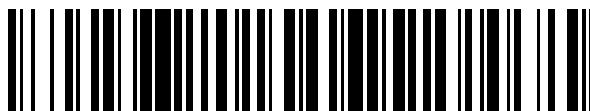


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 460**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2010 E 10778941 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2496946**

54 Título: **NT-pro ANP y sFlt-1 para la diferenciación entre los eventos isquémicos y circulatorios**

30 Prioridad:

03.11.2009 EP 09174873

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

28.10.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HESS, GEORG;
ZDUNEK, DIETMAR y
HORSCH, ANDREA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 549 460 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).

DESCRIPCION

NT-pro ANP y sFlt-1 para la diferenciación entre los eventos isquémicos y circulatorios

- 5 La presente invención se refiere al campo del diagnóstico de laboratorio. En concreto, se dan a conocer medios y métodos para diferenciar entre un evento circulatorio agudo y un evento isquémico como la causa subyacente de un evento médico agudo de un paciente.
- 10 Los pacientes en unidades de emergencia o en los servicios de urgencia de los hospitales a menudo presentan con desarrollo súbito, condiciones que son potencialmente mortales. La extensión y la duración de dichas condiciones son con frecuencia desconocidas. Los primeros pasos de la terapia son necesariamente dirigidos al apoyo de las funciones vitales del paciente, por ejemplo, por la ventilación mecánica, el suministro de fluidos, la transfusión de sangre, la desfibrilación, la estimulación o la farmacoterapia externa (por ejemplo, con epinefrina o vasopresina
- 15 ventricular, con epinefrina, atropina o bicarbonato de sodio contra asistolia). Sin embargo, en la mayoría de los casos la discapacidad de las funciones vitales es sólo el síntoma de otra condición preexistente. Una terapia exitosa para el paciente, por lo tanto, requiere un tratamiento de la causa subyacente de la condición aguda. En los casos de traumatismos la causa puede ser obvia. En otros casos, puede ser más difícil de encontrar. La disnea, por ejemplo, puede ser causada por condiciones tan diversas como la insuficiencia cardíaca, neumonía, sepsis,
- 20 síndrome de dificultad respiratoria aguda y embolia pulmonar. Síncope, la pérdida transitoria de la conciencia y del tono postural, puede ocurrir de repente y sin aviso o puede ser precedido por síntomas como mareo, vértigo, una sensación de calor, náuseas, sudoración y visión borrosa. La diferenciación entre síncope y convulsiones es importante y en algunos casos difícil. El mecanismo fisiopatológico subyacente síncope es la desregulación basal. La desregulación basal puede tener una variedad de causas. Entre las causas cardíacas están incluidas, la embolia pulmonar, el infarto agudo de miocardio, las arritmias cardíacas (bradiarritmias, así como taquiarritmias) o la cardiomiopatía hipertrofica obstructiva. El síncope también puede ser causada por la activación del sistema nervioso parasimpático. Esto puede ser provocado por eventos tales como los estímulos dolorosos o desagradables, mucho tiempo de pie, cambio rápido de un estado de descanso en una posición vertical, la hipertermia o micción. Otro síntoma inespecífico que se asocia a menudo con condiciones que amenazan la vida es dolor torácico agudo. Puede ser causado por la angina estable, eventos cardiovasculares agudos (angina inestable o infarto de miocardio), embolia pulmonar, úlcera péptica o neumonía.
- 25 El diagnóstico diferencial tiene en cuenta la historia del paciente e incluye un examen clínico. Estos procedimientos requieren el consumo de tiempo. La administración de analgésicos puede reducir el valor diagnóstico de un examen clínico. Por otra parte, es difícil o imposible de obtener información sobre la historia del paciente, si el paciente sufre de conciencia reducida o está siendo ventilado mecánicamente. Sin embargo, un diagnóstico rápido permite una rápida iniciación de una terapia adecuada, reduce el sufrimiento del paciente y aumenta sus / sus posibilidades de supervivencia.
- 35 Clínicamente, los eventos isquémicos se caracterizan por dolor, palidez de la piel y pulso débil o ausente en el área afectada. Además, los métodos basados en imágenes, como la ecografía, la tomografía computarizada, la resonancia magnética con y sin agente de contraste, angiografía y gammagrafía pueden ser utilizados.
- 40 Hasta el momento, las complicaciones isquémicas han sido diagnosticadas por ejemplo de la siguiente manera. Por ejemplo, mediante la evaluación inicial de los pacientes con dolor en el pecho que implican un electrocardiograma (ECG) y los marcadores cardíacos como las troponinas. Estas pruebas son muy específicas pero muy insensibles y con frecuencia implican la necesidad de más pruebas para lograr un diagnóstico preciso. Otro medio es la imagen por magnetocardiografía que utiliza dispositivos superconductores de interferencia cuántica para detectar los campos magnéticos débiles generados por campos eléctricos del corazón. Existe una correlación directa entre la despolarización cardíaca anormal o la repolarización y la anomalía en el mapa de campo magnético. Este método está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) como un dispositivo de seguridad para la detección no invasiva de isquemia. Los medios antes mencionados son, complicados, lentos y no muy sensibles.
- 45 Las complicaciones circulatorias hasta el momento se han detectado por la presencia de la presión arterial anormal. En ocasiones, la presencia de la arritmia cardíaca y los eventos cardiovasculares agudos se ha utilizado como un indicador adicional para determinar las complicaciones circulatorias. Los métodos conocidos para la detección de eventos circulatorios no permiten el diagnóstico de complicaciones temporales. Además, los métodos conocidos en la técnica no proporcionan información cuantitativa acerca de la gravedad de una complicación circulatoria.
- 50 Por lo tanto, hay una necesidad de pruebas de diagnóstico rápido que puedan, por ejemplo ser utilizadas en el punto de atención para ayudar al diagnóstico de las causas subyacentes de funciones vitales críticamente reducidas en un paciente. En particular, hay una necesidad para el diagnóstico de si un evento médico agudo en un paciente de emergencia está asociado con uno circulatorio y/o una complicación isquémica. Sin embargo, otra necesidad reside en la provisión de dispositivos y de kits adecuados o adaptados para llevar a cabo el diagnóstico antes mencionado.
- 60
- 65

Por consiguiente, el problema subyacente de la presente invención puede ser visto como proporcionar medios y métodos para cumplir con la necesidad descrita anteriormente.

El problema se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en la descripción debajo.

5 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar rápidamente si un evento médico agudo en un paciente de emergencia está asociado con uno circulatorio y/o una complicación isquémica, que comprende las etapas de

- 10 a) determinar la cantidad de un péptido de tipo ANP en una muestra de un paciente;
 b) determinar la cantidad de sFlt-1 en una muestra de un paciente;
 c) comparar las cantidades medidas en las etapas a) y b) para hacer referencia a cantidades; y
 d) establecer de un diagnóstico basado en los resultados de c).

