incluyen muestras de sangre, plasma, suero u orina. Las muestras de tejidos u órganos pueden obtenerse de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. Las células separadas pueden obtenerse de líquidos corporales o de los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como la centrifugación o la separación celular (FACS). Preferentemente, la muestra utilizada en los métodos de la invención es una muestra de sangre, una muestra de suero o una muestra de plasma. Todavía más preferentemente, la muestra es una muestra de suero.

El término "comparar" tal como se utiliza en la presente memoria comprende comparar la cantidad o la proporción de los polipéptidos a los que se hace referencia en la presente memoria que se encuentran comprendidos en la muestra que debe analizarse, con una cantidad de dichos polipéptidos en una muestra de referencia adecuada tal como se especifica en otros sitios de la presente descripción en la presente memoria. Debe entenderse que la comparación tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una comparación de los parámetros o valores correspondientes, por ejemplo, una cantidad absoluta de un marcador biológico tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria se compara con una cantidad de referencia absoluta de dicho marcador biológico; una concentración de un marcador biológico tal como se hace referencia al mismo se compara con una concentración de referencia de dicho marcador biológico; una señal de intensidad obtenida de un marcador biológico tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria en una muestra de ensayo se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de dicho marcador biológico en una muestra de referencia, o una proporción de dos marcadores biológicos tal como se hace referencia a los mismos en la presente memoria se compara con una proporción de referencia de dichos dos marcadores biológicos. La comparación a la que se hace referencia en los métodos de la presente invención puede llevarse a cabo manualmente o mediante la asistencia de un ordenador. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad o proporción determinada puede compararse con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos con un programa informático. El programa informático puede evaluar adicionalmente el resultado de la comparación mediante un sistema experto. De acuerdo con lo anterior, puede proporcionarse automáticamente en un formato de salida adecuado un diagnóstico diferencial para las enfermedades a las que se hace referencia en la presente memoria.

- Basándose en la comparación de la cantidad determinada de un marcador biológico tal como se hace referencia al mismo en la presente memoria y la cantidad de referencia de dicho marcador biológico, o mediante la comparación entre la proporción determinada de dos marcadores biológicos tal como se hace referencia a los mismos en la presente memoria y la proporción de referencia de dichos marcadores biológicos, resulta posible evaluar si el sujeto que sufre de insuficiencia cardiaca presenta insuficiencia cardiaca anterógrada y/o retrógrada del ventrículo izquierdo. Por lo tanto, dicha cantidad de referencia o proporción de referencia debe seleccionarse de manera que una diferencia o una identidad en las cantidades o proporciones comparadas permite identificar aquellos sujetos de ensayo que pertenecen al grupo de sujetos que presentan o no insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. El método permite excluir (descartar) o identificar (aceptar) un sujeto que presenta insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. Las diferencias en las cantidades o las proporciones, es decir, los incrementos o las reducciones, tal como se utilizan en la presente memoria, preferentemente son diferencias que son estadísticamente significativas, tal como se explica en otros sitios de la presente memoria.
- La expresión "cantidad de referencia" o "nivel de referencia" o "valor de referencia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una cantidad de los marcadores biológicos especificada en la presente memoria, preferentemente NT-proPNC o proPC-B o fragmento C de proPS-B, que permite evaluar cuáles de entre las enfermedades o trastornos anteriormente indicados, es decir, insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, es la consecuencia de insuficiencia cardiaca en un paciente, mediante la comparación de las cantidades de NT-proPNC o proPS-B o fragmento C de proPS-B en una muestra de dicho paciente con una cantidad de referencia del marcador biológico respectivo. Puede determinarse una cantidad de referencia adecuada a partir de una muestra de referencia que debe analizarse conjuntamente, es decir simultáneamente o seguidamente, con la muestra de ensayo.
- Las cantidades de referencia pueden, en principio, calcularse para una cohorte de sujetos tal como se especifica en la presente memoria basándose en los valores promedio o medios para un marcador biológico dado mediante la aplicación de métodos estadísticos estándares. En particular, la exactitud de un método tal como un método destinado a diagnosticar la incidencia o ausencia de un suceso, se describe mejor a partir de sus características operativas del receptor (COR) (ver especialmente Zweig y Campbell, Clin. Chem. 39:561-577, 1993). El gráfico de COR es un gráfico de todas las parejas de sensibilidad/especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión a lo largo del intervalo completo de datos observados. El rendimiento clínico de un método diagnóstico depende de su precisión, es decir, de su capacidad de asignar correctamente los sujetos a un determinado pronóstico o diagnóstico. El gráfico de COR ilustra el solapamiento entre las dos distribuciones a partir de un gráfico de la sensibilidad frente a 1-especificidad para el intervalo completo de umbrales de decisión. En el eje y se encuentra la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos, que se define como la proporción entre el número de resultados de ensayo positivos verdaderos y el número de positivos verdaderos más el número de resultados de ensayo falsos negativos. Lo anterior también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x se encuentra la fracción de falsos positivos, o 1-especificidad, que se define como la proporción entre el número de resultados de ensayo falsos positivos y el número de negativos verdaderos más el número de resultados de ensayo falsos positivos. Es un índice de la especificidad y se calcula por completo a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones positivas verdaderas y falsas positivas se calculan completamente por separado, mediante la utilización de los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, el gráfico de COR es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la cohorte. Cada punto del gráfico de COR representa una pareja de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento de las dos distribuciones de los resultados) presenta un gráfico de COR que pasa a través de la esquina superior izquierda, mientras que la fracción positiva verdadera es 1,0 ó 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivo es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados de los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda y la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se encuentra entre ambos extremos. En el caso de que el gráfico de COR se encuentre completamente debajo de la diagonal a 45°, se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor que" a "menor que", o viceversa. Cualitativamente, cuanto más próximo se encuentre el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor será la exactitud global del ensayo. Dependiendo del intervalo de confianza deseado, puede derivarse un umbral a partir de la curva de COR, permitiendo el diagnóstico o predicción de un suceso dado con un correcto equilibrio entre sensibilidad y especificidad, respectivamente. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, puede generarse la referencia que debe utilizarse para los métodos de la presente invención, es decir, un umbral que permite discriminar entre sujetos que presentan insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo o aquellos que no presentan insuficiencia cardiaca y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, preferentemente mediante el establecimiento de un COR para dicha cohorte tal como se ha indicado anteriormente y derivando un nivel umbral a partir de la misma. Según la sensibilidad y especificidad deseadas para un método diagnóstico, el gráfico de COR permite derivar umbrales adecuados. Se entenderá que se desea una sensibilidad óptima para excluir la insuficiencia cardiaca anterógrada y/o la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo (es decir, un descarte), mientras que se contempla la evaluación de una especificidad óptima para que presente insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo (es decir, una aceptación). Además, resulta preferente que las cantidades determinadas en los métodos de la presente invención se comparen con más de una cantidad de

referencia, por ejemplo una cantidad de referencia para aceptar insuficiencia cardiaca y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, y una cantidad de referencia para descartar la insuficiencia cardiaca anterógrada y/o la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.

5 Preferentemente, la cantidad de referencia tal como se utiliza en la presente memoria se deriva de una muestra de un sujeto que se conoce que presenta insuficiencia cardiaca anterógrada, insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo o insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. La cantidad de referencia puede derivarse también, por ejemplo, de uno o más sujetos de una cohorte relevante que es conocido que presenta insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. De acuerdo con lo anterior, la expresión cohorte relevante se refiere a una cohorte caracterizada por una o más características que también son características del paciente de insuficiencia cardiaca que debe diagnosticarse mediante los métodos de la invención. Entre dichas características se incluyen, aunque sin limitación, edad, género, etnicidad, estado de fumador/no fumador o estado de salud pulmonar. Este nivel de cantidad de referencia puede ser un número discreto o puede ser un intervalo de números. Evidentemente el nivel o cantidad de referencia puede variar entre clases individuales de péptidos natriuréticos o moléculas surfactantes. Por ejemplo, el nivel normal de PS-A puede diferir del nivel normal de PS-B.

20 La cantidad de referencia aplicable a un sujeto individual puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos tales como edad, género o subpoblación. De esta manera, puede determinarse una cantidad de referencia adecuada mediante los métodos de la presente invención a partir de una muestra de referencia que debe analizarse conjuntamente, es decir simultáneamente o seguidamente, con la muestra de ensayo. Además, puede utilizarse preferentemente una cantidad umbral a modo de cantidad de referencia. Una cantidad de los polipéptidos que es superior a la cantidad umbral o igual o inferior a la cantidad umbral será indicativa de insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo como la causa de la insuficiencia cardiaca. Debe entenderse que las cantidades anteriormente indicadas pueden variar de manera aleatoria y debido a errores de medición.

30 En una realización preferente adicional de la presente invención, el método comprende además las etapas de determinar la cantidad de proSP-B (o fragmento C de proPS-B) y NT-proPNO en una muestra del paciente de insuficiencia cardiaca, y determinar o calcular la proporción entre la cantidad de proPS-B (o fragmento C de proPS-B) y la cantidad de NT-proPNO. Preferentemente, la proporción calculada es la proporción entre proPS-B (o fragmento C de proPS-B) y NT-proPNO. Sin embargo, también se encuentra contemplado que la proporción calculada sea la proporción entre NT-proPNO y proPS-B (o el fragmento C de proPS-B). La determinación de ambos marcadores resulta ventajosa, ya que la proporción entre las cantidades de ambos marcadores biológicos permite realizar un diagnóstico particularmente fiable de insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en sujetos con insuficiencia cardiaca, tal como se demuestra en los Ejemplos siguientes.

