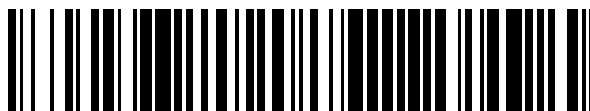


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 077**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2009** **PCT/EP2009/007739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010** **WO2010046137**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2009** **E 09744969 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016** **EP 2356466**

54 Título: **Biomarcadores de pronóstico para la progresión de la enfermedad renal crónica primaria**

30 Prioridad:

22.10.2008 EP 08167312

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

20.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STRUCK, JOACHIM;
DIEPLINGER, BENJAMIN;
MÜLLER, THOMAS;
KOLLERITS, BARBARA y
KRONENBERG, FLORIAN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 618 077 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

Biomarcadores de pronóstico para la progresión de la enfermedad renal crónica primaria.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los biomarcadores de pronóstico y se refiere a la predicción del resultado clínico de los pacientes con enfermedad renal crónica.

10 Antecedentes de la invención

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema sanitario importante de creciente incidencia y prevalencia, costes elevados y malos resultados clínicos. La introducción de la iniciativa para la calidad de los resultados clínicos de la enfermedad renal (K/DOQI) y la utilización de la tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) para la evaluación de la función renal ha identificado un gran número de pacientes con ERC previamente no diagnosticada (National Kidney Foundation, Am. J. Kidney Dis. 39(2 supl. 1):S1-266, 2002; Centros para el control y prevención de enfermedades (CDC, Morb. Mortal Wkly Rep. 56:161-165, 2007). Sin embargo, sólo una parte menor de los pacientes de ERC progresan a enfermedad renal de estadio terminal (ERET) (Clase et al., BMJ 329:912-915, 2004). La identificación de aquellos pacientes con mayor riesgo de progresión de la ERC sigue siendo un reto. Mediante la adopción de las recomendaciones K/DOQI y las estimaciones de TFG publicadas periódicamente por muchos laboratorios, se ha conseguido un éxito sustancial en el cribado de la ERC no diagnosticada. Sin embargo, existe una necesidad urgente de estratificación adicional del riesgo y de identificación de factores predictivos adicionales que permitan concentrar las intervenciones en aquellos pacientes con ERC que es más probable que progresen a ERET.

Se ha demostrado que la proBNP aminoterminal (NT-proBNP), un marcador predictivo bien establecido de enfermedad cardiovascular, predice la progresión de la enfermedad renal en pacientes no diabéticos con ERC primaria (Spanaus et al., Clin. Chem. 53:1264-1272, 2007).

El péptido natriurético de tipo A (ANP) y la adrenomedulina (ADM) son potentes péptidos hipotensores, diuréticos y natriuréticos que participan en el mantenimiento de la hemostasis cardiovascular y renal (Vesely et al., Cardiovasc. Res. 51:647-658, 2001; Bunton et al., Pharmacol. Ther. 103:179-201, 2004). Se ha informado de concentraciones plasmáticas incrementadas de ANP y ADM en pacientes con enfermedad cardiovascular y en pacientes con enfermedad renal (Lerman et al., Lancet 341:1105-1109, 1993; Jougasaki et al., Circulation 92:286-289, 1995; Winters et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 150:231-236, 1988; Ishimitsu et al., J. Clin. Invest. 94:2158-2161, 1994). Sin embargo, ANP y ADM nunca han sido considerados marcadores para la predicción de la progresión de la enfermedad renal.

El péptido adrenomedulina (ADM) fue descrito por primera vez en 1993 (Kitamura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 192:553-560, 1993) como nuevo péptido hipotensor que comprende 52 aminoácidos, que había sido aislado a partir de un feocromocitoma humano. En el mismo año también se describió ADNc codificante de un péptido precursor que comprendía 185 aminoácidos y la secuencia completa de aminoácidos de dicho péptido precursor (Kitamura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 194:720-725, 1993). El péptido precursor, que comprende, entre otros, una secuencia de señal de 21 aminoácidos en el extremo N-terminal, se denomina "pre-pro-adrenomedulina" (pre-pro-ADM).

El péptido ADM comprende los aminoácidos 95 a 146 de la pre-pro-ADM, a partir de la que se forma mediante corte proteolítico. Algunos fragmentos peptídicos de los formados en el corte de la pre-proADM han sido caracterizados en detalle, en particular los péptidos fisiológicamente activos adrenomedulina (ADM) y "PAMP", un péptido que comprende 20 aminoácidos (22-41) que siguen a los 21 aminoácidos del péptido de señal en pre-proADM. Otro fragmento de función desconocida y elevada estabilidad ex vivo es la pro-adrenomedulina de región media (MR-proADM, Struck et al., Peptides 25(8):1369-72, 2004), para la que se ha desarrollado un método fiable de cuantificación (Morgenthaler et al., Clin. Chem. 51(10):1823-9, 2005).

El descubrimiento y caracterización de ADM en 1993 estimuló una intensa actividad investigadora y un alud de publicaciones, los resultados de las cuales han sido resumidos recientemente en diversos artículos de revisión; en el contexto de la presente memoria se hace referencia en particular a los artículos en un número de "Peptides" dedicados a la ADM (Peptides 22, 2001), en particular Takahashi, Peptides 22:1691, 2001, y Eto, Peptides 22:1693-1711, 2001). La materia se revisa adicionalmente en Hinson et al. (Hinson et al., Endocr. Rev. 21(2):138-167, 2000). La ADM puede considerarse un péptido regulador polifuncional. Se libera en la circulación en una forma inactiva extendida por una glicina C-terminal (Kitamura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 244(2):551-555, 1998).

La ADM es un vasodilatador eficaz. El efecto hipotensor se ha asociado en particular a segmentos peptídicos en la parte C-terminal de la ADM. Por otra parte, las secuencias peptídicas del extremo N-terminal de la ADM muestran efectos hipertensores (Kitamura et al., Peptides 22:1713-1718, 2001).

El péptido natriurético auricular (ANP, también conocido como factor natriurético auricular (ANF)) es una hormona peptídica que comprende 28 residuos aminoácidos (SEC ID nº 8). El gen ANP comprende 3 exones y 2 intrones y codifica un pre-proANP de 153 aminoácidos (SEC ID nº 6). Tras el corte de un péptido de señal N-terminal (25 aminoácidos) y los dos aminoácidos C-terminales (127/128), se libera la pro-ANP. El ANP comprende los residuos 99 a 126 del extremo C-terminal de la prohormona precursora proANP (SEC ID nº 7). Dicha prohormona es cortada para formar el péptido ANP de 28 aminoácidos maduro, también conocido como ANP (1-28) o α -ANP, y el fragmento amino-terminal ANP (1-98) (NT-proANP, SEC ID nº 9). De esta manera, NT-proANP y ANP son producidos en cantidades equimolares. El NT-proANP de 98 aminoácidos puede ser procesado adicionalmente mediante proteólisis. La proANP de región intermedia (MR-proANP) se define como proANP o cualesquiera fragmentos de la misma que comprenden por lo menos los residuos aminoácidos 53 a 90 de la proANP. Los aminoácidos 53 a 90 de la proANP se ilustran en la SEC ID nº 10 (figura 10). Se ha utilizado la medición de la MR-proANP en el diagnóstico diferencial de la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (Gegenhuber et al., Clin. Chem. 52:827-831, 2006). Además, Vesely (Cardiovascular Research 51 (2001), 647-658, divulga que los péptidos natriuréticos auriculares desempeñan un rol en varias enfermedades patofisiológicas, por ejemplo en la insuficiencia renal aguda.