15 El término "evento médico agudo" se refiere a una condición de un paciente que induce o provoca que el paciente busque ayuda médica. Dicha condición puede ser una enfermedad grave, potencialmente mortal, como un fracaso de las funciones vitales del cuerpo. Sin embargo, como la necesidad de asistencia médica es percibida por el paciente y por lo tanto está sujeta a su impresión subjetiva, la condición puede también ser inofensiva. Un fallo de las funciones vitales del cuerpo, preferiblemente, se refiere al fallo repentino de órganos cuyas funciones son esenciales para la supervivencia. También preferiblemente, el término se refiere al deterioro repentino de una condición previamente estable. Los órganos cuyas funciones son esenciales para la supervivencia son, preferiblemente, el pulmón, el corazón, los riñones y el hígado. Las consecuencias de la insuficiencia de estos órganos dependen del órgano en cuestión. Los signos de insuficiencia de los órganos incluyen, dependiendo del dolor del órgano afectado, acidosis metabólica, anuria, encefalopatía hepática, la oxigenación insuficiente de la sangre y la pérdida de la conciencia. Sin embargo, el diagnóstico de insuficiencia orgánica por sí solo no proporciona suficiente indicación para una terapia adecuada.

30 El término "complicación circulatoria" se refiere a un deterioro repentino de la función del corazón. Un deterioro como ese, preferiblemente, es causado por arritmia cardíaca, paro cardíaco transitorio o embolia pulmonar. La arritmia cardíaca puede ocurrir de dos formas: bradiarritmias y taquiarritmias. En bradiarritmia la frecuencia de los latidos del corazón se reduce patológicamente en comparación con un sujeto sano, preferiblemente en bradiarritmia la frecuencia cardíaca es inferior a 60 latidos por minuto. Las formas más frecuentes de bradiarritmias son bradicardia sinusal, bloqueo sinoauricular, paro sinusal, el síndrome del seno enfermo y el bloque atrioventricular. En taquiarritmia la frecuencia se incrementa patológicamente cuando se compara con un sujeto sano, preferiblemente en bradiarritmia la frecuencia cardíaca es superior a 100 latidos por minuto. La mayoría de los casos de taquiarritmias son la taquicardia supraventricular con enfermedad cardiovascular estructural, la fibrilación auricular con el síndrome de Wolff-Parkinson-White, el aleteo auricular 1:1 con la conducción atrioventricular y la taquicardia ventricular. La embolia pulmonar es causada por la oclusión de una arteria pulmonar por un coágulo de sangre (tromboembolismo) o una burbuja de aire (embolia gaseosa). Típicamente, los coágulos de sangre se forman en las venas de las extremidades pélvicas o más bajas y migran a las arterias pulmonares donde se quedan atascados. El embolismo aéreo es, preferentemente, causado por un accidente de buceo o mediante catéteres venosos con fugas. Los síntomas de una embolia pulmonar incluyen dolor de pecho, disnea y hemoptisis (tos con sangre). La presión en la circulación pulmonar puede elevarse y puede causar el fallo del ventrículo derecho. Complicaciones circulatorias pueden así ser determinadas o confirmadas por los métodos conocidos hasta ahora descritos en detalle más arriba.

45 El término "complicación isquémica" se refiere a una hipoxia que ocurre de repente en cualquier tejido u órgano. Preferiblemente, el término se refiere a la isquemia del bazo, intestino, riñón, corazón o las extremidades. Con frecuencia, la isquemia aguda es causada por la formación de coágulos de sangre en una arteria en la circulación sistémica. Las partes del órgano que se basan en la arteria ocluida para su suministro de sangre son entonces separadas de su suministro de sangre. La disminución de la presión arterial es otra causa frecuente de isquemia. Dependiendo de la duración de la isquemia, la demanda de oxígeno del tejido isquémico y el suministro de sangre restante, el tejido afectado pueden morir por necrosis. Complicaciones isquémicas pueden ser así determinadas o confirmadas por los métodos conocidos hasta ahora descritos en detalle más arriba. Preferiblemente, una complicación isquémica según se usa aquí se caracteriza por una presión arterial sistólica de menos de 80 mmHg. Por otra parte, la complicación isquémica es también, preferiblemente, caracterizada por el dolor específico de los órganos, un pulso reducido en la zona afectada y/o frialdad de la piel.

60 Un evento médico agudo se asocia con complicaciones circulatorias y/ isquémicas si dichas complicaciones preceden o acompañan al evento médico agudo. Si dichas complicaciones preceden al evento médico agudo que, preferiblemente, tener lugar 1, 2, 3 o 4 horas antes de que el paciente busca ayuda médica. Preferiblemente, el evento médico aguda es causada por dichas complicaciones.

65 El término "diagnosticar si un evento médico agudo en un paciente de emergencia está asociado con una circulatorio y / o una complicación isquémica" tal como se utiliza aquí se refiere a la identificación del trastorno fisiopatológico o la condición que acompaña o precede al evento médico agudo que el paciente está sufriendo o que fue diagnosticado cuando el paciente se presentó en la unidad hospitalaria o de emergencia. Como se entenderá por los

5 expertos en la técnica, tal evaluación por lo general no pretende ser correcta para el 100% de los sujetos a ser diagnosticados. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda ser diagnosticada correctamente de sufrir la enfermedad o condición. Si una porción es estadísticamente significativa se puede determinar sin más dificultad por el experto en la técnica utilizando diversas herramientas conocidas estadísticas de evaluación, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, determinación valor p, prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, Statistics para la Investigación, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son por lo menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. Los valores de p son, preferentemente, 0,1; 0,05; 0,01; 0,005 o 0,0001. Preferiblemente, la probabilidad prevista por la presente invención permite que el diagnóstico será correcto durante por lo menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% de los sujetos de una cohorte o población dada.

15 Si el método de la presente invención muestra que el paciente ha sufrido de hecho una complicación isquémica y/o circulatoria, esto indica que el paciente sufre de una condición grave, potencialmente mortal y requiere atención médica.

20 La evaluación de acuerdo con el método de la presente invención es, preferiblemente, una evaluación rápida. Una evaluación rápida es, preferentemente, actuar en el punto de atención. Preferiblemente, los resultados de la evaluación están disponibles en menos de aproximadamente 30 minutos, unos 60 minutos o aproximadamente 120 minutos después del ingreso del paciente a la unidad de emergencia, tras el ingreso en la ambulancia de emergencia o después que es consultado por el primer médico o personal médico. Más preferiblemente la evaluación está disponible en menos de aproximadamente 60 minutos después de que el paciente busca primero la asistencia médica.

25 Preferiblemente, el método de la presente invención se practica en una unidad de emergencia. El término "unidad de emergencia" se refiere a cualquier lugar en el que las personas / pacientes con una condición médica de emergencia (real o presunta), acuden con el fin de consultar a una persona que tenga una formación médica, preferiblemente un médico, para tener un análisis de su estado patológico y la causa subyacente de su condición. Ejemplos típicos son los departamentos de emergencia o las salas de emergencia de los hospitales, las ambulancias de emergencia, consultorios médicos y otras instituciones adecuadas para el tratamiento de pacientes críticos.