40 En otra realización preferente del método de la invención, la cantidad de NT-proPNO en la muestra del paciente de insuficiencia cardiaca de referencia es esencialmente igual a la cantidad de NT-proPNO en el paciente que debe someterse a ensayo. Las cantidades preferentes de NT-proPNO en la muestra de los pacientes de insuficiencia cardiaca de referencia se indican en otros sitios de la presente memoria y en los ejemplos siguientes, en particular en la Tabla 2 del Ejemplo 3. La expresión "esencialmente idéntica" o "esencialmente igual" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que la cantidad de NT-proPNO en la muestra del paciente de insuficiencia cardiaca de referencia puede diferir de la cantidad de NT-proPNO en el paciente que debe someterse a ensayo más/menos 10%, más/menos 9%, más/menos 8%, más/menos 7%, más/menos 6%, más/menos 5%, más/menos 4%, más/menos 3%, más/menos 2% o más/menos 1%. Preferentemente, el paciente de insuficiencia cardiaca de referencia y el paciente que debe someterse a ensayo en el método de la invención se encuentran comprendidos en el grupo del mismo tercil.

50 Se aplica lo siguiente como algoritmo diagnóstico en el caso de que la proporción determinada o calculada sea la proporción entre proPS-B y NTproPNO. Tal como se indica en otros sitios de la presente memoria, la proporción determinada o calculada en el método de la invención preferentemente es la proporción entre proPS-B y NT-proPNO, en la que:

- 55 (i) una proporción entre proPS-B y NT-proPNO en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a la proporción de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada, o que es inferior a dicha proporción de referencia, es indicativa de insuficiencia cardiaca anterógrada,
- 60 (ii) una proporción entre proPS-B y NT-proPNO en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a la proporción de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, o que es superior a dicha proporción de referencia, es indicativa de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, y/o
- 65 (iii) una proporción entre proPS-B y NT-proPNO en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a la proporción de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia

cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo es indicativa de insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.

Resulta preferente que:

5 (i) la proporción de referencia entre proPS-B y NT-proPNO para la insuficiencia cardiaca anterógrada corresponde a aproximadamente el valor del percentil 25 de la proporción entre proPS-B y NT-proPNO de la Tabla 2. Preferentemente, dicha proporción de ensayo es aproximadamente 0,030, 0,035 o 0,040 para el tercil 1, de aproximadamente 0,015, 0,020 o 0,025 para el tercil 2 y de aproximadamente 0,003, 0,005 o 0,010 para el  
10 tercil 3. Una proporción entre proPS-B y NT-proPNO en el sujeto de ensayo que es esencialmente idéntica a dicha proporción de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada o que es inferior a dicha proporción de referencia, es indicativa de insuficiencia cardiaca anterógrada..

15 (ii) la proporción de referencia entre proPS-B y NT-proPNO para la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo corresponde a aproximadamente el valor del percentil 25 de la proporción entre proPS-B y NT-proPNO de la Tabla 2. Preferentemente, dicha proporción de referencia es aproximadamente 0,180, 0,200 o 0,230 para el tercil 1, de aproximadamente 0,050, 0,060 o 0,080 para el tercil 2 y de aproximadamente 0,020, 0,030 o 0,040 para el tercil 3. Una proporción entre proPS-B y NT-proPNO en el sujeto de ensayo que es  
20 esencialmente idéntica a dicha proporción de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, o que es superior a dicha proporción de referencia, es indicativa de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.

25 (iii) la proporción de referencia entre proPS-B y NT-proPNO para la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo preferentemente es aproximadamente un valor entre los valores de percentil 25 y percentil 75 de la proporción entre proPS-B y NT-proPNO de la Tabla 2, o de entre aproximadamente el percentil 25 y el percentil 75 de la proporción entre proPS-B y NT-proPNO tal como se ha  
30 indicado en (i) o (ii), anteriormente. Una muestra de ensayo con una proporción calculada entre proPS-B y NT-proPNO inferior al valor de la mediana correspondiente que se indica en la Tabla 2 (por ejemplo de aproximadamente 0,080 para el tercil 1, de aproximadamente 0,030 para el tercil 2 y de aproximadamente 0,010 para el tercil 3) es un signo de la predominancia de insuficiencia cardiaca anterógrada en el paciente de insuficiencia cardiaca, mientras que una proporción superior al valor de mediana es un signo de la predominancia de la insuficiencia retrógrada del ventrículo izquierdo.

35 Pueden derivarse proporciones de referencia preferentes adicionales de los Ejemplos, posteriormente. Resultará evidente para el experto en la materia que las muestras de ensayo de pacientes de insuficiencia cardiaca que muestran una proporción entre proPS-B y NT-proPNO esencialmente idéntica o próxima al valor del percentil 25 o el percentil 75 indicados anteriormente se verifican mediante un segundo método indicado en otros sitios de la presente memoria, confirmando de esta manera la presencia de insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia  
40 cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.

El término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a más/menos 30%, más/menos 20%, más/menos 10%, más/menos 5%, más/menos 4%, más/menos 3%, más/menos 2% o más/menos 1% respecto al valor específico al que se hace referencia.

45 La expresión "insuficiencia cardiaca" es bien conocida de la técnica. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión preferentemente se refiere a una función sistólica y/o diastólica alterada del corazón acompañada de signos manifiestos de insuficiencia cardiaca. Preferentemente, la insuficiencia cardiaca a la que se hace referencia en la presente memoria es la insuficiencia cardiaca crónica. Más preferentemente, es insuficiencia cardiaca aguda.  
50 La expresión "insuficiencia cardiaca aguda" preferentemente se refiere a un empeoramiento de la función cardiaca en un máximo de 2 semanas con o, en particular, sin insuficiencia cardiaca crónica preexistente.

La insuficiencia cardiaca (IC) puede clasificarse en diversos grados de gravedad. Según la clasificación de la NY-HA (New York Heart Association), los pacientes de insuficiencia cardiaca se clasifican como pertenecientes a las clases I, II, III y IV de la NYHA. Un paciente que presenta insuficiencia cardiaca ya ha experimentado cambios estructurales y funcionales en su pericardio, miocardio, circulación coronaria o válvulas cardiacas. No podrá restaurar por completo su salud y requiere un tratamiento terapéutico. Los pacientes de NYHA clase I no presentan síntomas evidentes de enfermedad cardiovascular pero ya presentan evidencia objetiva de alteración funcional. Los pacientes de NYHA de clase II presentan una ligera limitación de la actividad física. Los pacientes de NYHA de clase III  
60 presentan una marcada limitación de la actividad física. Los pacientes de NYHA de clase IV no puede llevar a cabo ninguna actividad física sin molestias. Muestran síntomas de insuficiencia cardiaca en reposo.

Esta clasificación funcional ha sido complementada por la clasificación más reciente de la American College of Cardiology y de la American Heart Association (ver J. Am. Coll. Cardiol. 38:2101-2113, 2001, actualidad en 2005, ver J. Am. Coll. Cardiol. 46:e1-e82, 2005). Se han definido cuatro estadios: A, B, C y D. Los estadios A y B no son IC pero se consideran para ayudar a identificar los pacientes precozmente antes de que desarrollen "realmente" IC. Los  
65

pacientes de los estadios A y B se definen mejor como aquellos con factores de riesgo de desarrollo de IC. Por ejemplo, pacientes con enfermedad arterial coronaria, hipertensión o diabetes mellitus que todavía no manifiestan una función ventricular izquierda (VI) alterada, hipertrofia, o distorsión geométrica de cámaras, se considerarían de estadio A, mientras que los pacientes que son asintomáticos pero muestran hipertrofia del VI y/o una función VI alterada se incluirían en el estadio B. El estadio C se refiere a pacientes con síntomas actuales o pasados de IC asociada a enfermedad cardíaca estructural subyacente (la mayoría de los pacientes que presentan IC) y el estadio D se refiere a pacientes con IC verdaderamente refractaria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "insuficiencia cardíaca" preferentemente se refiere a los estadios C y D de la clasificación de ACC/AHA a la que se ha hecho referencia anteriormente. En estos estadios, el sujeto muestra síntomas típicos de insuficiencia cardíaca. De acuerdo con lo anterior, un sujeto que sufre de insuficiencia cardíaca, sufre de insuficiencia cardíaca estadio C o D según la clasificación de la ACC/AHA. Alternativamente, la expresión "insuficiencia cardíaca" se clasifica como NYHA III o IV según la clasificación de la NYHA. Todavía más preferentemente, la insuficiencia cardíaca tal como se utiliza en la presente memoria es insuficiencia cardíaca descompensada. La "insuficiencia cardíaca descompensada" tal como se utiliza en la presente memoria se caracteriza por signos de congestión y/o hipoperfusión; entre los signos de congestión se incluyen disnea de esfuerzo, tos y sibilancias paroxísticas, nocturnas en reposo o incluso ortopnea; entre los signos de hipoperfusión se incluyen confusión, estado mental alterado, mareo, presíncope o síncope asociado a extremidades frías, presión de pulso estrecha o *pulsus alterans*. En la descompensación aguda de la insuficiencia cardíaca crónica, se agravan dichos síntomas. La insuficiencia cardíaca descompensada resulta frecuentemente de la insuficiencia cardíaca crónica sistólica. Los niveles característicos de NT-proPNO para los pacientes que presentan insuficiencia cardíaca crónica sistólica corresponden a aproximadamente el percentil 25 de la insuficiencia cardíaca descompensada. De acuerdo con lo anterior, resulta preferente que los pacientes de insuficiencia cardíaca que deben someterse a ensayo en los métodos de la invención muestren un nivel de NT-proPNO superior a aproximadamente 1.700 ng/ml, o 1.800 ng/ml o 1.900 ng/ml o 2.000 ng/ml en una muestra, preferentemente una muestra de sangre, suero o plasma. Todavía más preferentemente, dicha cantidad es superior a aproximadamente 1.900 ng/ml. Pueden observarse cantidades inferiores a dicho valor en la insuficiencia cardíaca diastólica y en la insuficiencia cardíaca sin insuficiencia cardíaca crónica previa.