En referencia a la ANP y los precursores y fragmentos de la misma, varias publicaciones se refieren a mediciones de dichos analitos en los pacientes con enfermedad renal avanzada, en particular antes y después de la hemodiálisis. En dichas publicaciones, los niveles medidos de analitos se analizan con respecto a su asociación a otros parámetros, los cuales han sido obtenidos de los pacientes en los mismos tiempos que las muestras obtenidas para la medición. Ninguna de las publicaciones ha seguido el desarrollo de la enfermedad con el tiempo y, de esta manera, no puede ni ha realizado un estudio de si el nivel del analito medido en un punto temporal dado se asocia a un incremento de la gravedad de la enfermedad, es decir, de si un nivel de analito puede resultar adecuado para la predicción de la progresión de la enfermedad (Nephron. 58(1):17-22, 1991. Change in plasma immunoreactive N-terminus, C-terminus, and 4,000-dalton midportion of atrial natriuretic factor prohormone with hemodialysis. Winters C.J., Vesely D.L. Regul. Pept. Suppl. 4:110-2, 1985. Plasma concentration of atrial natriuretic polypeptide in chronic hemodialysis patients. Yamamoto Y., Higa T., Kitamura K., Tanaka K., Kangawa K., Matsuo H.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria (ERC) o para el seguimiento de la terapia de la enfermedad renal crónica en un paciente que sufre de enfermedad renal crónica primaria y en el que dicho paciente no presenta enfermedad renal de estadio terminal, que comprende las etapas siguientes:

- (a) obtener una muestra de un paciente que sufre de enfermedad renal crónica primaria,
- (b) determinar el nivel de MR-proADM,
- (c) comparar el nivel de MR-proADM con un valor predeterminado que correlaciona el nivel de MR-proADM con la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria, en la que un nivel incrementado de MR-proADM en los valores iniciales ("baseline") es predictivo de progresión.

Otras formas de realización de la presente invención son objeto de las reivindicaciones adjuntas.

Es divulgado asimismo un método *in vitro* para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria (ERC), que comprende las etapas siguientes:

- (a) proporcionar una muestra de un paciente que padece la enfermedad renal crónica primaria,
- (b) determinar el nivel de ANP y/o ADM o los fragmentos de los mismos o sus precursores o fragmentos de los mismos,
- (c) correlacionar el nivel de ANP y/o ADM o los fragmentos de los mismos o sus precursores o fragmentos de los mismos con la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria.

Es divulgado asimismo un método *in vitro* para el seguimiento de la terapia de la enfermedad renal crónica, que comprende las etapas siguientes:

- (a) proporcionar una muestra de un paciente que padece la enfermedad renal crónica primaria,
- (b) determinar el nivel de ANP y/o ADM o los fragmentos de los mismos o sus precursores o fragmentos de los mismos,
- (c) correlacionar el nivel de ANP y/o ADM o los fragmentos de los mismos o sus precursores o fragmentos de los mismos con la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria.

La forma de realización más preferida es el método *in vitro* para la predicción de la progresión de la enfermedad renal primaria tal como se ha indicado anteriormente. Ésta es la forma de realización más valiosa. Dicho método *in vitro* de predicción puede modificarse con todas las formas de realización específicas indicadas de manera general a continuación en la presente memoria.

El método *in vitro* permite discriminar los pacientes con enfermedad renal crónica en progresión de los pacientes con enfermedad renal crónica no progresiva. La ERC progresiva en la presente memoria se refiere a ERC que progresa y posiblemente progresa hasta la duplicación de la creatinina sérica y a enfermedad renal de estadio terminal (ERET). De esta manera, en una forma de realización preferente del método *in vitro*, el paciente se clasifica como paciente que progresa o paciente que no progresa. De esta manera, un paciente que progresa es un paciente en el que la ERC del mismo finalmente progresará a enfermedad renal de estadio terminal (ERET). Esto significa en una forma de realización que un paciente que progresa se define como un paciente que progresa al punto final que es la duplicación de la creatinina sérica, preferentemente sin alcanzar la ERET. La ERET es una enfermedad renal no compensable. Lo anterior implica que el daño renal ya no es reversible y que se requiere diálisis o trasplante.

Esto implica que el subgrupo de pacientes preferente para el método *in vitro* para la predicción de la progresión de la ERC primaria y/o para el seguimiento de la enfermedad renal comprende exclusivamente los pacientes que no presentan ERET.

En otra forma de realización de la invención, un paciente que progresa se define como un paciente que progresa al punto final de ERET sin requerir la sustitución renal. De esta manera, se define progresión como un proceso de la enfermedad en el que ésta progresa de enfermedad renal leve a moderada hacia uno de los puntos finales anteriormente indicados en los que la creatinina sérica se duplica sin alcanzar la ERET o alcanzando una ERET que requiere el reemplazo renal. Los métodos *in vitro* de la presente invención son especialmente aplicables a pacientes que presentan enfermedad renal leve a moderada. Los pacientes con enfermedad leve a moderada se definen como pacientes que presentan una función renal estable durante por lo menos 3 meses antes de la medición de analitos. En una forma de realización preferida, los pacientes con enfermedad leve a moderada no requieren hemodiálisis.

En una forma de realización preferida, los métodos *in vitro* de la presente invención sirven para predecir la progresión o para el seguimiento de la enfermedad renal crónica pero no predicen el riesgo de mortalidad. De esta manera, según una forma de realización de la presente invención, la mortalidad no es un punto final que se considera para la clasificación de los pacientes en pacientes que progresan o pacientes que no progresan. Sin embargo, resulta evidente para el experto en la materia que un paciente que progresa puede presentar un riesgo de mortalidad incrementado en comparación con un paciente que no progresa.

En una forma de realización preferida la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria (ERC) o para el seguimiento de la terapia de la enfermedad renal crónica para pacientes que padecen la enfermedad renal crónica primaria y el que dicho paciente no presenta una enfermedad renal terminal, sino que presenta una enfermedad renal de leve a moderada, que comprende las etapas siguientes:

- (a) proporcionar una muestra de un paciente que padece la enfermedad renal crónica primaria con enfermedad renal de leve a moderada,
- (b) determinar el nivel de MR-proADM,
- (c) comparar el nivel de MR-proADM con un valor predeterminado y correlacionar el nivel de MR-proADM con la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria, en el que un nivel de MR-proADM aumentado en los valores iniciales es un predictor de la progresión.

En una forma de realización preferida la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria (ERC) o para el seguimiento de la terapia de la enfermedad renal crónica para pacientes que padecen la enfermedad renal crónica primaria y en el que dicho paciente no presenta una enfermedad renal terminal, pero presenta una enfermedad renal de leve a moderada, que comprende las etapas siguientes:

- (a) proporcionar una muestra de un paciente que padece una enfermedad renal crónica primaria con una enfermedad renal de leve a moderada,
- (b) determinar el nivel de MR-proADM,
- (c) comparar el nivel de MR-proADM con la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria, en el que un nivel de MR-proADM aumentado en los valores iniciales es un predictor de progresión, sin considerar la predicción de mortalidad.

Esto significa progresión de la enfermedad renal crónica primaria, en la que progresión se refiere al agravamiento de la función renal. Una medida del agravamiento de la función renal es un incremento, es decir, por lo menos una duplicación de la creatinina sérica inicial y/o ERET que requiere terapia de reemplazo renal.

- 5 En una forma de realización preferida de la invención, se determina el nivel de MR-proADM y se utiliza como marcador único.