35 Un "paciente de emergencia" es un paciente que se presenta a una unidad de emergencia o un paciente que desde la perspectiva de un médico, en base a los síntomas del paciente y su historial médico debe presentar a una unidad de emergencia.

El método de la presente invención es, preferiblemente, un método *in vitro*. Eso significa que la determinación del péptido respectivo (un péptido de tipo ANP o sFlt-1) o péptidos que se determinen se lleva a cabo *in vitro*.

40 Es de entenderse que el método de la presente invención es, preferiblemente, usado en combinación con otros métodos de diagnóstico. La persona experta en la técnica sabe que un diagnóstico diferencial casi siempre requiere la combinación de la historia del paciente, un examen clínico y pruebas de laboratorio. En consecuencia, el método de la presente invención es, preferiblemente, aplicado para guiar el examen más detallado de un paciente y para excluir pruebas innecesarias.

45 Para una mayor exploración del paciente, se prefieren los métodos basados en la imagen. La ecografía, tomografía computarizada, resonancia magnética con y sin agente de contraste, la angiografía y la gammagrafía son especialmente preferidos.

50 El término "péptido de tipo ANP" se refiere a ANP, proBNP, pre-proBNP y NT-proBNP, preferible NT-proANP. El ANP se sintetiza y se secreta por las aurículas. El ANP madura se genera por escisión secuencial de pre-proANP que comprende 151 aminoácidos. La escisión de un péptido señal (25 aminoácidos) da como resultado proANP (126 aminoácidos). Tras la secreción del propéptido se divide en el ANP biológicamente activo (de 28 aminoácidos) y la fracción inactiva N-terminal (98 aminoácidos). La facturación de ANP es rápida ya que sólo tiene una vida media de 2,5 minutos en la sangre. El ANP promueve la dilatación arterial sistémica, natriuresis, diuresis y la inhibición de la renina, la presión sanguínea, por lo tanto, se reduce por la acción del ANP (Bonow, 1,996, Circulation 93: 1946-1950).

60 El término "soluble Flt-1" o "sFlt-1" como se usa aquí, se refiere a un polipéptido que es una forma soluble del receptor de VEGF FLTL. Se identificó en un medio de cultivo condicionado de células humanas endoteliales de la vena umbilical. El receptor endógeno FLTL soluble (sFlt1) es cromatográficamente y inmunológicamente similar a sFlt1 humana y se une recombinante a VEGF con una alta afinidad comparable. El sFlt1 humano se ha observado *in vitro* que forma un complejo estabilizado-VEGF con el dominio extracelular de KDR / Flk-1. Preferiblemente, sFlt1 se refiere al sFlt1 humano. Más preferiblemente, sFlt1 humano puede deducirse de la secuencia de aminoácidos de Flt-1 como se muestra en Genebank número de acceso P17948, GI: 125361. Una secuencia de aminoácidos para sFlt1 ratón se muestra en Genebank número de acceso BAA24499.1, GI: 2809071.

Los términos " péptido tipo ANP " y "sFlt-1" usados aquí también abarcan variantes de los polipéptidos específicas del tipo ANP o sFlt-1 antes mencionada. Dichas variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales como los polipéptidos específicos del tipo ANP o sFlt-1. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos ensayos específicos mencionados en esta memoria descriptiva, por ejemplo, mediante ensayos ELISA utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos de tipo ANP o sFlt-1 polipéptidos. Por otra parte, ha de entenderse que una variante a la que se hace referencia de acuerdo con la presente invención deberá tener una secuencia de aminoácidos que difiere por sustitución debido a por lo menos un amino ácido, por delección y/o adición en el que la secuencia de aminoácidos de la variante es sin embargo, preferiblemente, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia amino de los polipéptidos específicos de tipo ANP o sFlt-1, preferiblemente en toda la longitud del péptido de tipo ANP específico (por ejemplo ANP humano, proANP humana, NTproANP humana) o de sFlt-1 humano específico, respectivamente. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante algoritmos bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, el grado de identidad se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, donde el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (por ejemplo, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para una alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que el residuo de aminoácido idénticos en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el total número de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Add. APL. Matemáticas. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), por la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTAS, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual. Dado que las dos secuencias se han identificado para la comparación, GAP y BESTFIT se emplean preferiblemente para determinar su alineación óptima y, por tanto, el grado de identidad. Preferiblemente, se utilizan los valores por defecto de 5,00 para el peso vacío y 0,30 para la longitud peso de hueco. Las variantes mencionadas anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otra especie de homólogos específicos, parálogos u ortólogos. Por otra parte, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento pueden incluir fragmentos o subunidades de la ANP de tipo específico o sFlt-1 polipéptidos o variantes los tipos antes mencionados de siempre que estos fragmentos presenten las propiedades biológicas y la inmunológica esencial a la que se hace referencia anteriormente. Tales fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de la degradación de péptidos de tipo ANP o sFlt-1. Además se incluyen las variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales como la fosforilación o miristilación.

La determinación de la cantidad de un péptido de tipo ANP o sFlt-1 o cualquier otro péptido o polipéptido se hace referencia en esta memoria descriptiva se refiere a la medición de la cantidad o concentración, preferiblemente semi-cuantitativamente o cuantitativamente. La medición puede hacerse directamente o indirectamente. La medición directa se refiere a la medición de la cantidad o concentración del péptido o polipéptido basándose en una señal que se obtiene a partir del péptido o polipéptido en sí y la intensidad de la misma que se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presente en la muestra. Esta señal - refiere a veces aquí como señal de intensidad - se puede obtener, por ejemplo, mediante la medición de un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta incluye la medición de una señal obtenida de un componente secundario (es decir, un componente que no es el péptido o polipéptido en sí) o un sistema de lectura biológico, por ejemplo, respuestas celulares medibles, ligandos, etiquetas o productos de reacción enzimática.

De acuerdo con la presente invención, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido puede lograrse por todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos y métodos que pueden utilizar moléculas marcadas en varios sándwich, la competencia, u otros formatos de pruebas de inmunoensayo. En dichos ensayos se desarrolla una señal que es indicativa de la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Por otra parte, la intensidad de la señal puede, preferiblemente, correlacionarse directa o indirectamente (por ejemplo inversa proporcional) a la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Además los métodos adecuados comprenden medir una propiedad física o química específica para el péptido o polipéptido como su masa molecular exacta o espectro de RMN. Dichos métodos comprenden, preferiblemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos como espectrómetros de masa tales, analizadores de RMN-, o dispositivos de cromatografía. Además, los métodos incluyen métodos de micro-placa basados en ELISA, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (disponibles por ejemplo en los analizadores Elecsys™), CBA (Ensayo de unión enzimática a cobalto, disponible por ejemplo en los analizadores Roche-Hitachi™) y ensayos de aglutinación de látex (disponibles por ejemplo en los analizadores Roche-Hitachi™).

Preferiblemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende las etapas de (a) poner en contacto una célula capaz de provocar una respuesta celular cuya intensidad sea indicativa de la cantidad del péptido o polipéptido en relación con dicho péptido o polipéptido durante un período adecuado de tiempo, (b) medir

la respuesta celular. Para la medición de la respuesta celular, la muestra o muestra procesada es, preferiblemente, añadida a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión mensurable de un gen informador o la secreción de una sustancia, por ejemplo, un péptido, polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia generará una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad de péptido o polipéptido.

También preferiblemente, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica obtenible a partir del péptido o polipéptido en la muestra. Como se describió anteriormente, tal señal puede ser la intensidad de señal observada a una m/z variable específica para el péptido o polipéptido observada en los espectros de masas o un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido, preferiblemente, comprende las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una intensidad de señal. El enlace de acuerdo con la presente invención incluye el enlace covalente y no covalente. Un ligando de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier compuesto, por ejemplo, un péptido, polipéptido, ácido nucleico, o molécula pequeña, unido al péptido o polipéptido descrito en la presente memoria. Los ligandos preferidos incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos como receptores o parejas de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos que comprenden los dominios de unión de los péptidos y aptámeros, por ejemplo, ácidos nucleicos o péptidos aptámeros. Los métodos para preparar dichos ligandos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados se ofrece también por los proveedores comerciales. La persona experta en la técnica está familiarizada con los métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, las mutaciones aleatorias pueden introducirse en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Estos derivados pueden entonces ser probados para la unión de acuerdo con procedimientos de cribado conocidos en la técnica, por ejemplo presentación de fagos. Los anticuerpos como se refiere en el presente documento incluyen tanto anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como Fv, Fab y F(ab)₂, que son capaces de unirse al antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos híbridos humanizados en donde las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que exhiben una especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donantes incluirán generalmente al menos los residuos de aminoácidos de unión a antígeno del donante pero pueden comprender otros residuos de aminoácidos estructuralmente y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donador también. Tales híbridos pueden prepararse mediante varios métodos bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido. La unión específica de acuerdo con la presente invención significa que el ligando o agente no debe unirse sustancialmente a ("reacción cruzada") con otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra a analizar. Preferiblemente, el péptido o polipéptido unido específicamente deben estar unidos con una afinidad al menos 3 veces mayor, más preferiblemente al menos 10 veces superior e incluso más preferiblemente al menos 50 veces mayor que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si es que todavía se puede distinguir y medir de forma inequívoca, por ejemplo, de acuerdo con su tamaño en un Western Blot, o por su relativamente mayor abundancia en la muestra. La unión del ligando puede medirse por cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente, dicho método es semicuantitativo o cuantitativo. Los métodos adecuados se describen a continuación.

En primer lugar, la unión de un ligando puede medirse directamente, por ejemplo, por resonancia de plasmón superficial o RMN.

En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, se puede medir algún producto de reacción enzimática (por ejemplo, la cantidad de una proteasa puede medirse midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo en un Western Blot). Alternativamente, el ligando puede mostrar propiedades enzimáticas en sí mismo y el complejo "ligando / péptido o polipéptido" o el ligando que fue unido por el péptido o polipéptido, respectivamente, se puede poner en contacto con un sustrato adecuado permitiendo la detección por la generación de una señal de intensidad. Para la medición de los productos de reacción enzimática, preferiblemente la cantidad de sustrato está saturando. El sustrato también puede marcarse con un marcador detectable antes de la reacción. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un período de tiempo adecuado. Un período de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca una cantidad de producto una detectable, pero preferiblemente medible. En lugar de medir la cantidad de producto, se puede medir el tiempo necesario para la aparición de una cantidad de producto (por ejemplo, detectable).

En tercer lugar, el ligando puede estar acoplado de forma covalente o no covalente a un marcador que permite la detección y medición del ligando. El etiquetado puede hacerse por métodos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento de la etiqueta directamente (covalentemente o no covalentemente) al 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 marcador adecuado y/o ser la diana (o receptor) de un ligando terciario que se une al ligando secundario. El uso de ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior se utiliza a menudo para aumentar la señal. Los ligandos

secundarios y de orden superior adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios, y el bien conocido sistema de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también puede ser "etiquetados" con una o más etiquetas como se conoce en la técnica. Tales etiquetas pueden entonces ser objetivos para ligandos de orden superior. Entre las etiquetas adecuadas están incluidas, la biotina, digoxigenina, His-Tag, Glutación-S-transferasa-, FLAG, GFP, myc-tag, la hemaglutinina del virus de la gripe A (HA), proteína de unión a maltosa, y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta está preferiblemente en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Los marcadores adecuados son cualesquiera marcas detectables mediante un método de detección apropiado. Las etiquetas típicas incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridano, luminol, rutenio, etiquetas enzimáticamente activAs, marcadores radiactivos, marcadores magnéticos (por ejemplo "bolas magnéticas", incluyendo paramagnético y etiquetas superparamagnéticas), y etiquetas fluorescentes. Las etiquetas enzimáticamente activas incluyen por ejemplo las etiquetas peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa, y derivados de los mismos. Los sustratos adecuados para la detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), la 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, IMBT- BCIP (4-nitro azul de tetrazolio y el cloruro de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como solución stock de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación enzima-sustrato adecuada puede resultar en un producto coloreado de una reacción, de fluorescencia o quimioluminiscencia, que puede medirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, utilizando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). En cuanto a la medición de la reacción enzimática, los criterios dados anteriormente se aplican de forma análoga. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo Texas, fluoresceína, y los colorantes Alexa (por ejemplo Alexa 568). Existen otros marcadores fluorescentes disponibles, por ejemplo, los marcadores moleculares (Oregon). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Los marcadores radiactivos típicos incluyen S, I, P, P y similares. Un marcador radiactivo puede detectarse por cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo, una película sensible a la luz o una cámara de fósforo. Los métodos de medición adecuados de acuerdo la presente invención también incluyen la precipitación (particularmente inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), pruebas inmunes de enzima sándwich, inmunoensayo de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), el inmuno ensayo de disociación mejorado con fluoruro de lantano (ELFIA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría de látex mejorado o nefelometría, o pruebas inmunológicas en fase sólida. Otros métodos conocidos en la técnica (tales como electroforesis en gel, electroforesis en gel 2D, electroforesis en geles SDS de poliacrilamida (SDS-PAGE), Western Blotting, y espectrometría de masas), pueden utilizarse solos o en combinación con el etiquetado o otros métodos de detección como se describe anteriormente.