La insuficiencia cardíaca también puede clasificarse de la manera siguiente: insuficiencia cardíaca aguda versus crónica, insuficiencia cardíaca sistólica versus diastólica, insuficiencia cardíaca de gasto alto versus de gasto bajo, insuficiencia cardíaca de lado derecho versus de lado izquierdo o insuficiencia cardíaca anterógrada versus retrógrada, tal como se describe brevemente después.

El prototipo de insuficiencia cardíaca aguda es el paciente que se encuentra completamente bien pero que súbitamente desarrolla un gran infarto de miocardio o la ruptura de una válvula cardíaca. La insuficiencia cardíaca crónica se observa típicamente en pacientes con cardiomiopatía dilatada o enfermedad cardíaca multivalvular que se desarrolla o progresa lentamente. La insuficiencia cardíaca aguda habitualmente es en gran parte sistólica y la reducción súbita de la salida cardíaca con frecuencia resulta en hipotensión sistémica sin edema periférico. En la insuficiencia cardíaca crónica, la presión arterial tiende a mantenerse bien hasta muy tarde durante el curso de la enfermedad, aunque con frecuencia se produce edema periférico.

La clasificación de la insuficiencia cardíaca de sistólico versus diastólico se refiere a si la anomalía principal es la incapacidad de contraerse normalmente y eyectar suficiente sangre (insuficiencia sistólica) o de relajarse y llenarse normalmente (insuficiencia diastólica). Las manifestaciones clínicas principales de la insuficiencia sistólica se refiere a un gasto cardíaco inadecuado con debilidad, fatiga, tolerancia al ejercicio reducida y otros síntomas de hipoperfusión, mientras que en la insuficiencia diastólica se refieren principalmente a una elevación de las presiones de llenado. En muchos pacientes, particularmente aquellos que presentan tanto hipertrofia como dilatación ventriculares, coexisten las anomalías de la contracción y de la relajación. La insuficiencia cardíaca diastólica puede estar causada por una resistencia incrementada al flujo de entrada ventricular y una capacidad diastólica ventricular reducida (pericarditis constrictiva y cardiomiopatía restrictiva, hipertensiva e hipertrófica), relajación ventricular alterada (isquemia miocárdica aguda, cardiomiopatía hipertrófica) y fibrosis e infiltración miocárdicas (cardiomiopatía dilatada, isquémica crónica y restrictiva).

La insuficiencia cardíaca de gasto bajo se produce secundariamente a la enfermedad cardíaca isquémica, hipertensión, cardiomiopatía dilatada y enfermedad valvular y pericárdica. La insuficiencia cardíaca de gasto alto se produce en el hipertiroidismo, la anemia, el embarazo, las fistulas arteriovenosas, beriberi, las enfermedades hepáticas, la sepsis y la enfermedad de Paget. Sin embargo, en la práctica clínica, la insuficiencia cardíaca de gasto bajo y de gasto alto no siempre pueden distinguirse con facilidad.

Los pacientes en los que el ventrículo izquierdo se encuentra mecánicamente sobrecargado (por ejemplo la estenosis aórtica) o debilitado (por ejemplo el infarto post-miocárdico) desarrollan disnea y ortopnea como resultado de la congestión pulmonar, una condición denominada insuficiencia cardíaca de lado izquierdo. En contraste, cuando la anomalía subyacente afecta al ventrículo derecho principalmente (por ejemplo la estenosis pulmonar o la hipertensión pulmonar), los síntomas resultantes de la congestión pulmonar, tales como la ortopnea y la disnea nocturna paroxística, son menos comunes, y el edema, la hepatomegalia congestiva y la distensión venosa

sistémica, es decir, manifestaciones clínicas de insuficiencia cardiaca de lado derecho, son más prominentes. Sin embargo, en casos en que la insuficiencia cardiaca se ha prolongado durante meses o años, habitualmente resulta el fallo biventricular. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad de la válvula aórtica o hipertensión sistémica de larga duración pueden presentar edema de tobillo, hepatomegalia congestiva y distensión venosa sistémica tarde durante el curso de la enfermedad, aunque la carga hemodinámica anormal se haya aplicado inicialmente en el ventrículo izquierdo.

En el caso de insuficiencia cardiaca anterógrada, las manifestaciones clínicas de la insuficiencia cardiaca resultan directamente de una descarga inadecuada de sangre al sistema arterial. De acuerdo con lo anterior, la retención de sales y agua es una consecuencia de una menor perfusión renal y una reabsorción proximal tubular excesiva de sodio y de una reabsorción tubular distal excesiva mediante la activación del sistema de renina-angiotensina-aldosterona. De acuerdo con lo anterior, la expresión "insuficiencia cardiaca anterógrada" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la incapacidad del corazón de bombear sangre a una tasa suficiente para satisfacer las demandas de oxígeno del cuerpo en reposo o en ejercicio, es decir el problema es principalmente suministrar una adecuada perfusión arterial frente a la precarga cardiaca. La insuficiencia cardiaca anterógrada se asocia en general a un gasto bajo del ventrículo izquierdo e isquemia periférica. La insuficiencia cardiaca anterógrada puede diagnosticarse, por ejemplo, mediante la medición de la presión sanguínea arterial. Los métodos diagnósticos adicionales tales como la ecocardiografía (preferentemente además de los datos Doppler), la ventriculografía de radionucleidos (escaneo de captura en canales múltiples), la angiografía (cateterización) o el electrocardiograma (EKG o ECG) son bien conocidos de la técnica, tal como se indica en, por ejemplo, Hess O.M., Carroll J.D., Clinical assessment of heart failure, capítulo 23, Braunwald's Heart Disease, 9a edición, página 561 y ss.

El concepto de insuficiencia cardiaca retrógrada afirma que en la insuficiencia cardiaca el ventrículo derecho o izquierdo no consigue descargar su contenido o no consigue llenarse normalmente. En consecuencia, las presiones en la aurícula y sistema venoso detrás del ventrículo insuficiente se elevan y se produce la retención de sodio y agua como consecuencia de la elevación de las presiones venosas y capilares sistémicas y la transudación resultante de líquidos al espacio intersticial. De acuerdo con lo anterior, la expresión "insuficiencia cardiaca retrógrada" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la capacidad del corazón de bombear sangre a una tasa suficiente únicamente en el caso de que las presiones de llenado del corazón sean anormalmente elevadas, es decir el problema es principalmente una presión venosa retrógrada incrementada tras la postcarga cardiaca. La expresión "insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al fallo en la función correcta del ventrículo izquierdo. La insuficiencia retrógrada del ventrículo izquierdo causa la congestión de la vasculatura pulmonar de manera que los síntomas son de naturaleza predominantemente respiratoria. La insuficiencia retrógrada del ventrículo derecho conduce a la congestión de los capilares sistémicos. La insuficiencia cardiaca retrógrada puede diagnosticarse, por ejemplo, mediante los métodos especificados en otros sitios de la presente memoria. Los valores normales de la presión sistólica arterial pulmonar derivados de, por ejemplo, la medición ecocardiográfica son inferiores a aproximadamente 30 mmHg, inferiores a aproximadamente 25 mmHg, inferiores a aproximadamente 20 mmHg o inferiores a aproximadamente 15 mmHg.

La invención se refiere además a un método para diferenciar en un paciente de insuficiencia cardiaca entre (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, comprendiendo el método las etapas de:

- a) determinar en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca la cantidad de proPS-B,
- b) comparar la cantidad de proPS-B con por lo menos una cantidad de referencia de proPS-B, diferenciando de esta manera entre: (i) insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.

En una realización preferente de dicho método de la invención, la cantidad o cantidades de referencia se derivan (i) de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo y/o (iii) de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.

En otra realización preferente de dicho método de la invención, la cantidad de NT-proPNO en la muestra del paciente de insuficiencia cardiaca de referencia es esencialmente igual a la cantidad de NT-proPNO en el paciente que debe someterse a ensayo.

En una realización preferente todavía adicional del dicho método de la invención,

- (i) una cantidad de proPS-B en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a la proporción de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada, o que es inferior a dicha cantidad de referencia, es indicativa de insuficiencia cardiaca anterógrada,
- (ii) una cantidad de proPS-B en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a la cantidad de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada

del ventrículo izquierdo, o que es superior a dicha cantidad de referencia, es indicativa de insuficiencia cardiaca anterógrada, y/o

- (iii) una cantidad de proPS-B en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a la cantidad de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo es indicativa de insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.