La ANP o los fragmentos de la misma o los precursores o fragmentos de los mismos preferentemente se seleccionan de entre el grupo que comprende NT-proANP, MR-proANP y ANP madura o fragmentos de la misma. Los fragmentos pueden presentar preferentemente una longitud de por lo menos 12 aminoácidos.

La ADM o fragmentos de la misma o los precursores o fragmentos de los mismos preferentemente se seleccionan de entre el grupo que comprende ADM madura, MR-proADM, PAMP y CT-proADM o fragmentos de los mismos. Los fragmentos pueden presentar preferentemente una longitud de por lo menos 12 aminoácidos.

En formas de realización particularmente preferidas de la invención, la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria puede mejorarse mediante la determinación y utilización adicionales del nivel de por lo menos un parámetro de laboratorio adicional o un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que comprende: creatinina, TFG ("tasa de filtración glomerular"; la TFG puede determinarse, por ejemplo, mediante la medición de la eliminación del iohexol (Bostom et al., J. Am. Soc. Nephrol. 13:2140-2144, 2002), la proteinuria, la albúmina, la CRP, la cistatina C, GDF15, ST2, NGAL, la procalcitonina y los fragmentos de la misma, BNP o fragmentos de la misma o precursores o fragmentos de los mismos, en particular proBNP o NT-proBNP, pro-vasopresina y fragmentos de los mismos, incluyendo copeptina, vasopresina y neurofisina II, pro-endotelina-1 y fragmentos de los mismos, incluyendo CT-proET-1, NT-proET-1, endotelina-1 grande ("big") y endotelina-1, la ANP o fragmentos de los mismos o precursores o fragmentos de los mismos.

También resulta preferido que adicionalmente se determine por lo menos un parámetro clínico seleccionado de entre el grupo que comprende: edad, sexo, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, índice de masa corporal, hábitos tabáquicos actuales y tratamiento antihipertensor.

La presente invención se refiere además a un método *in vitro* para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria y para el seguimiento de la terapia de la enfermedad renal crónica tal como se ha indicado anteriormente, en el que el nivel de MR-proADM solo o conjuntamente con otros parámetros de laboratorio o clínicos útiles con fines predictivos se utiliza para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria mediante un método que puede seleccionarse de entre las alternativas siguientes:

- comparación con la mediana del nivel de MR-proADM en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de pacientes que presentan enfermedad renal crónica primaria,
- comparación con un cuantil del nivel de ANP y/o ADM o fragmentos de los mismos o sus precursores o fragmentos de los mismos en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de pacientes que presentan enfermedad renal crónica primaria,
- cálculo basado en el análisis de riesgos proporcionales de Cox o mediante la utilización de cálculos de índices de riesgo, tales como el IRN (índice de reclasificación neta) o el IDI (índice de discriminación integrada).

En una forma de realización particular, se mide el nivel de MR-proADM en un método *in vitro* utilizando un ensayo diagnóstico que comprende una o más sondas de capturas dirigidas contra uno o más epítomos situados en las posiciones aminoácidas 45 a 92 de la pre-proADM.

Particularmente, la ANP y/o la MR-proADM o fragmentos de los mismos o sus precursores o fragmentos de los mismos se utilizan como predictor independiente de TFG y marcador de clasificación.

Los métodos *in vitro* de la presente invención pueden aplicarse en una o más ocasiones después del inicio de la terapia y los resultados pueden compararse entre sí o al resultado obtenido antes del inicio de la terapia con el fin de evaluar el éxito de la misma.

En una forma de realización es utilizado un ensayo de MR-proADM que presenta un límite de detección inferior a 0,3 nmoles/l y/o inferior a la mediana de una población de pacientes que presenta enfermedad renal crónica primaria y una precisión interensayo <30% CV en el intervalo normal para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria.

Es divulgado asimismo un ensayo de MR-proADM que presenta un límite de detección inferior a 20 nmoles/l y/o inferior a la mediana de una población de pacientes que presenta enfermedad renal crónica primaria y una precisión

interensayo <30% CV en el intervalo normal para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria.

En general, los fragmentos de los péptidos y péptidos precursores tal como se definen en la presente memoria se refieren a fragmentos de los mismos de una longitud de por lo menos 12 aminoácidos. Los fragmentos preferentemente son fragmentos inmunológicamente detectables de los péptidos.

Como es utilizado en la presente memoria, el término "pro-adrenomedulina" (proADM) y la expresión "pro-adrenomedulina o fragmentos de la misma" se refiere a la molécula entera de proADM o a fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos que incluyen, aunque sin limitación, ADM, PAMP y MR-proADM. Además, proADM se refiere a la molécula completa de proADM o a fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos con la excepción de la ADM madura. Todavía además, la proADM se refiere a la molécula completa de proADM o fragmentos de la misma de por lo menos 12 aminoácidos con la excepción de la ADM madura o fragmentos de ADM madura. De esta manera, "determinar el nivel de proADM o fragmentos de la misma" se refiere a determinar el nivel de proADM o fragmentos de la misma, en el que no se determina el nivel de la ADM madura y/o de los fragmentos de la ADM madura.

La secuencia de aminoácidos del péptido precursor de la adrenomedulina (pre-pro-adrenomedulina) se proporciona en la figura 1 (SEC ID nº 1). La pro-adrenomedulina se refiere a los residuos aminoácidos 22 a 185 de la secuencia de la pre-pro-adrenomedulina. La secuencia de aminoácidos de la pro-adrenomedulina (pro-ADM) se proporciona en la figura 2 (SEC ID nº 2). El péptido pro-ADM N-terminal 20 (PAMP) se refiere a los residuos aminoácidos 22 a 41 de pre-proADM. La secuencia de aminoácidos de PAMP se proporciona en la figura 3 (SEC ID nº 3). La MR-pro-adrenomedulina (MR-pro-ADM) se refiere a los residuos aminoácidos 45 a 92 de la pre-pro-ADM. La secuencia de aminoácidos de la MR-pro-ADM se proporciona en la figura 4 (SEC ID nº 4). La secuencia de aminoácidos de la adrenomedulina (ADM) madura se proporciona en la figura 5 (SEC ID nº 5).

La secuencia de aminoácidos de la ANP se proporciona en la figura 8 (SEC ID nº 8). La secuencia de la pre-proANP de 153 aminoácidos se muestra en la figura 6 (SEC ID nº 6). Tras el corte de un péptido de señal N-terminal (25 aminoácidos) y los dos aminoácidos C-terminales (127/128), se libera la proANP (figura 7, SEC ID nº 7). La ANP comprende los residuos 99 a 126 del extremo C-terminal de la prohormona precursora pro-ANP. Esta prohormona se corta en el péptido maduro de 28 aminoácidos ANP, también conocido como ANP (1-28) o α -ANP y el fragmento aminoterminal ANP (1-98) (NT-proANP, figura 9, SEC ID nº 9). La proANP de región intermedia (MR-proANP) se define como NT-proANP o cualesquiera fragmentos de la misma que comprenden por lo menos los residuos aminoácidos 53 a 90 (SEC ID nº 10 en la figura 10) de la proANP.

Tal como se indica en la presente memoria en el contexto de las proteínas o péptidos, el término "fragmento" se refiere a proteínas o péptidos de menor tamaño derivables a partir de proteínas o péptidos de mayor tamaño, que por lo tanto comprenden una secuencia parcial de la proteína o péptido de mayor tamaño. Dichos fragmentos son derivables a partir de las proteínas o péptidos de mayor tamaño mediante saponificación de uno o más de los enlaces peptídicos de los mismos.

En el contexto de la presente invención, el término "nivel" en expresiones tales como "nivel de una proteasa", "nivel de analito" y expresiones similares, se refieren a la cantidad de la entidad molecular indicada en el contexto respectivo, o en el caso de los enzimas también puede referirse a la actividad enzimática.