La cantidad de un péptido o polipéptido puede ser, también preferiblemente, determina como sigue: (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el péptido o polipéptido como se especificó anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) medir la cantidad péptido o polipéptido que se une al soporte. El ligando, preferiblemente escogido de entre el grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está preferiblemente presente en un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para la fabricación de soportes sólidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otras, materiales de columna comercialmente disponibles, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas coloidales de metal, vidrio y / o chips de silicio y superficies y/o fragmentos de sílice y/o vidrio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos, placas de reacción de paredes y pocillos, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede estar unido a muchos transportadores diferentes. Algunos ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas, y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los métodos adecuados para la fijar / inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, pero no se limitan a, interacciones covalentes hidrofóbicas, iónicas y similares. También se contempla el uso de "conjuntos de suspensión" como matrices de acuerdo con la presente invención (Nolan 2002, Trends Biotechnol 20 (1): 9-12.). En tales arreglos de suspensión, el portador, por ejemplo, que es una microperla o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consta de diferentes microperlas o microesferas, posiblemente etiquetado, llevando diferentes ligandos. Los métodos de producción de tales matrices, por ejemplo basados en la química de fase sólida y grupos foto-lábiles protectores, son generalmente conocidos (US 5.744.305).

El término "cantidad" tal como se utiliza en la presente invención, abarca la cantidad absoluta de un polipéptido o péptido, la cantidad relativa o concentración de dicho polipéptido o péptido, así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona a la misma o se puede derivar de la misma. Tales valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas a partir de dichos péptidos por mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en los espectros de masa o espectros de RMN. Además, se abarcan todos los valores o parámetros que se obtienen mediante las mediciones indirectas especificadas en otra parte en esta descripción, por ejemplo, los niveles de respuesta determinados a partir de sistemas biológicos leídos en respuesta a los péptidos o intensidad de señales obtenidas de los ligandos unidos específicamente. Es de entenderse que los valores que correlacionan con las cantidades o parámetros antes mencionados también se pueden obtener mediante todas las operaciones matemáticas estándares.

65

El término "muestra" se refiere a una muestra de un fluido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o un órgano. Las muestras de fluidos corporales pueden obtenerse mediante técnicas bien conocidas e incluyen, preferiblemente, muestras de sangre, plasma, suero, orina o, más preferiblemente, muestras de sangre, plasma o suero. Las muestras de tejido u órgano pueden obtenerse de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. Las células separadas se pueden obtener a partir de los fluidos corporales o los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como centrifugación o selección de células. Preferiblemente, las muestras de células, tejidos u órganos se obtienen de aquellas células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos a los que se hace referencia en el presente documento.

El término "paciente", como se usa en la presente solicitud se refiere preferiblemente a un mamífero, más preferiblemente a un humano. El paciente, preferiblemente, sufre de un evento médico. Más preferiblemente, el paciente se presenta con la condición antes descrita en un servicio de urgencias. Lo más preferiblemente, el paciente es un paciente de emergencia, es decir, un paciente cuya condición requiere atención médica inmediata y cuidados intensivos. Típicamente, tal paciente, ha estado aparentemente sano con respecto a eventos isquémicos circulatorios agudos y eventos agudos circulatorios antes de la aparición del evento médico agudo. Por lo tanto, las funciones vitales del paciente no se han seguido de cerca o incluso no del todo antes de la llegada al servicio de urgencias. Por esta razón, existe poca información retrospectiva disponible acerca de la causa de la condición que amenaza la vida del paciente cuando se presenta al servicio de urgencias. En esta situación el método de la presente invención, realizado rápidamente en el punto de atención, es útil como un primer indicador de la causa de la condición del paciente, guiando de este modo aún más, las medidas de diagnóstico más específicas.

Estas medidas de diagnóstico específicos incluyen los procedimientos de diagnóstico estándares de laboratorio, por ejemplo medición de la creatinina, la glucosa, electrolitos, enzimas hepáticas; recuento celular sanguíneo total; análisis de gases en sangre; proyección de imagen, por ejemplo, ECG, ecocardiografía, tomografía computarizada, angiografía.

El término "comparar" tal como se utiliza aquí abarca la comparación de la cantidad del péptido o polipéptido comprendido en la muestra a analizar con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada en otra parte en esta descripción. Es de entenderse que la comparación como se usa aquí, se refiere a una comparación de parámetros o valores, por ejemplo correspondiente, una cantidad absoluta que se compara con una cantidad de referencia absoluta mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia o una intensidad de señal obtenida a partir de una muestra de prueba se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación que se hace referencia en el paso (c) del método de la presente invención puede llevarse a cabo manualmente o asistido por ordenador. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse a los valores correspondientes a las referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos mediante un programa informático. El programa de ordenador puede evaluar aún más el resultado de la comparación, es decir, proporciona automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Basado en la comparación de las cantidades determinadas en las etapas a) y b) y las cantidades de referencia del método de la presente invención, es posible predecir el riesgo de sufrimiento del paciente a consecuencia de una o más de las complicaciones a las que se hace referencia en la presente memoria. Por lo tanto, la cantidad de referencia debe ser elegida de manera que una diferencia o una similitud en las cantidades en comparación permita identificar a aquellos pacientes cuya condición es causada por un evento circulatorio agudo, por un evento isquémico, tanto por ambos tipos de eventos, o por ninguno de ellos eventos.

Por consiguiente, el término "cantidad de referencia" como se usa aquí, se refiere a una cantidad que permite diagnosticar si un paciente sufrió de un evento circulatorio agudo, un evento isquémico, ambos tipos de evento o ninguno de ellos. Por consiguiente, la referencia o bien puede derivarse de (i) un paciente que sabe que ha sufrido un evento del tipo respectivo de o (ii) un paciente que sabe que no ha sufrido el evento respectivo. Además, la cantidad de referencia puede definir una cantidad umbral, por lo cual una cantidad mayor que el umbral será indicativa para un sujeto de que ha sufrido uno o ambos de los eventos mencionados anteriormente. La cantidad de referencia aplicable para un sujeto en particular puede variar dependiendo de varios parámetros fisiológicos como la edad, género, o subpoblación, así como en los medios utilizados para la determinación del polipéptido o péptido denominado en este documento. Una cantidad de referencia adecuada puede determinarse por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia a analizar en conjunto, es decir, simultánea o posteriormente, con la muestra de ensayo. Una cantidad de referencia preferida que sirve como un umbral puede ser derivada desde el límite superior de lo normal (LSN), es decir, el límite superior de la cantidad fisiológica que se encuentra en una población de sujetos que no han sufrido o no están sufriendo de las complicaciones como se define arriba. El LSN para una población dada de los sujetos puede ser determinado por diversas técnicas bien conocidas. Una técnica adecuada puede ser la de determinar la mediana de la población para las cantidades péptido o polipéptido que se determinarán en el método de la presente invención.

Se pueden establecer las cantidades de referencia de un marcador de diagnóstico (es decir, un péptido de tipo ANP o sFlt-1), y el nivel del marcador en una muestra de paciente simplemente se puede comparar con la cantidad de referencia. La sensibilidad y especificidad de una prueba de diagnóstico y / o pronóstico depende de algo más que la "calidad" de análisis de la prueba - que también depende de la definición de lo que constituye un resultado anormal.