Resulta preferente que:

- (i) la cantidad de referencia de proPS-B para la insuficiencia cardiaca anterógrada corresponde a aproximadamente el valor del percentil 25 de proPS-B de la Tabla 2. De acuerdo con lo anterior, dicha cantidad de referencia preferentemente es de aproximadamente 30, 40 o 65 ng/ml para el tercil 1, de aproximadamente 70 o 79 ng/ml para el tercil 2 y de aproximadamente 90 o 102 ng/ml para el tercil 3. Una cantidad de proPS-B en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a dicha cantidad de referencia o inferior a dicha cantidad de referencia es indicativa de insuficiencia cardiaca anterógrada,
- (i) la cantidad de referencia de proPS-B para la insuficiencia cardiaca retrógrada corresponde a aproximadamente el valor del percentil 25 de proPS-B de la Tabla 2. De acuerdo con lo anterior, dicha cantidad de referencia preferentemente es de aproximadamente 163, 170 o 180 ng/ml para el tercil 1, de aproximadamente 218, 230 o 270 ng/ml para el tercil 2 y de aproximadamente 213, 220 o 270 ng/ml para el tercil 3. Una cantidad de proPS-B en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a dicha cantidad de referencia o superior a dicha cantidad de referencia es indicativa de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo,
- (iii) la cantidad de referencia de proPS-B para la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo es de aproximadamente entre los valores de los percentiles 25 y 75 de proPS-B de la Tabla 2, o de entre aproximadamente los valores de los percentiles 25 y 75 de proPS-B indicados en (i) o (ii), anteriormente. Una muestra de ensayo con una cantidad de proPS-B inferior al valor de la mediana correspondiente que se indica en la Tabla 2 (por ejemplo de aproximadamente 105 ng/ml para el tercil 1, de aproximadamente 127 ng/ml para el tercil 2 y de aproximadamente 157 ng/ml para el tercil 3) es un signo de la predominancia de insuficiencia cardiaca anterógrada en el paciente de insuficiencia cardiaca, mientras que una cantidad superior al valor de mediana es un signo de la predominancia de la insuficiencia retrógrada del ventrículo izquierdo.

Pueden derivarse cantidades de referencia preferentes adicionales de los Ejemplos, posteriormente. Resultará evidente para el experto en la materia que las muestras de ensayo de pacientes de insuficiencia cardiaca que muestran una cantidad de proPS-B esencialmente idéntica o próxima al valor del percentil 25 o al percentil 75 indicados anteriormente se verifican mediante un segundo método indicado en otros sitios de la presente memoria, confirmando de esta manera la presencia de insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.

En la invención se encuentra comprendida además un método para diferenciar en un paciente de insuficiencia cardiaca entre: (i) insuficiencia cardiaca anterógrada e (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo que muestra cantidades de NT-proPNO iguales o superiores al percentil 25 de la insuficiencia cardiaca descompensada, comprendiendo el método las etapas de:

- a) determinar en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca la cantidad de proPS-B, b) comparar la cantidad de proPS-B con por lo menos una cantidad de referencia de proPS-B, diferenciando de esta manera entre (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada e (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.

Preferentemente, las cantidades de NT-proPNO correspondientes al percentil 25 de insuficiencia cardiaca descompensada son de aproximadamente 1.700 pg/ml, o de 1.800 pg/ml, o de 1.900 pg/ml, o de 2.000 pg/ml en una muestra, preferentemente una muestra de sangre, suero o plasma de un paciente de insuficiencia cardiaca. Todavía más preferentemente, dicha cantidad es superior a aproximadamente 1.900 pg/ml.

La invención se refiere además a un método para el seguimiento en un paciente de insuficiencia cardiaca con un incremento o reducción significativa de la cantidad de NT-proPNO, (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, comprendiendo el método las etapas de:

- a) determinar la cantidad de proPS-B en una primera muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca en un primer punto temporal, b) determinar la cantidad de proPS-B en una segunda muestra de dicho paciente de insuficiencia cardiaca en un segundo punto temporal, obteniendo dicha segunda muestra después de dicha primera muestra, y, opcionalmente:
- c) comparar la cantidad de proPS-B determinada en la primera muestra con la cantidad de proPS-B determinada en la segunda muestra,

en el que una cantidad estable de proPS-B o una reducción de la cantidad de proPS-B en la segunda muestra respecto a la primera muestra es indicativa de (i) insuficiencia cardiaca anterógrada, o (ii) insuficiencia cardiaca

anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, y un incremento de la cantidad de proPS-B en la segunda muestra es indicativa de (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.

5 En una realización preferente, el paciente de insuficiencia cardiaca con un incremento o reducción significativa de la cantidad de NT-proPNO muestra un incremento de por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o incluso más en una muestra, preferentemente una muestra de sangre, suero o plasma. Todavía más preferentemente, dicho incremento o reducción es de por lo menos 10%.

10 En una realización preferente adicional, el paciente de insuficiencia cardiaca con un incremento o reducción significativa de la cantidad de NT-proPNO muestra dicho incremento o reducción en un periodo de por lo menos aproximadamente 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, seis semanas, 2 meses, 3 meses o incluso más tiempo, antes de llevar a cabo dicho método. Resulta adicionalmente preferente que dicha primera y segunda muestras se obtengan a intervalos de 1, 2, 3 o 4 semanas, o de 2, 3 o 4 meses.

15 El método de seguimiento de (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, e (iii) la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en un paciente de insuficiencia cardiaca de la invención puede utilizarse para el seguimiento de los niveles sanguíneos de proPS-B (y/o del fragmento C de proPS-B) en un paciente de insuficiencia cardiaca, por ejemplo durante la terapia. Por ejemplo, el empeoramiento de la función cardiaca en un paciente de insuficiencia cardiaca se ha encontrado que está asociado a un incremento de proPS-B como signo de insuficiencia cardiaca retrógrada (PT2) que mejoró a medida que mejoraba la función cardiaca (PT3), tal como se muestra en el Ejemplo 4.

20 Preferentemente, la insuficiencia cardiaca es insuficiencia cardiaca avanzada, más preferentemente de estadio C, todavía más preferentemente insuficiencia cardiaca de estadio D.

25 La terapia básica para la insuficiencia cardiaca se describe en otros sitios de la presente memoria. La terapia específica apropiada de la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo es privar al paciente de líquidos, incluyendo, por ejemplo, la reducción del volumen intravasal del paciente de insuficiencia cardiaca, mientras que la insuficiencia cardiaca anterógrada requiere medidas que ayuden a mejorar el gasto cardiaco, tal como la sustitución de volumen, inotrópicos y/o dispositivos ASSIST. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una realización preferente del método de la invención, (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada puede tratarse mediante sustitución de volumen, inotrópicos y/o dispositivos ASSIST, (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo puede tratarse mediante la reducción del volumen intravasal del paciente de insuficiencia cardiaca, e (iii) la insuficiencia cardiaca anterógrada y retrógrada del ventrículo izquierdo pueden tratarse, por ejemplo, con inhibidores del enzima conversor de la angiotensina (ECA), bloqueantes de receptores de la angiotensina II (BRA), beta-bloqueantes y/o diuréticos.

30 Aunque se ha asociado NT-proPNO y proPS-B a la insuficiencia cardiaca y el estado según la NYHA en estudios anteriores, no se ha proporcionado información hasta el momento sobre la asociación entre dichos marcadores biológicos y las consecuencias de la insuficiencia cardiaca. La presente invención proporcionar por primera vez un método que permite distinguir la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en un paciente de insuficiencia cardiaca mediante el análisis de las cantidades de los marcadores biológicos NT-proPNO y proPS-B en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca. Debido a que (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, e (iii) la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo deben tratarse de maneras diferentes, el método de la invención proporciona además una guía de tratamiento para el médico o médicos responsables del tratamiento. De acuerdo con lo anterior, la expresión "guía de tratamiento" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que el método inventivo puede servir como directriz para una terapia apropiada, permitiendo de esta manera un régimen de tratamiento más preciso que los descritos en la técnica anterior.

35 En principio, el tratamiento básico de la insuficiencia cardiaca puede dividirse lógicamente en tres componentes: (1) eliminación de la causa de la precipitación, (2) corrección de la causa subyacente, y (3) control de los síntomas de la insuficiencia cardiaca. El control de los síntomas de la insuficiencia cardiaca puede dividirse, a su vez, en tres categorías: (i) reducción de la carga de trabajo cardiaco, incluyendo tanto precarga como postcarga, (ii) control de la retención excesiva de sal y agua, y (iii) incremento de la contractilidad miocárdica. El tratamiento de la insuficiencia cardiaca se encuentra bien descrito en la técnica; ver, por ejemplo, D.G. Mann, Clinical assessment of heart failure (HF), capítulo 25, Braunwald's Heart Disease, 9a edición, página 611 y ss. Los pacientes clínicos de insuficiencia cardiaca se han subdividido en cuatro 'estadios'. Estadio A. Los pacientes presentan un riesgo elevado de desarrollar IC clínica (es decir, aquellos que presentan hipertensión, diabetes, dislipemia, etc.) aunque sin enfermedad cardiaca estructural detectable. Estadio B. Pacientes que presentan enfermedad cardiaca estructural detectable (es decir, HVI, disfunción del VI) pero sin signos o síntomas clínicos de IC. Estadio C. Pacientes con IF clínica actual o pasada. Estadio D. Pacientes con IF refractaria de estadio final, que son candidatos para formas extraordinarias de terapia o para cuidados paliativos terminales. Los pacientes de los estadios A y B pueden tratarse con, por ejemplo, inhibidores de la ECA y/o con los BRA. Los pacientes de estadio C pueden recibir, además,

inhibidores de la ECA y/o BRA, beta-bloqueantes y diuréticos; algunos pacientes seleccionados pueden recibir marcapasos biventricular o desfibriladores implantables. Los pacientes de estadio D pueden tratarse con, por ejemplo, inotrópicos crónicos, soporte mecánico permanente o trasplante cardíaco.