En una forma de realización preferida del método *in vitro* de la invención, dicho nivel de MR-proADM o fragmentos de la misma se determina y se utiliza como marcador único.

En formas de realización particularmente preferidas de la invención, la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria puede mejorarse mediante la determinación y la utilización adicionales del nivel de por lo menos un parámetro de laboratorio adicional seleccionado de entre el grupo que comprende: creatinina, TFG ("tasa de filtración glomerular"; la TFG puede determinarse, por ejemplo, mediante la medición de la eliminación de iohexol (Bostom et al., J. Am. Soc. Nephrol. 13:2140-2144, 2002), proteinuria, albúmina, CRP, cistatina C, GDF15, ST2, NGAL, procalcitonina y fragmentos de los mismos, BNP o fragmentos de los mismos, o los precursores o fragmentos de los mismos, particularmente proBNP o NT-proBNP, pro-vasopresina y fragmentos de los mismos, incluyendo copeptina, vasopresina y neurofina II, pro-endotelina-1 y fragmentos de los mismos, incluyendo CT-proET-1, NT-proET-1, endotelina-1 grande y endotelina-1, ANP o fragmentos de los mismos o los precursores o fragmentos de los mismos.

La expresión "determinar adicionalmente" no implica, aunque no excluye, que dichas determinaciones se combinen técnicamente. La expresión "utilizar adicionalmente" se define como cualquier tipo de combinación matemática de parámetros (parámetros de laboratorio y/o clínicos) que proporciona una predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria. Un ejemplo de dicha combinación matemática es el análisis de riesgos proporcionales de Cox, a partir del que puede obtenerse el riesgo de que un sujeto sufra de enfermedad renal crónica primaria, aunque también pueden utilizarse otros métodos.

La invención también implica comparar el nivel de marcador para el individuo con un valor predeterminado. El valor predeterminado puede presentar una diversidad de formas. Puede ser un único valor de corte. Éste puede ser, por ejemplo, una mediana o media o el percentil 75, 90, 95 o 99 de una población de referencia. Lo anterior también puede ser, por ejemplo, un valor de corte "óptimo". El valor de corte óptimo para un marcador dado es el valor en el que el producto de sensibilidad diagnóstica y especificidad es máxima para dicho marcador. La sensibilidad diagnóstica es la fracción relativa de pacientes portadores de la enfermedad o el riesgo de desarrollar la enfermedad (dependiendo de la cuestión diagnóstica o pronóstica que debe contestarse en cualquier caso particular), que son correctamente identificados como tales con un marcador ("verdaderos positivos") y la especificidad diagnóstica es la fracción relativa de pacientes no portadores de la enfermedad o el riesgo de desarrollar la enfermedad (dependiendo de la cuestión diagnóstica o pronóstica que debe contestarse en cualquier caso particular), que son identificados como tales con un marcador ("verdaderos negativos"). Esto puede ser un valor de corte optimizado para un valor predictivo negativo máximo o valor predictivo positivo máximo, dependiendo de las necesidades clínicas o económicas.

De esta manera, puede adoptarse el valor de corte dependiendo de si se considera más apropiado identificar la mayoría de los sujetos en riesgo a expensas de identificar también "los falsos positivos", o de si se considera más apropiado identificar principalmente los sujetos de alto riesgo a expensas de omitir varios sujetos con riesgo moderado.

El valor predeterminado puede establecerse basándose en grupos comparativos, tales como en los que el riesgo en un grupo definido es doble del riesgo en otro grupo definido. Puede ser un intervalo, por ejemplo, en el que la población sometida a ensayo se divide equitativamente (o no equitativamente) en grupos, tal como un grupo de riesgo baja, un grupo de riesgo medio y un grupo de alto riesgo, o en cuartiles, siendo el cuartil más bajo de individuos con el riesgo más bajo y siendo el cuartil más alto de individuos con el riesgo más alto.

El valor predeterminado puede variar entre poblaciones de referencia particulares seleccionadas, dependiendo de sus hábitos, etnicidad, genética, etc. De acuerdo con lo anterior, los valores predeterminados seleccionados pueden considerar la categoría en la que se encuentra un individuo. Pueden seleccionarse intervalos y categorías apropiados mediante simplemente experimentación rutinaria realizada por el experto ordinario en la materia.

La utilidad de los diversos niveles umbral, tal como se ha comentado anteriormente, puede visualizarse, por ejemplo, con gráficos de Kaplan-Meier (figuras 11 a 14), en los que se ilustra la incidencia de sucesos, es decir, en el presente caso: progresión de la enfermedad renal, con el tiempo, para subgrupos de la población de pacientes investigada: en la presente memoria, para cuatro análisis de Kaplan-Meier, cada población de pacientes investigada se separó en dos subgrupos. Los subgrupos se definieron de la manera siguiente:

- a) la población de pacientes investigada separada en un grupo con valores de MR-proANP superiores al nivel de la mediana (10^6 pmoles/l) y otro grupo que presenta valores de MR-proANP inferior al nivel de la mediana (figura 11),
- b) la población de pacientes investigada se separó en un grupo que presentaba valores de MR-proADM superiores al nivel de la mediana (0,75 nmoles/l) y otro grupo que presentaba valores de MR-proADM inferiores al nivel de la mediana (figura 12),
- c) la población de pacientes investigada se separó en un grupo que presentaba valores de MR-proADM superiores al nivel umbral óptimo (0,865 nmoles/l (sensibilidad de 0,766 y una especificidad de 0,809) y otro grupo que presentaba valores de MR-proADM inferiores al nivel umbral óptimo (figura 13),
- d) la población de pacientes investigada se separó en un grupo que presentaba valores de MR-proANP superiores al nivel umbral óptimo (84,15 pmoles/l (sensibilidad de 0,891 y una especificidad de 0,582) y otro grupo que presentaba valores de MR-proANP inferiores al nivel umbral óptimo (figura 14).

Los niveles umbral óptimos identificados en la presente invención se basan en la población particular investigada y pueden ser diferentes (+/- 20%) en otras poblaciones comparables debido a los motivos indicados anteriormente.

En el contexto de la presente invención, las expresiones "umbral", "valor umbral", "corte" y "valor de corte" se utilizan como sinónimos.

Dichos resultados son corroborados por el análisis de regresión de Cox (Tabla 4), demostrando la utilización de tanto MR-proANP como MR-proADM para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC) primaria.

Otras posibilidades matemáticas para calcular el riesgo de un individuo mediante la utilización del valor de MR-proADM y/o de MR-proANP de un individuo y otros parámetros de laboratorio y clínicos pronósticos son, por ejemplo, el IRN (el índice de reclasificación neta) o el IDI (el índice de discriminación integrada). Los índices pueden

calcularse según Pencina (Pencina M.J. et al., Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. Stat. Med. 27:157-172, 2008).

En determinadas formas de realización, no se utilizan umbrales particulares para uno o más marcadores en un panel para determinar si un perfil de niveles de marcador obtenido de un sujeto es indicativo de un diagnóstico/pronóstico particular. Por el contrario, la presente invención puede utilizar una evaluación de un "perfil" de panel de marcadores como entidad unitaria. Un patrón de cambios particular "huella digital" en dicho panel de marcadores puede actuar, en efecto, como indicador diagnóstico o pronóstico específico. Tal como se expone en la presente memoria, dicho patrón de cambios puede obtenerse a partir de una única muestra, o de cambios temporales en uno o más elementos del panel (o un valor de respuesta de panel). Un panel en la presente memoria se refiere a un conjunto de marcadores.