Preferiblemente, la distribución de las cantidades medidas de los marcadores de la presente invención en una población de pacientes que padecen o han padecido una complicación circulatoria y / o isquémica se compara con la distribución de las cantidades de dichos marcadores en pacientes sin dichas complicaciones. Los métodos estadísticos bien conocidos por la persona experta en la técnica pueden ser utilizados para definir una cantidad umbral que puede ser usada para separar a los pacientes que hayan sufrido de uno o ambas complicaciones y los pacientes no han sufrido dichas complicaciones. Especialmente preferidos para este propósito es el cálculo de las curvas características de funcionamiento del receptor, o curvas "ROC". Las curvas ROC se calculan generalmente representando el valor de una variable en comparación con su frecuencia relativa en las poblaciones "normales" y "enfermas". Para cualquier marcador particular, los niveles de distribución de los marcadores para los sujetos con y sin una enfermedad susceptible se solaparán. Bajo tales condiciones, una prueba no distingue absolutamente el estado normal de la enfermedad con 100% de precisión, y la zona de solapamiento indica donde la prueba no puede distinguir lo normal de la enfermedad. Un umbral se puede seleccionar, por encima del cual (o debajo de la cual, dependiendo de cómo un marcador cambia con la enfermedad) la prueba se considera anormal y por debajo del cual la prueba se considera normal. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permitirá la identificación correcta de una condición. Las curvas ROC se pueden utilizar incluso cuando los resultados de las pruebas no necesariamente dan un número exacto. Siempre y cuando se puedan clasificar los resultados, se puede crear una curva ROC. Por ejemplo, los resultados de una prueba de muestras en caso de "enfermedad" podrían ser clasificados según el grado (digamos 1= bajo, 2 = normal, y 3 = alto). Esta clasificación se puede correlacionar con resultados en la población "normal", y una curva ROC creada. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hanley et al, Radiology 143: 29-36 (1982).

En ciertas realizaciones, los marcadores (es decir, un péptido de tipo ANP y sFlt-I) se seleccionan de manera que exhiban al menos aproximadamente el 70% de sensibilidad, más preferiblemente al menos aproximadamente 80% de sensibilidad, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 85% de sensibilidad, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de sensibilidad, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de sensibilidad, combinado con al menos aproximadamente 70% de especificidad, más preferiblemente al menos aproximadamente 80% de especificidad, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 85% de especificidad, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de especificidad, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de especificidad. En realizaciones particularmente preferidas, tanto la sensibilidad y la especificidad son al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95 %. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5% de una medición dada.

La cantidad de referencia para NT-proBNP es, preferiblemente, de aproximadamente 1.000 pg/ml, aproximadamente 2000 pg/ml, aproximadamente 2.500 pg/ml, aproximadamente 3000 pg/ml, aproximadamente 4000 pg/ml o aproximadamente 5000 pg/ml, más preferiblemente 2.500 pg/ml. Las cantidades más grandes de esta cantidad son indicativas de un paciente después de haber sufrido una complicación circulatoria.

Si la complicación circulatoria es una arritmia, la cantidad de referencia para NT-proANP es, preferiblemente, de aproximadamente 1.000 pg/ml, aproximadamente 2000 pg/ml, aproximadamente 2500 pg/ml, aproximadamente 3000 pg/ml, aproximadamente 4000 pg/ml o alrededor 5000 pg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 2.500 pg/ml. Si la complicación circulatoria es la taquicardia, la cantidad de referencia es, preferiblemente, de aproximadamente 1000 pg/ml, aproximadamente 2000 pg/ml, aproximadamente 2500 pg / ml, aproximadamente 3000 pg/ml, aproximadamente 4000 pg/ml o aproximadamente 5000 pg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 2500 pg/ml.

La cantidad de referencia para sFlt-1 es de aproximadamente 100 pg/ml, aproximadamente 200 pg/ml, aproximadamente 300 pg/ml, aproximadamente 400 pg/ml, aproximadamente 500 pg/ml, aproximadamente 750 pg/ml o aproximadamente 1000 pg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 500 pg/ml. Las cantidades más grandes de esta cantidad son indicativas de un paciente después de haber sufrido una complicación isquémica.

El término "aproximadamente" emplea para indicar +/- 30% de la cantidad indicada, preferiblemente +/- 20% de la cantidad indicada, preferiblemente +/- 10% de la cantidad indicada, más preferiblemente +/- 5% de la cantidad indicada.

La persona experta en la técnica es consciente de que el aumento de los niveles de los péptidos de tipo sFlt-1 y el ANP son indicativos de una complicación isquémica circulatorio y combinado. Las cantidades de referencia citadas anteriormente para los péptidos de tipo sFlt-1 y ANP también se aplican para las complicaciones isquémicas circulatorias combinadas, incluyendo aquellas complicaciones circulatorias particulares como la arritmia y taquicardia.

En vista de las explicaciones anteriores y los ejemplos, el experto en la técnica puede determinar fácilmente un valor de referencia para un péptido de tipo ANP que no sea NTproANP el cual permite diagnosticar si la causa fisiopatológica de un evento médico agudo en un paciente de emergencia es una complicación circulatoria.

De manera ventajosa, el método de la presente invención permite ofrecer un diagnóstico rápido y la orientación para su posterior examen/diagnóstico con el objetivo de establecer la causa exacta o las causas subyacentes del estado fisiopatológico de los pacientes que sufren de un evento médico agudo o señalan al establecimiento de una la enfermedad o la condición que sufre un paciente. Al indicar la causa subyacente del fallo de un órgano, el método es capaz aun más de guiar el diagnóstico. Por lo tanto, es posible excluir ciertas enfermedades por diagnóstico diferencial. La reducción del tiempo para el diagnóstico permite un comienzo más rápido del tratamiento causal y, por lo tanto, reduce el sufrimiento del paciente, puede prevenir un mayor deterioro de la condición del paciente o incluso la muerte. En este contexto, es especialmente ventajoso que el método de la presente invención pueda, en principio, llevarse a cabo al lado de la cama, lo permite que el médico lleve a cabo de forma temprana y rápida las otras medidas necesarias de diagnóstico.

Preferiblemente, el método de la presente invención indica no sólo la causa, sino también la extensión o gravedad de una complicación circulatoria o isquémica. Las complicaciones mayor extensión o gravedad se asocian con mayores cantidades de péptido de tipo ANP y / o sFlt-1 en comparación a las complicaciones de menor grado o severidad. Preferiblemente, una cantidad de referencia se determina en un paciente con una complicación de la extensión conocida o gravedad. La comparación de una muestra de un paciente que sufre o ha sufrido de una complicación de grado desconocido o gravedad a un valor de referencia derivada de un paciente o colectivo de los pacientes que hayan sufrido una complicación de la gravedad conocida hace posible establecer el grado o la gravedad de dicha complicación del paciente rápidamente. Preferiblemente, las cantidades de péptido de tipo ANP y / o sFlt-1 que son superiores a la cantidad de referencia indican una complicación más grave o extendida. Los criterios para la extensión y/o gravedad de una afección son, preferiblemente, su duración, por ejemplo, por un período de arritmia cardíaca, o la intensidad de la complicación, por ejemplo, la cantidad de tejido isquémico. Además, la presente invención se refiere a un dispositivo para o adaptado para evaluar rápidamente si la causa fisiopatológica de un evento médico agudo en un paciente de emergencia es una complicación circulatoria y/o isquémica, que comprende