5 Aunque no puede formularse una regla simple para el tratamiento de todos los pacientes de insuficiencia cardíaca debido a las diversas etiologías, características hemodinámicas, manifestaciones clínicas y gravedad de la  
 10 insuficiencia cardíaca, los métodos de la presente invención pueden ayudar a mejorar el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante la diferenciación de la insuficiencia cardíaca anterógrada y/o la insuficiencia cardíaca retrógrada del ventrículo izquierdo. Basándose en los resultados de este diagnóstico diferencial, puede aplicarse una  
 15 terapia específica que esté adaptada al tratamiento de la insuficiencia cardíaca anterógrada o de la insuficiencia cardíaca retrógrada del ventrículo izquierdo. Más concretamente, la insuficiencia cardíaca anterógrada se asocia en general a un gasto bajo del ventrículo izquierdo e isquemia periférica. En este caso, puede estar indicada la sustitución de volumen para evitar el síndrome cardiorenal. Además, algunos inotrópicos tales como la dobutamina pueden resultar útiles en este contexto. Los dispositivos ASSIST también pueden resultar útiles para prestar soporte  
 20 al gasto cardíaco en casos que no responden a la farmacoterapia; ver, por ejemplo, Naka Y. y E.A. Rose, Clinical assessment of heart failure (HF), capítulo 28, Braunwald's Heart Disease, 9a edición, página 685 y ss. Por ejemplo, los dispositivos ASSIST pueden utilizarse temporalmente en los pacientes de insuficiencia cardíaca crónica como puente hasta el momento del trasplante o pueden implantarse permanentemente en el ápice del ventrículo izquierdo con el fin de prolongar la esperanza de vida del paciente. En contraste, en el caso de congestión pulmonar, tal como es el caso de la insuficiencia cardíaca retrógrada, la reducción del volumen intravasal es la terapia de elección. Lo anterior incluye la utilización de diuréticos del asa o vasodilatadores, tales como nitratos. En su caso, dicho  
 25 tratamiento específico para la insuficiencia cardíaca anterógrada o para la insuficiencia cardíaca retrógrada del ventrículo izquierdo puede aplicarse, además, a la terapia básica para la insuficiencia cardíaca indicada anteriormente, por ejemplo en pacientes que presentan tanto insuficiencia cardíaca anterógrada como insuficiencia cardíaca retrógrada del ventrículo izquierdo. En estos casos, resulta decisivo para el tratamiento qué insuficiencia cardíaca del ventrículo izquierdo es prevalente, si la anterógrada o la retrógrada, tal como se explica en otros sitios de la presente memoria.

30 Los ensayos diagnósticos utilizados actualmente para diagnosticar la insuficiencia cardíaca comprenden, por ejemplo, la ecocardiografía, la ventriculografía de radionucleidos (escaneo de captura en múltiples canales), la angiografía (cateterización) el electrocardiograma (EKG o ECG). Sin embargo, puede presentarse reticencia del paciente o del médico a la hora de solicitar dichos ensayos en ausencia de uno o más indicadores de factor de riesgo (por ejemplo obesidad o diabetes) o evidencia sintomática (por ejemplo falta de aliento). Debido a que no todos los enfermos de insuficiencia cardíaca muestran uno o más de los factores de riesgo bien conocidos, lo anterior puede significar con frecuencia que no se detecta la insuficiencia cardíaca hasta que se ha convertido en  
 35 grave y/o crónica, conduciendo de esta manera a un incremento de la incidencia de mortalidad y en una carga significativa para el sistema de salud, ya que el diagnóstico en estadio tardío habitualmente implica un seguimiento y tratamiento más caro e intervencionista, en contraste con las medidas terapéuticas más simples y/o cambios de estilo de vida que podrían resultar suficientes en caso de realizarse el diagnóstico en un estadio temprano. A la luz de lo anteriormente expuesto, la disección de los diferentes tipos de insuficiencia cardíaca tal como permiten los métodos de la presente invención presenta claras consecuencias terapéuticas y se añade ventajosamente a los signos y síntomas clínicos que podrían no encontrarse presentes en los estadios tempranos. Además, permitirá realizar un seguimiento del curso espontáneo de la insuficiencia cardíaca y ayudar a seguir los efectos del  
 40 tratamiento.

45 En una realización preferente de los métodos de la invención, la insuficiencia cardíaca anterógrada se caracteriza por la incapacidad del corazón de bombear sangre a una tasa suficiente para cumplir la demanda de oxígeno del cuerpo en reposo o en ejercicio.

50 En otra realización preferente de los métodos de la invención, la insuficiencia cardíaca retrógrada del ventrículo izquierdo se caracteriza por la capacidad del corazón de bombear sangre a una tasa suficiente únicamente en el caso de que las presiones de llenado del corazón sean anormalmente elevadas.

55 En una realización todavía preferente de los métodos de la invención, la muestra es una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero.

La especificación describe además la utilización de (i) proPS-B y NT-proPNO, (ii) un agente de detección que se une específicamente a proPS-B y/o (iii) un agente de detección que se une específicamente a NT-proPNO en una muestra de un paciente de insuficiencia cardíaca para diferenciar en dicho paciente de insuficiencia cardíaca entre la  
 60 insuficiencia cardíaca anterógrada y/o la insuficiencia cardíaca retrógrada del ventrículo izquierdo. Dichos agentes de detección que se unen específicamente a proPS-B, al fragmento C de proPS-B o a NT-proPNO y los ensayos cualitativos y cuantitativos apropiados para la detección de dichas proteínas han sido descritos en otros sitios de la presente memoria. Preferentemente se utilizan con este fin anticuerpos de unión específica a proPS-B, al fragmento C de proPS-B o a NT-proPNO, en inmunoensayos.

65

La especificación describe además la utilización de proPS-B o un agente de detección que se une específicamente a proPS-B en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca para el diagnóstico de la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.

- 5 Las definiciones de los términos y realizaciones con respecto a los métodos de la invención se aplican, *mutatis mutandis*, a los usos indicados en la presente memoria.

La memoria describe además un dispositivo para diferenciar en un paciente de insuficiencia cardiaca anterógrada y/o de insuficiencia cardiaca anterógrada del ventrículo izquierdo, que comprende:

- 10 a) una unidad de análisis para determinar la cantidad de proPS-B y NT-proPNO en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca,  
 b) una unidad de evaluación para comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia adecuada y para diferenciar la insuficiencia cardiaca anterógrada y/o la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.

15 Además, la memoria describe un dispositivo para diagnosticar en un paciente de insuficiencia cardiaca, la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, que comprende:

- 20 a) una unidad de análisis para determinar la cantidad de proPS-B en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca,  
 b) una unidad de evaluación para comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia adecuada y para diagnosticar la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.

25 El término "dispositivo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un sistema de medios que comprende por lo menos los medios anteriormente indicados operativamente asociados entre sí de manera que permitan la predicción. Los medios preferentes para determinar la cantidad de dichos polipéptidos y medios para llevar a cabo la comparación se han dado a conocer anteriormente en relación a los métodos de la invención. El cómo asociar los medios de una manera operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, en el caso de que se apliquen medios para determinar automáticamente la cantidad de los polipéptidos o péptidos, los datos obtenidos por dichos medios de funcionamiento automático pueden procesarse mediante, por ejemplo, un programa informático con el fin de diagnosticar o distinguir entre las enfermedades a las que se hace referencia en la presente memoria. Preferentemente, los medios comprenden un único dispositivo en dicho caso. De acuerdo con lo anterior, dicho dispositivo puede incluir una unidad de análisis para la medición de la cantidad de los polipéptidos o péptidos en una muestra y una unidad de ordenador para procesar los datos resultantes para el diagnóstico diferencial.