Puede obtenerse un valor de respuesta de panel mediante diversos métodos. Un ejemplo es el análisis de riesgos proporcionales de Cox. Otro ejemplo es la optimización de curvas de COR. Lo anterior puede conseguirse representando curvas de COR para la sensibilidad de un panel particular de marcadores frente a 1-(especificidad) para el panel en diversos valores de corte.

En dichos métodos, se considera un perfil de mediciones de marcador de un sujeto conjuntamente para proporcionar una probabilidad global (expresada como una puntuación numérica o como un porcentaje de riesgo) de un diagnóstico o pronóstico. En dichas formas de realización, un incremento en un determinado subgrupo de marcadores puede resultar suficiente para indicar un diagnóstico/pronóstico particular en un paciente, mientras que un incremento en un subgrupo diferente de marcadores puede resultar suficiente para indicar el mismo diagnóstico/pronóstico o uno diferente en otro paciente. También pueden aplicarse factores de ponderación a uno o más marcadores en un panel, por ejemplo en el caso de que un marcadores resulte de utilidad particularmente elevada para identificar un diagnóstico/pronóstico particular, puede ponderarse de manera que a un nivel dado por sí solo resulte suficiente para señalar un resultado positivo. De manera similar, un factor de ponderación puede proporcionar que ningún nivel dado de un marcador particular resulte suficiente para señalar un resultado positivo sino que únicamente señale un resultado en el caso de que otro marcador también contribuya al análisis.

En determinadas formas de realización, se seleccionan marcadores y/o paneles de marcadores que muestran una sensibilidad de por lo menos aproximadamente 70%, más preferentemente una sensibilidad de por lo menos aproximadamente 80%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 85%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%, en combinación con una especificidad de por lo menos aproximadamente 70%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%. En formas de realización particularmente preferidas, tanto la sensibilidad como la especificidad son de por lo menos aproximadamente 75%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 80%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 85%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%. El término "aproximadamente" en el presente contexto se refiere a +/- % de una medición dada.

En otras formas de realización, se utiliza una proporción de probabilidades positiva, una proporción de probabilidades negativa, un cociente de probabilidades ("odds ratio") o un cociente de riesgos instantáneos ("hazard ratio") como medida de la capacidad de un ensayo de predecir el riesgo o de diagnosticar una enfermedad. En el caso de una proporción de probabilidades positiva, un valor de 1 indica que es igualmente probable un resultado positivo entre sujetos tanto en el grupo "enfermo" como en el grupo "de control"; un valor superior a 1 indica que es más probable un resultado positivo en el grupo enfermo y un valor inferior a 1 indica que es más probable un resultado positivo en el grupo de control. En el caso de una proporción de probabilidades negativa, un valor de 1 indica que es igualmente probable un resultado negativo entre sujetos tanto en el grupo "enfermo" como en el grupo "de control"; un valor superior a 1 indica que es más probable un resultado negativo en el grupo de ensayo, y un valor inferior a 1 indica que es más probable un resultado negativo en el grupo de control. En determinadas formas de realización preferidas, preferentemente se seleccionan marcadores y/o paneles de marcadores para que muestren una proporción de probabilidades positiva o negativa de por lo menos aproximadamente 1,5 o superior, o de aproximadamente 0,67 o inferior, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 2 o superior o de aproximadamente 0,5 o inferior, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 5 o superior o de aproximadamente 0,2 o inferior, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 10 o superior o de aproximadamente 0,1 o inferior, y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 20 o superior o de aproximadamente 0,05 o inferior. El término "aproximadamente" en el presente contexto se refiere a +/- 5% de una medición dada.

En el caso de un cociente de probabilidades, un valor de 1 indica que es igualmente probable un resultado positivo entre sujetos tanto en el grupo "enfermo" como en el grupo "de control"; un valor superior a 1 indica que es más probable un resultado positivo en el grupo enfermo; y un valor inferior a 1 indica que es más probable un resultado positivo en el grupo de control. En determinadas formas de realización preferidas, preferentemente se seleccionan marcadores y/o paneles de marcadores para que muestren un cociente de probabilidades de por lo menos aproximadamente 2 o superior o de aproximadamente 0,5 o inferior, más preferentemente de por lo menos

aproximadamente 3 o superior o de aproximadamente 0,33 o inferior, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 4 o superior o de aproximadamente 0,25 o inferior, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 5 o superior o de aproximadamente 0,2 o inferior, y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 10 o superior o de aproximadamente 0,1 o inferior. El término "aproximadamente" en el presente contexto se refiere a +/- 5% de una medición dada.

En el caso de un cociente de riesgos instantáneos, un valor de 1 indica que el riesgo relativo de un punto final (por ejemplo la muerte) es igual tanto en el grupo "enfermo" como en el grupo "de control"; un valor superior a 1 indica que el riesgo es superior en el grupo enfermo y un valor inferior a 1 indica que el riesgo es superior en el grupo de control. En determinadas formas de realización preferidas, se seleccionan preferentemente marcadores y/o paneles de marcadores que muestran un cociente de riesgos instantáneos de por lo menos aproximadamente 1,1 o de aproximadamente 0,91 o inferior, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 1,25 o superior o de aproximadamente 0,8 o inferior, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 1,5 o superior o de aproximadamente 0,67 o inferior, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 2 o superior o de aproximadamente 0,5 o inferior, y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 2,5 o superior o de aproximadamente 0,4 o inferior. El término "aproximadamente" en el presente contexto se refiere a +/- 5% de una medición dada.

El experto en la materia apreciará que la asociación de un indicador diagnóstico o pronóstico con un diagnóstico o con un riesgo predictivo de un resultado clínico futuro es un análisis estadístico. Por ejemplo, un nivel de marcador superior a X puede señalar que es más probable que un paciente sufra de un resultado adverso que los pacientes con un nivel inferior o igual a X, determinado por un nivel de significancia estadística. Además, un cambio en la concentración del marcador respecto a niveles de línea base puede reflejar el pronóstico del paciente y el grado de cambio del nivel del marcador puede estar relacionado con la gravedad de los sucesos adversos. La significancia estadística con frecuencia se determina mediante la comparación entre dos o más poblaciones y determinando un intervalo de confianza y/o un valor de p. Ver, por ejemplo, Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes de la invención son 90%, 95%, 97,5%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% y 99,99%, mientras que los valores de p preferentes son 0,1, 0,05, 0,025, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 y 0,0001.

En todavía otras formas de realización, pueden llevarse a cabo múltiples determinaciones de marcadores diagnósticos o pronósticos y puede utilizarse un cambio temporal en el marcador para determinar un diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, puede determinarse una concentración de marcador en una muestra del sujeto en un tiempo inicial y nuevamente en un segundo tiempo de una muestra de un segundo sujeto. En dichas formas de realización, un incremento en el marcador entre el tiempo inicial y el segundo tiempo puede ser indicativo de un diagnóstico particular o de un pronóstico particular. De manera similar, una reducción en un marcador entre un tiempo inicial y el segundo tiempo puede ser indicativa de un diagnóstico particular o de un pronóstico particular.

El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra de líquido corporal obtenida para el propósito de diagnosticar, pronosticar o evaluar un sujeto de interés, tal como un paciente. Entre las muestras de ensayo preferentes se incluyen sangre, suero, plasma, líquido cerebroespinal, orina, saliva, esputo y efusiones pleurales. Además, el experto en la materia será consciente de que algunas muestras de ensayo se analizarían más fácilmente después de un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo la separación de la sangre completa en componentes suero o plasma.