- a) medios para determinar la cantidad de un péptido tipo-ANP en una muestra de un paciente;
- b) medios para determinar la cantidad de sFlt-1 en una muestra de un paciente;
- c) medios para comparar las cantidades medidas de péptidos del tipo ANP y sFlt-1 a las cantidades de referencia; y
- d) medios para establecer un diagnóstico basado en los resultados de la comparación

El término "dispositivo" como se usa aquí se refiere a un sistema de medios que comprende por lo menos los medios antes mencionados operativamente unidos entre sí como para permitir la predicción. Los medios preferidos para la determinación de las cantidades de un péptido de tipo ANP y sFlt-1, y medios para llevar a cabo la comparación se dan a conocer anteriormente en relación con el método de la invención. Cómo vincular los medios de una manera operativa, dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplica un medio para determinar automáticamente la cantidad de los péptidos, los datos obtenidos por dichos medios que operan automáticamente se pueden procesar mediante, por ejemplo, un programa de ordenador con el fin de obtener los resultados deseados. Preferiblemente, los medios están constituidos por un único dispositivo en tal caso. Dicho dispositivo en consecuencia puede incluir una unidad de análisis para la medición de la cantidad de los péptidos o polipéptidos en una muestra aplicada y una unidad de ordenador para procesar los datos resultantes para la evaluación. Alternativamente, cuando los medios como las bandas de prueba se utilizan para determinar la cantidad de los péptidos o polipéptidos, los medios para la comparación pueden comprender rayas de control o las tablas de asignación de la cantidad determinada a un valor de referencia. Las rayas de prueba están, preferiblemente, acopladas a un ligando que se une específicamente a los péptidos o polipéptidos que se hace referencia en la presente memoria. La tira o dispositivo, preferiblemente, comprende medios para la detección de la unión de dichos péptidos o polipéptidos a dicho ligando. Los medios preferidos para la detección están descritos en conexión con realizaciones relativas al método de la invención mencionado anteriormente. En tal caso, los medios están operativamente ligados para que el usuario del sistema reúna el resultado de las determinaciones de una cantidad y el valor de diagnóstico o pronóstico de los mismos debido a las instrucciones e interpretaciones dadas en un manual. Los medios pueden aparecer como dispositivos separados en dicha realización y están, preferiblemente, empaquetados juntos como un kit. El experto en la técnica se dará cuenta de cómo vincular los medios sin más preámbulos. Los dispositivos preferidos son aquellos que se pueden aplicar sin el conocimiento particular de un clínico especializado, por ejemplo, rayas de prueba o dispositivos electrónicos que meramente requieren la carga con una muestra. Los resultados se pueden presentar como salida de datos en bruto, que necesitan la interpretación por el clínico. Preferiblemente, la salida del dispositivo es, sin embargo, procesada, es decir, evaluada, y los datos en bruto no requieren ser interpretados por un clínico. Dispositivos preferidos comprenden los dispositivos / unidades de análisis (por ejemplo, biosensores, matrices, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen específicamente los péptidos, los dispositivos de resonancia de plasmones superficiales, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masa, etc, o dispositivos / unidades de evaluación mencionadas anteriormente de acuerdo con el método de la invención.

Además, la presente invención se refiere a un kit para evaluar rápidamente si la causa fisiopatológica de un evento médico agudo en un paciente de emergencia es una complicación circulatoria y/o isquémica, que comprende

- a) medios para determinar la cantidad de un péptido de tipo ANP en una muestra de un paciente;
- b) medios para determinar la cantidad de sFlt-1 en una muestra de un paciente;
- c) medios para comparar las cantidades medidas de péptido de tipo ANP y sFlt-1 a las cantidades de referencia;
- d) medios para establecer un diagnóstico basado en los resultados de la comparación.

El término "kit" como se usa aquí se refiere a una colección de los medios mencionados, preferiblemente, proporcionados en forma separada o dentro de un solo recipiente. El recipiente, también de preferencia, comprende instrucciones para llevar a cabo el método de la presente invención.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención.

Ejemplo 1

En 403 pacientes (edad media: 52,4 años) con condiciones que amenazan la vida que requerían cuidados intensivos, se determinaron sFlt-1 y NT-proANP en las 4 horas siguientes de la hospitalización. En el momento del muestreo todos los pacientes fueron ventilados mecánicamente. La circulación sanguínea se mantuvo estable.

NT-proANP se determinó con el ensayo ELISA de proANP (BI-20892) obtenido a partir de Biomedica, Viena, Austria. Este ensayo de tipo sándwich comprende un anticuerpo específico policlonal de oveja NTproANP unido a un tira de microtitulación. La muestra se añade a la tira de microtitulación de modo que el proANP puede unirse al anticuerpo. Después de la unión del proANP al primer anticuerpo, se añade al recipiente un segundo anticuerpo específico proANP. Este segundo anticuerpo está conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de la incubación del anticuerpo conjugado con enzima, el anticuerpo no unido se elimina mediante lavado de la tira de micro titulación. Finalmente, se añade tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato para la HRP. Cuanto más proANP contiene la muestra, más anticuerpo conjugado se une. Por lo tanto, la actividad total de HRP presente en el recipiente depende de la cantidad de proANP en la muestra y la velocidad inicial de TMB convertido es una medida de la cantidad de NTproANP en la muestra.

Se determinó sFlt-1 con un inmunoensayo de sFlt-1 empleando analizadores Elecsys y COBAS de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania. El ensayo se basa en el principio sándwich y comprende dos anticuerpos monoclonales específicos a sFlt-1 ie. El primero de ellos está biotinilado y el segundo está marcado con un complejo Tris (2,2'-bipiridilo)-rutenio (II). En una primera etapa de incubación ambos anticuerpos se incuban con la muestra. Se forma un complejo de sándwich que comprende sFlt-1 y los dos anticuerpos diferentes. En una siguiente etapa de incubación, se añaden perlas recubiertas con estreptavidina a este complejo. Las perlas se unen a los complejos de sándwich. La mezcla de reacción se aspira a continuación, en una célula de medición, donde las perlas son capturadas magnéticamente en la superficie de un electrodo. La aplicación de un voltaje a continuación, induce una emisión quimioluminiscente desde el complejo de rutenio que se mide por un fotomultiplicador. La cantidad de luz es dependiente de la cantidad de complejos de sándwich en el electrodo.

La taquicardia se determinó mediante electrocardiografía o midiendo el pulso del paciente durante al menos 30 segundos.