30 Alternativamente, en el caso de que se utilicen medios tales como tiras de ensayo para determinar la cantidad de los polipéptidos, los medios para el diagnóstico pueden comprender tiras de control o tablas que asignen la cantidad determinada a una cantidad que es conocido que se ve acompañada por insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. Las tiras de ensayo preferentemente se acoplan a un ligando que se une específicamente a los polipéptidos tal como se define en otros sitios de la presente memoria. La tira o dispositivo comprende preferentemente medios para la detección de la unión de dichos (poli)péptidos a dicho ligando. Los medios preferentes para la detección se dan a conocer en relación a realizaciones referentes a los métodos de la invención, anteriormente. En este caso, los medios se encuentran operativamente asociados en el aspecto de que el usuario del sistema reúne el resultado de la determinación de la cantidad y el valor diagnóstico del mismo según las instrucciones e interpretaciones proporcionadas en un manual. Los medios pueden aparecer como dispositivos separados y preferentemente se empaquetan juntos en forma de un kit. El experto en la materia conocerá cómo asociar los medios sin necesidad de habilidades inventivas adicionales. Los dispositivos preferentes son aquellos que pueden aplicarse sin los conocimientos particulares de un médico clínico especializado, por ejemplo tiras de ensayo o dispositivos electrónicos que meramente requieran cargar la muestra. Los resultados pueden proporcionarse como el resultado de datos en bruto diagnósticos paramétricos, preferentemente como datos absolutos o relativos. Debe entenderse que dichos datos requerirán la interpretación de un médico. Sin embargo, también se encuentran contemplados dispositivos de sistema experto en los que el resultado comprende datos en bruto diagnósticos procesados la interpretación de los cuales no requiere un médico especializado. Algunos dispositivos preferentes adicionales comprenden las unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo biosensores, matrices, soportes sólidos acoplados con ligandos que reconocen específicamente los polipéptidos, dispositivos de resonancia del plasmón superficial, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masas, etc.) o unidades/dispositivos de evaluación a los que se hace referencia anteriormente de acuerdo con los métodos de la invención.

La memoria describe además un kit para diferenciar en un paciente de insuficiencia cardiaca, la insuficiencia cardiaca anterógrada y/o la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, comprendiendo:

- 60 a) una unidad de análisis para determinar la cantidad de proPS-B y NT-proPNO en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca,  
 b) una unidad de evaluación para comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia adecuada y para diferenciar la insuficiencia cardiaca anterógrada y/o la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.

65

Finalmente, la memoria describe un kit para diagnosticar en un paciente de insuficiencia cardiaca, la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, comprendiendo:

- 5 a) una unidad de análisis para determinar la cantidad de proPS-B en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca,  
 b) una unidad de evaluación para comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia adecuada y para diagnosticar la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.

10 Las definiciones de los términos y realizaciones con respecto a los métodos de la invención se aplican, *mutatis mutandis*, a los dispositivos y kits indicados en la presente memoria.

15 El término "kit" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una colección de los medios anteriormente indicados, preferentemente proporcionados separadamente o dentro de un único recipiente. El recipiente, también preferentemente, comprende instrucciones para llevar a cabo el método de la presente invención. De esta manera, la invención se refiere a un kit que comprende medios o un agente para medir un polipéptido al que se hace referencia en la presente memoria. Los ejemplos de dichos medios o agentes, así como de los métodos para su utilización, han sido proporcionados en la presente memoria. El kit preferentemente contiene los medios o agentes anteriormente indicados en una manera lista para utilizar. Preferentemente el kit puede comprender además instrucciones, por ejemplo un manual de usuario para interpretar los resultados de una o más determinaciones cualesquiera con respecto a los diagnósticos proporcionados por los métodos de la presente invención. En particular, dicho manual puede incluir información para asignar las cantidades de los polipéptidos determinados al tipo de diagnóstico. Se proporciona más información en otros sitios de la presente memoria. Además, dicho manual para el usuario puede proporcionar instrucciones sobre la utilización correcta de los componentes del kit para determinar la cantidad o cantidades del marcador biológico respectivo. Puede proporcionarse un manual de usuario en forma de papel o electrónica, por ejemplo almacenado en CD o CD-ROM. La memoria describe además la utilización de dicho kit en cualquiera de los métodos según la presente invención.

Figuras:

30 Figura 1: A) correlación entre NT-proPNO y proSP-B. ProPS-B y NT-proPNO no estaban correlacionados, confirmando que NT-proPNO como marcador biológico de la función cardiaca y proPS-B como marcador biológico del daño pulmonar proporcionan información diferente. B) Algunos ejemplos de pacientes específicos ilustran en mayor detalle este resultado.

35 Figura 2: correlación entre las concentraciones de proPS-B y del fragmento C de proPS-B. Los niveles de proPS-B se correlacionan bastante bien con los niveles del fragmento C de proPS-B, excepto en unos cuantos pacientes que presentaban concentraciones elevadas de proPS-B y de fragmento C de proPS-B.

40 Figura 3: correlación entre proPS-B y la presión AP sistólica. En pacientes con descompensación cardiaca, las concentraciones de proPS-B tendían a incrementarse con la presión arterial pulmonar sistólica, lo que se considera un signo de insuficiencia cardiaca retrógrada.

#### Ejemplos:

45 A continuación se ilustra la invención mediante los ejemplos siguientes que, sin embargo, no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

#### Ejemplo 1:

50 Se determinó NT-proPNO en suero utilizando el ensayo ELISA de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia de Roche llamado Elecsys proBNP II STAT (por sus siglas en inglés, tiempo de renovación corto). El ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales que reconocen epítopos situados en la parte N-terminal (1-76) de proPNO (1-108).

55 Se sometieron a ensayo proPS-B y el fragmento C de proPS-B en suero utilizando un inmunoensayo recién desarrollado según el principio de ELECSYS. El ensayo de proPS-B utiliza dos anticuerpos monoclonales, uno dirigido al extremo N-terminal y uno dirigido al extremo C-terminal (correspondiente el fragmento C de proPS-B a los residuos aminoácidos 280 a 381) de la molécula de proPS-B. De esta manera, el ensayo del fragmento C de proPS-B detecta las diferentes formas de degradación de esta molécula.

#### Ejemplo 2:

60 Se incluyeron en el estudio un total de 74 pacientes con enfermedad arterial coronaria (AEC) clínicamente estable confirmada mediante angiografía. Todos los pacientes presentaban una fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) no alterada superior a 60% según ensayo ecocardiográfico, resultados radiográficos de tórax normales y no presentaban síntomas clínicos; además, el examen físico no reveló signos de insuficiencia cardiaca, tales como

estertores, o un tercer o cuarto sonido cardiaco. Además, no presentaban enfermedades concomitantes manifiestas y, concretamente, pulmonares. Además, los pacientes no eran fumadores. Tampoco presentaban una función renal alterada, según evaluación a partir de niveles de creatinina dentro de los rangos normales.

- 5 Se resumen los resultados en la Tabla 1, a continuación, que indican la mediana y, además, los percentiles 25 y 75 entre paréntesis.

Tabla 1:

	NT-proPNO (pg/ml)	proPS-B (ng/ml)	fragmento C de proPS-B (ng/ml)
Grupo total N = 74	144 (67/283)	29 (23/52)	60 (42/104)
Subgrupo bajo mediana de NT-proPNO N = 37	63 (35-96)	27 (22/49)	59 (42/91)
Subgrupo sobre mediana de NT-proPNO N = 37	287 (223-322)	34 (25/54)	76 (44/107)

- 10 Los datos obtenidos para proPS-B y el fragmento C de proPS-B en pacientes con EAC son compatibles con sujetos normales no fumadores, indicando que una disfunción cardiaca moderada no resulta en daños alveolares significativos.

- 15 Las extracciones de sangre por triplicado en un solo punto temporal y los análisis de proPS-B y del fragmento C de proPS-B demostraron que las variaciones en los resultados obtenidos eran inferiores a 5%, indicando que los cambios superiores a este límite deben considerarse un cambio en el daño pulmonar en el paciente individual.

### Ejemplo 3:

- 20 También se sometió a ensayo un grupo adicional de 92 pacientes con insuficiencia cardiaca descompensada del lado izquierdo. Los pacientes incluidos no sufrían de ningún trastorno pulmonar independiente. Fueron admitidos a la unidad de urgencias por el agravamiento de los síntomas de insuficiencia cardiaca en las últimas dos semanas. Todos los pacientes estaban bajo terapia estándar para insuficiencia cardiaca, que incluía beta-bloqueantes, inhibidores de la ECA y/o bloqueantes de receptores de la angiotensina y diuréticos.

- 25 Se resumen los resultados en la Tabla 2, a continuación, que indican la mediana y, además, los percentiles 25 y 75 entre paréntesis.

Tabla 2:

	NT-proBNP (pg/ml)	proSP-B (ng/ml)	fragmento C de proPS-B (ng/ml)	proPS-B/ NT-proPNO	fragmento C de proPS-B /NT-proPNO
Todos los pacientes	4478 (1878-8908)	127 (79-211)	296 (157-483)		
Tercil 1	1228 (810-1878)	105 (65-163)	246 (133-442)	0,08 (0,04-0,18)	0,16 (0,09-0,44)
Tercil 2	4478 (3719-5773)	127 (79-218)	311 (155-551)	0,03 (0,02-0,05)	0,07 (0,04-0,12)
Tercil 3	10739 (9152-14867)	157 (102-213)	350 (212-505)	0,01 (0,01-0,02)	0,03 (0,02-0,059)

- 30 Tal como puede observarse en la figura 1, al correlacionar NT-proPNO, como marcador de la función cardiaca, con proPS-B, como marcador del daño pulmonar, ambos marcadores no proporcionaba información idéntica.

- 35 Al correlacionar proPS-B con el fragmento C de proPS-B, ambos marcadores de daño pulmonar proporcionaron información en gran medida idéntica, indicando que la información proporcionada por dichos marcadores es comparable, tal como puede derivarse de la figura 2.