De esta manera, en una forma de realización preferida del método *in vitro* según la invención, dicha muestra se selecciona de entre el grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma y una muestra de orina o un extracto de cualquiera de las muestras anteriormente indicadas.

El término "paciente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un organismo humano o no humano vivo que está recibiendo atención médica o que debería recibir atención médica debido a una enfermedad. Lo anterior incluye personas sin ninguna enfermedad definida que están siendo investigados por signos de patología. De esta manera, los métodos y ensayos indicados en la presente memoria son aplicables a enfermedades tanto humanas como veterinarias.

El término "correlacionar", tal como se utiliza en la presente memoria en referencia a la utilización de marcadores diagnósticos y pronósticos, se refiere a la comparación de la presencia o la cantidad del marcador o marcadores en un paciente con su presencia o cantidad en personas que es conocido que sufren de, o que es conocido que presentan un riesgo de una condición dada, o en personas que es conocido que se encuentran libres de una condición dada. Tal como se ha comentado anteriormente, un nivel de marcador en una muestra del paciente puede compararse con un nivel que es conocido que se asocia a un diagnóstico específico. El nivel del marcador en la muestra se dice que está correlacionado con un diagnóstico; es decir, el experto en la materia puede utilizar el nivel del marcador para determinar si el paciente sufre de un diagnóstico de tipo específico y responde de acuerdo con ello. Alternativamente, el nivel del marcador en la muestra puede compararse con un nivel de marcador que es conocido que está asociado a un buen resultado (por ejemplo la ausencia de enfermedad, etc.). En formas de

realización preferentes, un perfil de niveles de marcadores se correlaciona con una probabilidad global o un resultado particular.

Un "pronóstico" se refiere a la asignación de una probabilidad de que se produzca un curso o resultado dado. Esto con frecuencia se determina examinando uno o más "indicadores pronósticos". Estos son marcadores la presencia o cantidad de los cuales en un paciente (o en una muestra obtenida del paciente) señalan una probabilidad de que se produzca un curso o resultado dado. Por ejemplo, en el caso de que uno o más indicadores pronósticos alcancen un nivel suficientemente elevado en muestras obtenidas de dichos pacientes, el nivel puede señalar que el paciente presente una probabilidad incrementada de progresar finalmente a enfermedad renal de estadio terminal (ERET), es decir, el paciente presenta una probabilidad incrementada de ser un "paciente que ha progresado".

En una forma de realización preferida de la invención se mide el nivel de MR-proADM. MR-proADM comprende los aminoácidos 45 a 92 de la pre-proADM.

Asimismo el nivel de proADM o fragmentos del mismo puede medirse utilizando un ensayo diagnóstico utilizando una o más sondas de captura dirigidas contra uno o más epítomos situados en las posiciones aminoácidas 45 a 92 de pre-proADM.

Asimismo puede medirse el nivel de MR-proANP. MR-proANP se refiere a cualesquiera fragmentos de proANP que comprenden los aminoácidos 53 a 90 de proANP.

Puede medirse el nivel de proANP o fragmentos de la misma utilizando un ensayo diagnóstico utilizando una o más sondas de captura dirigidas contra uno o más epítomos situados en las posiciones aminoácidas 53 a 90 de proANP.

Tal como se ha indicado anteriormente, un "ensayo" o "ensayo diagnóstico" puede ser cualquier tipo aplicado en el campo de los diagnósticos. Dicho ensayo puede basarse en la unión de un analito que debe detectarse a una o más sondas de captura con una determinada afinidad. En referencia a la interacción entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés, la constante de afinidad preferentemente es superior a 10^8 M⁻¹.

El nivel de los marcadores anteriormente indicados puede obtenerse mediante cualquier método reconocido de la técnica. Típicamente, el nivel se determina mediante la medición del nivel o actividad del marcador en un líquido corporal, por ejemplo sangre, linfa, saliva, orina y similares. El nivel puede determinarse mediante inmunoensayos u otras técnicas convencionales para la determinación del nivel del marcador. Entre los métodos reconocidos se incluyen enviar las muestras de un líquido corporal del paciente a un laboratorio comercial para la medición, aunque también realizar la medición en un punto de atención.

En el contexto de la presente invención, las "moléculas de captura" son moléculas que pueden utilizarse para la unión a moléculas diana o moléculas de interés, es decir, analitos, de una muestra. De esta manera, las moléculas de captura deben conformarse adecuadamente, tanto especialmente como en términos de las características superficiales, tales como la carga superficial, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, la presencia o ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para la unión específicamente a las moléculas diana o moléculas de interés. En la presente memoria, la unión puede estar mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, de van der Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrófobas o de enlaces de hidrógeno o una combinación de dos o más de las interacciones anteriormente indicadas entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, las moléculas de captura pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que comprende una molécula de ácidos nucleicos, una molécula de carbohidrato, una molécula de PNA, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glucoproteína. Preferentemente, las moléculas de captura son anticuerpos, incluyendo fragmentos de los mismos con suficiente afinidad para una diana o molécula de interés, e incluyen anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo recombinantes, así como derivados modificados química y/o bioquímicamente de dichos anticuerpos o fragmentos derivados de la cadena variante con una longitud de por lo menos 12 aminoácidos.

Los métodos de detección preferidos comprenden inmunoensayos en diversos formatos, tales como, por ejemplo, radioinmunoensayos, inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, inmunoensayos ligados a enzima (ELISA), matrices de perlas basadas en Luminex, ensayos de micromatrices de proteínas y formatos de ensayo rápido tales como, por ejemplo, ensayos de tira inmunocromatográfica.

Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos de tipo sándwich competitivos y no competitivos. En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo se encuentra en forma de un ensayo de tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en el que la molécula que debe detectarse y/o cuantificarse se une a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede encontrarse unido a una fase sólida, por ejemplo una perla, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que se encuentra marcado, por ejemplo con un pigmento, con un isótopo radioactivo o un reactivo o fracción catalíticamente activa. La cantidad de anticuerpo marcado unido al analito segundamente se mide mediante un método apropiado. La composición general y procedimientos incluidos en los "ensayos de tipo sándwich" están bien establecidos y son conocidos por el experto en la materia (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford, 3a ed. (mayo de 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C. et

al., Curr. Opin. Chem. Biol. 10(1):4-10, feb. de 2006. PMID: 16376134), incorporadas en la presente memoria como referencia.

En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferentemente anticuerpos que se encuentran presentes tanto como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en la que un primer componente de marcaje se une a la primera molécula de captura, en al que dicho primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado en la desactivación o amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje se une a la segunda molécula de captura, de manera que tras la unión de ambas moléculas de captura al analito, se genera una señal medible que permite la detección de los complejos sándwich formados en la solución que comprende la muestra.

Todavía más preferentemente, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierra rara o quelatos de tierra rara en combinación con un pigmento fluorescente o un pigmento quimioluminiscente, en particular un pigmento del tipo cianina.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia comprenden la utilización de pigmentos, los cuales pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que comprende FAM (5- o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, fluoresceinisotiocianato (FITC), IRD-700/800, pigmentos de cianina, tales como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexafluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G (R6G), rodamina, verde rodamina, rojo rodamina, rodamina 110, pigmentos BODIPY, tales como BODIPY TMR, verde Oregon, coumarinas tales como umbeliferona, bencimidaz, tales como Hoechst 33258, fenantridinas tales como rojo Texas, amarillo Yakima, Alexa fluor, PET, bromuro de etidio, pigmentos de acridinio, pigmentos carbazol, pigmentos de fenoxazina, pigmentos porfirina, pigmentos de polimetina y similares.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en quimioluminiscencia comprenden la utilización de pigmentos, basados en los principios físicos descritos para los materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 4a ed., editor ejecutivo, J.I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, vol. 15:518-562, 1993, incorporada en la presente memoria como referencia, incluyendo las citas en las páginas 551 a 562. Los pigmentos quimioluminiscentes preferentes son los ésteres de acridinio.