Tabla 1: Eventos circulatorios

| NT-proANP [pg/ml] | N* | Pacientes con arritmia | [%] | Pacientes con taquicardia | [%] |
|-------------------|-----|------------------------|------|---------------------------|-------|
| < 1000 | 64 | 0 | 0,0 | 12 | 18,8 |
| 1000 a 2500 | 204 | 16 | 0,8 | 101 | 40,5 |
| 2500 a 5000 | 97 | 32 | 33,0 | 59 | 60,8 |
| 5000 a 10.000 | 35 | 21 | 60,0 | 28 | 80,0 |
| >10.000 | 3 | 1 | 33,3 | 3 | 100,0 |

* Número total de pacientes

** La taquicardia fue diagnosticada si el paciente exhibía un pulso > 120 bpm

§ La arritmia fue definida como arritmia absoluta o más de 10 latidos de corazón extra por minuto

Tabla 2: Proporción de pacientes con eventos isquémicos (PS sistólica < 80 mmHg)

| sFlt1 [pg/ml] | N* | Eventos isquémicos ** | [%] |
|---------------|-----|-----------------------|------|
| < 100 | 229 | 2 | 0,0 |
| 100 a 500 | 140 | 11 | 0,8 |
| 500 a 1000 | 4 | 1 | 25,0 |
| 1000 a 5000 | 9 | 6 | 66,7 |

| | | | |
|-----------------------------|----|----|------|
| > 5000 | 21 | 13 | 61,9 |
| * Número total de pacientes | | | |
| ** Número de pacientes | | | |

Se consideró que los pacientes que sufrían de un evento isquémico si se cumplían los siguientes criterios: dolor específico de órganos, reducción del pulso en la zona afectada y la palidez de la piel.

5 La Tabla 1 muestra que con cantidades crecientes de NT-proANP la proporción de pacientes con eventos circulatorios aumentó. Más del 33% de los pacientes con niveles de NT-proBNP por encima de 2500 pg/ml había sufrido antes del muestreo o sufrían en el momento de la toma de muestras de la arritmia y más del 60% de los
 10 pacientes con niveles de NT-proBNP por encima de 2.500 pg/ml habían sufrido antes del muestreo o sufrían en el momento de la toma de muestras de la taquicardia. Por lo tanto, midiendo el nivel de NT-proBNP en los pacientes de emergencia, complicaciones circulatorias, como se ejemplifica para arritmia y taquicardia pueden diagnosticarse de forma fiable. Para sorpresa de los inventores, el diagnóstico se puede realizar incluso dentro de 4 horas después de la hospitalización.

15 La Tabla 2 muestra la prevalencia de episodios isquémicos. Más del 25% de los pacientes con los niveles de sFlt- 1 por encima de 500 pg/ml habían sufrido antes del muestreo o todavía sufrían en el momento del muestreo de una presión arterial sistólica por debajo de 80 mmHg.

20 En vista de lo anterior, la medición del nivel de sFlt-1 en los pacientes de emergencia permite el diagnóstico de complicaciones isquémicas rápidamente y de forma segura.

25 Cada uno de los dos marcadores sFlt-1 y NPproBNP (u otro péptido de tipo ANP) proporciona una medida de diagnóstico estadísticamente independiente. Mediante la combinación de la medición de sFlt-1 y NP proANP (u otro péptido de tipo ANP) en una prueba de diagnóstico, un médico puede determinar fácilmente y de forma rápida la causa fisiopatológica de un evento médico agudo en un paciente de emergencia, es decir, si el paciente de emergencia dado sufre de una complicación circulatoria y/o una isquémica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar rápidamente si un evento médico agudo en un paciente de emergencia está asociado con una complicación circulatoria y/o isquémica, que comprende las etapas de
 - a) determinar la cantidad de un péptido de tipo ANP en una muestra de un paciente;
 - b) determinar la cantidad de sFlt-1 en una muestra de un paciente;
 - c) comparar las cantidades medidas en las etapas a) y b) con cantidades de referencia; y
 - 10 d) establecer de un diagnóstico basado en los resultados de c), donde un incremento en el nivel del péptido de tipo ANP relativo a la cantidad de referencia es indicativo de una complicación isquémica, donde la complicación circulatoria está causada por una arritmia cardíaca y donde una complicación isquémica está caracterizada por una presión arterial sistólica por debajo de 80 mmHg.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que un incremento de los niveles de los péptidos tipo ANP y sFlt-1 en relación a la cantidad de referencia es indicativo de una complicación combinada circulatoria e isquémica.
3. El método de acuerdo a las reivindicaciones 1 y 2 en el que el evento médico agudo es la insuficiencia cardíaca, insuficiencia pulmonar o insuficiencia renal.
- 20 4. El método de acuerdo a la reivindicación 2, donde la complicación isquémica ocurre en el bazo, en el corazón, en el riñón, en el intestino y en las extremidades.
5. El método de acuerdo a las reivindicaciones 1 a la 4, donde el péptido tipo-ANP es NT-proANP.
- 25 6. El método de acuerdo a la reivindicación 5, donde la cantidad de referencia de NT-proANP es aproximadamente 2500 pg/ml.
7. El método de acuerdo a las reivindicaciones 1 a la 6, donde la cantidad de referencia de sFlt-1 es aproximadamente 500 pg/ml.
- 30 8. Un dispositivo para un diagnóstico rápido si un evento médico agudo en un paciente de emergencias se asocia con una complicación circulatoria y/o isquémica, comprende
 - 35 a) una unidad de análisis para determinar la cantidad de un péptido del tipo-ANP en una muestra del paciente.
 - b) una unidad de análisis para determinar la cantidad de sFlt-1 en una muestra del paciente.
 - c) una unidad computarizada para comparar las cantidades medidas del péptido tipo-ANP y sFlt-1 con cantidades de referencia, y
 - 40 d) una unidad computarizada para establecer un diagnóstico basado en los resultados de la comparación, donde un incremento del nivel del péptido tipo ANP relativo a una cantidad de referencia es indicativo de una complicación circulatoria y donde un incremento de sFlt-1 en relación a la cantidad de referencia es indicativo de una complicación isquémica, y donde la complicación circulatoria está causada por una arritmia cardíaca, y donde la complicación isquémica está caracterizada por una presión arterial sistólica por debajo de 80 mmHg.
- 45 9. Un kit para el diagnóstico rápido si un evento médico agudo en un paciente de emergencias está asociado con una complicación circulatoria y/o isquémica, dicho kit comprende instrucciones para llevar a cabo el diagnóstico, y además comprende
 - 50 a) una unidad de análisis para determinar la cantidad de un péptido del tipo-ANP en una muestra del paciente.
 - b) una unidad de análisis para determinar la cantidad de sFlt-1 en una muestra del paciente.
 - c) una unidad computarizada para comparar las cantidades medidas del péptido tipo-ANP y sFlt-1 con cantidades de referencia, y
 - 55 d) una unidad computarizada para establecer un diagnóstico basado en los resultados de la comparación, donde un incremento del nivel del péptido tipo ANP relativo a una cantidad de referencia es indicativo de una complicación circulatoria y donde un incremento de sFlt-1 en relación a la cantidad de referencia es indicativo de una complicación isquémica, y donde la complicación circulatoria está causada por una arritmia cardíaca, y donde la complicación isquémica está caracterizada por una presión arterial sistólica por debajo de 80 mmHg.
- 60 10. El dispositivo de acuerdo a la reivindicación 8 o el kit de la reivindicación 9, donde el péptido de tipo ANP es proANP.