- 40 Al correlacionar la presión arterial pulmonar evaluada mediante ecocardiografía con proPS-B, se asociaron las concentraciones incrementadas de proPS-B con una presión arterial pulmonar incrementada, en donde la presión AP representa un signo de insuficiencia cardiaca retrógrada (de larga duración); ver la figura 3. De acuerdo con lo anterior, se ha encontrado que la insuficiencia retrógrada del ventrículo izquierdo está asociada a un nivel incrementado de proPS-B, muy probablemente como resultado de la congestión de la vasculatura pulmonar que conduce a la fuga de proPS-B hidrofílico a partir de las células alveolares de tipo II a la circulación. En contraste, no se produce o hay menos congestión de la vasculatura pulmonar reflejada en niveles no elevados de proPS-B en los
- 45 pacientes que sufren de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo. De esta manera, un nivel incrementado de proPS-B es un marcador de la insuficiencia retrógrada del ventrículo izquierdo.

La determinación de ambos marcadores, NT-proPNO y proPS-B (o el fragmento C de proPS-B), resulta ventajosa, ya que la proporción entre las cantidades de ambos marcadores biológicos permite realizar un diagnóstico

particularmente fiable de insuficiencia cardiaca anterógrada y/o insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en sujetos con insuficiencia cardiaca. De esta manera, la evaluación combinada de NT-proPNO y proPS-B (o fragmento C de proPS-B) permite una disección más definida de los pacientes que sufren de insuficiencia cardiaca, al diferenciar entre la insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada (del ventrículo izquierdo). Lo anterior también se muestra en los ejemplos individuales en la figura 1B.

Los pacientes caracterizados como de insuficiencia cardiaca anterógrada presentaban una presión sanguínea sistémica inferior (91 más/menos 8 mmHg) a la de los pacientes con insuficiencia cardiaca retrógrada (112 más/menos 12 mmHg). Los pacientes con insuficiencia cardiaca anterógrada también presentaban una FEVI inferior a la de los pacientes con insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo (2% vs. 40%, respectivamente). Además, presentaban pulsos periféricos muy débiles y extremidades frías; estas últimas características no se encontraban presentes en los pacientes diagnosticados con insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.

**Ejemplo 4:**

También se incluyeron en el estudio un total de 32 pacientes con insuficiencia cardiaca clínicamente estable. Todos los pacientes estaban sometidos a terapia estándar para insuficiencia cardiaca, que incluía beta-bloqueantes, inhibidores de la ECA y/o bloqueantes de los receptores de la angiotensina y diuréticos. Se visitaron los pacientes a intervalos de 2 semanas, resultando en un total de 3 visitas para cada paciente. Durante ese periodo el tratamiento permaneció estable y no se produjeron sucesos clínicos. La función renal era normal en el momento de iniciar el estudio y se mantuvo normal durante la duración del estudio.

Se resumen los resultados en la Tabla 3, a continuación, que indican la mediana y los percentiles 25 y 75 entre paréntesis.

Tabla 3:

	NT-proPNO (pg/ml)	proPS-B (ng/ml)	fragmento C de proPS-B (ng/ml)
Punto temporal 1 (PT1)	356 (184-820)	53 (34-67)	111 (67-153)
Punto temporal 2 (PT2)	424 (188-938)	51 (34-96)	107 (66-211)
Punto temporal 3 (PT3)	476 (219-719)	51 (29-89)	104 (64-209)

En todos los pacientes los valores de la mediana de NT-proPNO se incrementaron ligeramente y los de proPS-B permanecieron sin cambios, excepto para dos pacientes. Se muestran estos casos a continuación, en la Tabla 4, en la que PT representa punto temporal.

Tabla 4:

<b>Paciente 1</b>			
	NT-proPNO (pg/ml)	proPS-B (ng/ml)	fragmento C de proPS-B (ng/ml)
PT1	1008	62	116
PT2	1773	152	443
PT3	1319	68	128

<b>Paciente 2</b>			
	NT-proPNO (pg/ml)	proPS-B (ng/ml)	fragmento C de proPS-B (ng/ml)
PT1	1092	39	102
PT2	1497	39	88
PT3	2058	48	95

Tal como puede observarse en el paciente 1, el empeoramiento de la función cardiaca se asociaba a un incremento de proPS-B como signo de insuficiencia cardiaca retrógrada (PT2), que mejoró a medida que mejoraba la función cardiaca (PT3). Este paciente también presentaba concentraciones más altas de proPS-B en el momento de iniciar el estudio, en comparación con el paciente 2. Ambos presentaban niveles similares de NT-proPNO en el momento de iniciar el estudio. En contraste con lo anterior, el paciente 2 no mostraba evidencia de insuficiencia cardiaca retrógrada y los niveles de proPS-B y de fragmento C de proPS-B de este paciente permanecieron estables, aunque el nivel de NT-proPNO se incrementó significativamente, indicando insuficiencia cardiaca anterógrada.

**Ejemplo 5:**

Se sometió a ensayo un total de 16 pacientes con diferentes estadios de estenosis de la válvula aórtica antes y 3 meses después de la sustitución de una válvula.

Se resumen los resultados en la Tabla 5, a continuación, que indican la mediana y los percentiles 25 y 75.

5

Tabla 5:

	NT-proPNO (pg/ml)	proPS-B (ng/ml)	fragmento C de proPS-B (ng/ml)
T0 (antes de la sustitución)	1415 (476/3320)	91 (58/149)	196 (115/378)
T1 (3 meses después de la sustitución)	461 (295/1015)	60 (43/126)	128 (97/258)

Tal como puede observarse en la Tabla 5, los valores de mediana de NT-proPNO se redujeron significativamente tras la sustitución de la válvula aórtica, indicando que había mejorado la función cardiaca. Éste era también el caso para la afectación pulmonar secundaria. El valor de combinar las mediciones de NT-proPNO y proPS-B (o el fragmento C de proPS-B) se demuestra para ejemplos concretos, mostrados en la Tabla 6.

10

Tabla 6:

	NT-proPNO (pg/ml)	proPS-B (ng/ml)	fragmento C de proPS-B (ng/ml)
<b>Caso 30</b>			
T0 (antes de la sustitución)	200	42	92
T1 (3 meses después de la sustitución)	211	50	98
<b>Caso 21</b>			
T0 (antes de la sustitución)	731	30	90
T1 (3 meses después de la sustitución)	430	31	73

15

Los dos casos anteriores demuestran una disfunción cardiaca moderada y ninguna afectación pulmonar significativa. Aunque el caso 30 no mostró ningún cambio tras la sustitución de válvula, el caso 21 mostró una mejora de la insuficiencia cardiaca anterógrada sin evidencia de insuficiencia cardiaca retrógrada.

20

Tabla 7:

	NT-proPNO (pg/ml)	proPS-B (ng/ml)	fragmento C de proPS-B (ng/ml)
<b>Caso 26</b>			
T0 (antes de la sustitución)	10300	301	475
<b>Caso 26</b>			
T1 (3 meses después de la sustitución)	779	122	277
<b>Caso 42</b>			
T0 (antes de la sustitución)	6645	317	548
T1 (3 meses después de la sustitución)	325	37	75
<b>Caso 37</b>			
T0 (antes de la sustitución)	4935	169	451
T1 (3 meses después de la sustitución)	222	148	416
<b>Caso 14</b>			
T0 (antes de la sustitución)	2593	265	597
T1 (3 meses después de la sustitución)	2197	138	346

Tal como puede observarse en los casos individuales en la Tabla 7, la enfermedad de la válvula aórtica estaba asociada a una disfunción cardiaca significativa y a una afectación pulmonar secundaria en todos los pacientes. Todos excepto uno (caso 14) mostraron una mejora significativa de la función cardiaca. Lo anterior estaba asociado a la normalización de la afectación pulmonar en un paciente (caso 42) y a la mejora de dos pacientes (casos 26 y 37). El caso 14 mostró una mejora de la insuficiencia cardiaca retrógrada con poca o ninguna mejora de la función cardiaca y la insuficiencia cardiaca anterógrada.

25

De esta manera, los casos individuales demuestran el valor clínico de la medición combinada de NT-proPNO y proPS-B (o del fragmento C de proPS-B) en la evaluación del paciente con respecto a la forma predominante de insuficiencia cardiaca, es decir, la insuficiencia cardiaca retrógrada, la insuficiencia cardiaca anterógrada o la combinación.

30

La sustitución de válvula se asoció a una mejora significativa del gasto cardiaco y, de esta manera, de la función cardiaca según evaluación mediante ecocardiografía (y la reducción de los valores de NT-proPNO). La reducción de la cantidad de proPS-B se asoció a la desaparición de los estertores en aquellos pacientes que presentaban dichos signos antes de la sustitución de válvula.

5

**Ejemplo 6:**

Tal como se demuestra en los Ejemplos 1 a 5, la determinación combinada de proPS-B y/o del fragmento C de proPS-B y NT-proPNO permite estimar la forma predominante de insuficiencia cardiaca del lado izquierdo. La insuficiencia cardiaca retrógrada que se asocia a congestión pulmonar puede tratarse mediante reducción del volumen intravasal, por ejemplo la utilización de diuréticos del asa inicialmente y posteriormente el equilibrado cuidadoso de diuréticos alternativos en combinación con otros fármacos para la insuficiencia cardiaca tales como inhibidores del ECA, los BRA, los beta-bloqueantes y los antagonistas del calcio. En contraste con los casos de insuficiencia cardiaca anterógrada dependientes del mecanismo subyacente, puede estar indicado el tratamiento con marcapasos, desfibriladores, dispositivos de asistencia o fármacos (tales como dobutamina). De esta manera, la medición combinada de proPS-B y NT-proPNO permite un tratamiento más sofisticado de la insuficiencia cardiaca de lado izquierdo.