En una forma de realización especialmente preferida, se utiliza un ensayo MR-proADM que presenta un límite de detección inferior a 0,3 nmoles/l y una precisión interensayo <30% CV en el intervalo normal para la predicción de un primer suceso adverso en un sujeto o la identificación de un sujeto que presenta un riesgo incrementado de sufrir un primer suceso adverso.

Asimismo es divulgada la utilización de una sonda de captura, por ejemplo un anticuerpo dirigido contra proADM o fragmentos de la misma para la predicción de un primer suceso adverso en un sujeto o para la identificación de un sujeto que presenta un riesgo incrementado de sufrir un primer suceso adverso.

Resulta especialmente preferida en el contexto de la presente invención la utilización de uno o más anticuerpos que están dirigidos contra un epítipo incluido en las posiciones aminoácidas 45 a 92 de pre-proADM.

Ejemplos

Ejemplo 1: estudio de la enfermedad renal leve a moderada (ERLM)

El objetivo del presente estudio es investigar el valor predictivo de ANP y ADM, utilizando nuevos inmunoensayos de tipo sándwich que cubren los epítipos de región intermedia de los fragmentos prohormona más estables (MR-proANP y MR-proADM) para la progresión de la enfermedad renal en un estudio prospectivo de seguimiento de 7 años en una cohorte de pacientes con ERC primaria.

Resultados

La Tabla 1 muestra las concentraciones plasmáticas de NT-proBNP, MR-proANP y MR-proADM en TFG estratificadas iniciales en estadios según las directrices de práctica clínica K/DOQI para la enfermedad renal crónica. Se observó un incremento continuo de las medianas de concentración plasmática de NT-proBNP, MR-proANP y MR-proADM en todos los estadios de ERC. Además, los análisis no paramétricos de correlación revelaron asociaciones significativas entre TFG y los tres parámetros (Tabla 2).

El seguimiento se encontraba disponible para 177 de los 227 pacientes incluidos en el estudio. La mediana de duración del seguimiento tras completar la investigación de valores iniciales era de 53 meses (intervalo de 3 a 84 meses). Durante el seguimiento, 65 pacientes progresaron al punto final que era la duplicación de la creatinina sérica sin alcanzar la ERET en 36 pacientes y ERET que requería terapia de reemplazo renal en 29 pacientes. La

Tabla 3 informa de las características de valores iniciales de los pacientes de ERC para los pacientes que habían progresado y para los que no habían progresado. Los pacientes que alcanzaron el punto final de progresión eran de mayor edad, presentaban tasas de excreción de proteínas más altas, así como una TFG más baja. Además, las medianas de concentración plasmática de NT-proBNP, MR-proANP y MR-proADM eran más altas en los pacientes que habían progresado que en los que no habían progresado (NT-proBNP, 321 vs. 84 ng/ml; MR-proANP, 164 vs. 74 pmoles/l, y MR-proADM, 1,13 vs. 0,55 nmoles/l).

Los análisis de la curva de Kaplan-Meier de los 177 pacientes con ERC que se estratificaron en dos grupos según la mediana de MR-proANP y MR-proADM en los valores iniciales se muestran en las figuras 11 a 12. Los pacientes que presentaban valores de TFG inferiores a la mediana y las concentraciones plasmáticas inferiores a la mediana de MR-proANP y MR-proADM superiores a la mediana presentaban un pronóstico renal peor y un tiempo de progresión significativamente más corto que los pacientes con valores de TFG superiores a la mediana y concentraciones plasmáticas de MR-proANP y MR-proADM inferiores a la mediana [tiempo medio hasta la progresión en meses de 51,1 (IC al 95%: 45,2 a 57,1) vs. 71,4 (IC al 95%, 64,7 a 78,1), $p<0,001$ para MR-proANP; y 51,6 (IC al 95%, 45,6 a 57,6) vs. 73,6 (IC al 95%, 68,5 a 78,6), $p<0,001$ para MRproADM, respectivamente]. Los análisis de regresión univariante de riesgos proporcionales de Cox utilizando el enfoque de estratificar las variables predictivas según los valores de la mediana revelaron proporciones de riesgos (PR) significativamente reducidas para la TFG sobre la mediana (PR 0,12, IC al 95%, 0,06 a 0,24, $p<0,001$) y PR significativamente incrementadas para concentraciones sobre la mediana en los valores iniciales para NT-proBNP (PR 3,84, IC al 95%, 2,14 a 6,89, $p<0,001$), MR-proANP (PR 4,47, IC al 95%, 2,46 a 8,12, $p<0,001$) y MR-proADM (PR 5,84, IC al 95%, 3,04 a 11,21, $p<0,001$).

Los resultados de los análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox utilizando un enfoque incremental para las variables predictivas se proporcionan en la Tabla 4. En el modelo 1 con ajustes para edad y sexo, TFG, proteinuria, NT-proBNP, MR-proANP y MR-proADM revelaron PR significativas para la progresión de la enfermedad renal. Tras los ajustes adicionales para TFG y proteinuria, la PR para MR-proANP y MR-proADM se encontraban ligeramente atenuadas aunque ambas variables continuaron estando fuertemente asociadas con la progresión de la enfermedad, mientras que la PR para NT-proBNP ya no era significativa (modelo 2). Incluso tras el ajuste adicional para NT-proBNP, tanto MR-proANP como MR-proADM siguieron siendo factores predictivos fuertes de progresión de la enfermedad renal (modelo 3). Debido a que varias de las variables investigadas no presentaban una distribución normal, los presentes inventores llevaron a cabo un análisis de sensibilidad mediante la inclusión en el modelo de las variables transformadas mediante Ln. Estos análisis revelaron resultados muy similares (datos no representados), con la excepción de NT-proBNP, que se mantuvo significativa tras ajustes para edad, sexo, TFG y proteinuria (PR 1,59, IC al 95%, 1,15 a 2,19, $p=0,005$). Sin embargo, para una mejor interpretabilidad de las estimaciones, los presentes inventores presentan los datos en la escala original.

Adicionalmente, los presentes inventores investigaron si tanto MR-proANP como MR-proADM independientemente mejoraban la predicción de la progresión de la ERC mediante la inclusión de ambas variables en el mismo modelo de regresión de Cox y realizando ajustes para edad, sexo, TFG y proteinuria. Las proporciones de riesgos de ambas variables se redujeron (en comparación con las estimaciones en el modelo 2 de la Tabla 4) pero se mantuvieron significativas (PR 1,60, IC al 95%, 1,11 a 2,30, $p=0,011$ para MR-proANP y PR 1,96, IC al 95%, 1,31 a 2,94, $p<0,001$ para MR-proADM).

En un análisis secundario los presentes inventores incluyeron sólo los pacientes en estadio 3 y superior según las directrices de práctica clínica K/DOQI para enfermedad renal crónica (TFG <60 ml/min/1,73 m²). Los presentes inventores observaron estimaciones muy similares, tal como se presenta en los modelos 2 y 3 de la Tabla 4 para el grupo entero (datos no mostrados).

Exposición

El presente estudio es la primera observación prospectiva a largo plazo que investiga el valor pronóstico de MR-proANP y MR-proADM para la progresión de la enfermedad renal en pacientes caucásicos con ERC primaria. Los datos de los presentes inventores indican que las concentraciones plasmáticas incrementadas de MR-proANP y MR-proADM en los valores iniciales son factores predictivos fuertes de resultados renales que incluso son independientes de la TFG.