10

15

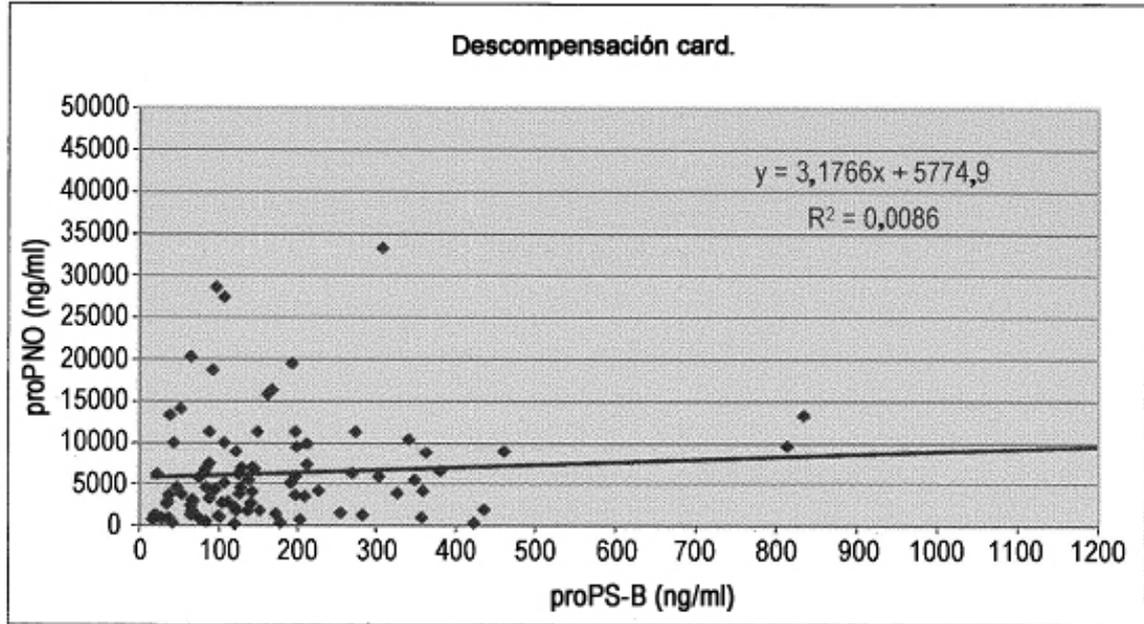
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para diferenciar en un paciente de insuficiencia cardiaca entre (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, comprendiendo el método las etapas de:
- 10 a) determinar en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca la proporción entre la cantidad de proPS-B y la cantidad de NT-proPNO, y  
b) comparar la proporción entre proPS-B y NT-proPNO determinada en la etapa a) con por lo menos una proporción de referencia de proPS-B y NT-proPNO, diferenciando de esta manera entre: (i) insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que por lo menos una proporción de referencia se deriva (i) de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo y/o (iii) de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que la proporción determinada es la proporción entre proPS-B y NT-proPNO, y en el que:
- 25 (i) una proporción entre proPS-B y NT-proPNO en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a la proporción de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada, o que es inferior a dicha proporción de referencia, es indicativa de insuficiencia cardiaca anterógrada,  
30 (ii) una proporción entre proPS-B y NT-proPNO en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a la proporción de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, o que es superior a dicha proporción de referencia, es indicativa de insuficiencia cardiaca retrógrada y/o  
35 (iii) una proporción entre proPS-B y NT-proPNO en el sujeto de ensayo esencialmente idéntica a la proporción de referencia de una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca de referencia que sufre de insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo es indicativa de insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.
- 40 4. Método para diferenciar en un paciente de insuficiencia cardiaca entre (i) la insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, comprendiendo el método las etapas de:
- 45 a) determinar en una muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca la cantidad de proPS-B,  
b) comparar la cantidad de proPS-B con por lo menos una cantidad de referencia de proPS-B, diferenciando de esta manera entre: (i) insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo en dicho paciente de insuficiencia cardiaca.
- 50 5. Método para el seguimiento en un paciente de insuficiencia cardiaca con un incremento o reducción significativa de la cantidad de NT-proPNO, de (i) insuficiencia cardiaca anterógrada, (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo e (iii) insuficiencia cardiaca anterógrada y la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, comprendiendo el método las etapas de:
- 55 a) determinar la cantidad de proPS-B en una primera muestra de un paciente de insuficiencia cardiaca la en un primer punto temporal,  
b) determinar la cantidad de proPS-B en una segunda muestra de dicho paciente de insuficiencia cardiaca en un segundo punto temporal, obteniendo dicha segunda muestra después de dicha primera muestra, y, opcionalmente,  
60 c) comparar la cantidad de proPS-B determinada en la primera muestra con la cantidad de proPS-B determinada en la segunda muestra, en el que una cantidad estable de proPS-B o una reducción de la cantidad de proPS-B en la segunda muestra respecto a la primera muestra es indicativa de (i) insuficiencia cardiaca anterógrada, o (ii) insuficiencia cardiaca anterógrada e insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo, y un incremento de la cantidad de proPS-B en la segunda muestra es indicativa de (ii) insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo.
- 65 6. Método según la reivindicación 5, en el que la insuficiencia cardiaca es insuficiencia cardiaca avanzada, más preferentemente de estadio C, más preferentemente insuficiencia cardiaca de estadio D.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la insuficiencia cardiaca anterógrada se caracteriza por la incapacidad del corazón de bombear sangre a una tasa suficiente para cumplir la demanda de oxígeno del cuerpo en reposo o en ejercicio.
- 5 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la insuficiencia cardiaca retrógrada del ventrículo izquierdo se caracteriza por la capacidad del corazón de bombear sangre a una tasa suficiente únicamente en el caso de que las presiones de llenado del corazón sean anormalmente elevadas.
- 10 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra es una muestra de sangre, suero o plasma.

**Fig. 1**

**A)**



**B)**

Número de paciente	NT-proPNO (ng/ml)	proPS-B (ng/ml)	fragmento C (ng/ml)	Interpretación
110	2777	73	35	IC anterógrada
111	384	519	179	IC retrógrada
118	1009	2216	358	IC retrógrada
149	794	73	29	IC anterógrada
152	4132	1235	359	IC retr. y ante.
160	2509	61	34	IC anterógrada
207	361	2463	424	IC retrógrada

Fig. 2

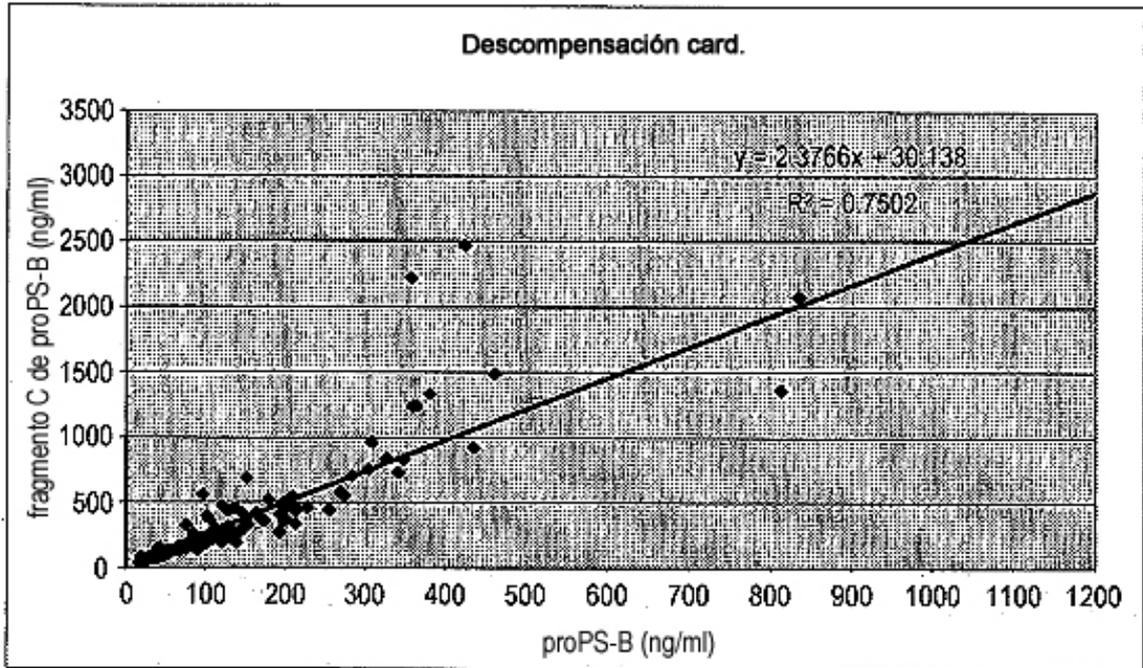


Fig. 3