Mediante la adopción de las recomendaciones K/DOQI y estimaciones publicadas periódicamente de TFG de muchos laboratorios, se ha alcanzado un éxito sustancial en el cribado de la ERC no diagnosticada (National Kidney Foundation, Am. J. Kidney Dis. 39(2 supl. 1):S1-266, 2002; Centros para el control y prevención de enfermedades (CDC), Morb. Mortal Wkly Rep. 56:161-165, 2007). Sin embargo, existe una necesidad urgente de una estratificación adicional según riesgo y de la identificación de factores predictivos de riesgo adicionales a fin de dirigir las intervenciones a aquellos pacientes que presentan ERC que es más probable que progresen a ERET.

Un importante resultado del presente estudio es el hecho de que MR-proANP y MR-proADM estaban fuertemente correlacionadas con TFG medida mediante iohexol, que se ha informado que se aproxima al estándar de oro de medición de la función renal (Bostom et al., J. Am. Soc. Nephrol. 13:2140-2144, 2002). Los presentes inventores

observaron un incremento continuo de las concentraciones plasmáticas de MR-proANP y MR-proADM en los diferentes estadios de TFG, indicando una asociación con la gravedad de la enfermedad. Dicha fuerte correlación con la TFG podría atribuirse al hecho probado de que ANP y ADM son producidas en el riñón (Vesely et al., Am. J. Physiol. Renal Physiol. 285:167-177, 2003) y a que ambas presentan importantes funciones biológicas en el riñón (Vesely et al., Cardiovasc. Res. 51:647-658, 2001; Nishikimi et al., Curr. Med. Chem. 14:1689-1699, 2007). Además, se ha informado de las propiedades renoprotectoras de ambos péptidos, sugiriendo una función compensadora de las concentraciones incrementadas de ANP y ADM en la ERC (Vesely et al., Cardiovasc. Res. 51:647-658, 2001; Vesely et al., Am. J. Physiol. Renal Physiol. 285:167-177, 2003; Nishikimi et al., Curr. Med. Chem. 14:1689-1699, 2007).

En el contexto evaluado, los valores pronósticos de MR-proANP y MR-proADM eran comparables con el de la TFG, un marcador pronóstico establecido aunque difícil de determinar para la progresión de la enfermedad renal. En los modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox con ajustes para edad y sexo, el comportamiento de la TFG, MR-proANP y MR-proADM era similar. Sin embargo, resulta importante indicar que aparte de la TFG, tanto MR-proANP como MR-proADM añadieron significativamente a la predicción de progresión de la enfermedad. Un incremento de cada uno de ambos parámetros en una desviación estándar estaba asociado a un riesgo de progresión de la enfermedad superior al doble incluso tras el ajuste para la TFG de valores iniciales. Aunque los presentes inventores añadiesen ambos parámetros simultáneamente al modelo, el resultado era una contribución significativa e independiente de ambos parámetros a la predicción del riesgo.

La capacidad predictiva de NT-proBNP era más baja que la de TFG, MR-proANP o MR-proADM.

Resulta importante indicar que la TFG en el presente estudio no se calculó mediante una fórmula sino que se midió a partir de la eliminación del iohexol, que se considera un método exacto para la medición de la función renal. Sin embargo, este método resulta laborioso y es una carga para el paciente debido a la aplicación de medios de contraste y la recolección de varias muestras de sangre. La medición de MR-proANP o MR-proADM es un método alternativo y simple que proporciona una buena aproximación de la función renal y un predictor de buen comportamiento de progresión de la enfermedad renal que funciona igual de bien que la TFG.

En resumen, el trabajo de los presentes inventores demuestra que las concentraciones plasmáticas incrementadas de MR-proANP y MR-proADM en los valores iniciales son potentes factores predictivos de progresión de la enfermedad renal. Por lo tanto, ambos marcadores resultan clínicamente útiles como factores predictivos en pacientes con ERC primaria.

Métodos breves

Muestra de estudio

En los valores iniciales se incluyeron 227 pacientes caucásicos de edades comprendidas entre 18 y 65 años con ERC y diversos grados de alteración renal en el estudio de enfermedad renal leve a moderada (ERLM). Estos pacientes incluidos procedían de 8 departamentos de nefrología, tal como se indica en Kronenberg et al. (J. Am. Soc. Nephrol. 11:105-115, 2000). Dicho estudio había sido autorizado por el comité ético de la institución y todos los participantes proporcionaron su consentimiento informado por escrito. Presentaban una función renal estable durante como mínimo los 3 meses anteriores a la entrada en el estudio. Los criterios de exclusión fueron el tratamiento con agentes inmunosupresores, aceite de pescado o eritropoyetina, niveles de creatinina sérica superiores a 6 mg/dl, diabetes mellitus de cualquier tipo, neoplasias malignas, enfermedad hepática, tiroidea o infecciosa, síndrome nefrótico (definida como proteinuria >3,5 g/1,73 m²/día), trasplante de órgano, alergia a medios de contraste iónicos y embarazo. Con el fin de evitar las diferencias entre observadores, todos los pacientes fueron incluidos por un médico que visitaba en todos los centros participantes. Se registró la historia del paciente, incluyendo los hábitos tabáquicos y el tratamiento antihipertensor en los valores iniciales, mediante entrevista y se confirmó mediante comprobación de la historia clínica del paciente. Lo anterior se complementó mediante el examen clínico, que incluía la evaluación del índice de masa corporal y la tensión arterial. Se definió la hipertensión como una tensión arterial superior a 140/90 mm de Hg y/o la utilización de medicación antihipertensiva. Se suspendió la medicación antihipertensiva el día de inclusión en el estudio con el fin de minimizar la interferencia con las mediciones de la TFG. Los fármacos antihipertensivos eran utilizados por 179 pacientes (79%): diuréticos (n=83, 37%), inhibidores de la ACE (n=123, 54%), bloqueantes de los canales del calcio (n=78, 34%), bloqueantes de los receptores beta (n=67, 30%) y los bloqueantes de los receptores alfa-1 (n=36, 16%).

La causa primaria de enfermedad renal era la glomerulonefritis en 97 (confirmado mediante biopsia en 90) pacientes, enfermedad renal poliquística adulta en 37 pacientes, nefritis intersticial en 24 pacientes, otros tipos de enfermedad renal en 43 pacientes y desconocido en 26 pacientes. La distribución de los pacientes en los estudios de ERC según las directrices de práctica clínica K/DOQI para la clasificación de las enfermedades renales crónicas² se proporciona en la Tabla 1.

El criterio de evaluación de la investigación de seguimiento se definió como la duplicación de los niveles de valores iniciales de creatinina sérica y/o ERET que requiriese terapia de reemplazo renal. De la cohorte primaria de 227

pacientes, 177 pacientes (78%) fueron seguidos prospectivamente durante un periodo de hasta 84 meses (Boes et al., J. Am. Soc. Nephrol. 17:528-536, 2006). Los pacientes se encontraban bajo control periódico en la unidad de atención ambulatoria y los resultados de evaluación fueron informados al centro coordinador del estudio. Los pacientes perdidos durante el seguimiento habían vuelto a su domicilio o no habían sido remitidos a los centros de estudio tras la investigación de valores iniciales. En comparación con los pacientes con seguimiento, dichos pacientes presentaban una función renal significativamente mejor en los valores iniciales pero no diferían significativamente en sexo y edad.

Análisis bioquímicos

Se extrajeron muestras de sangre tras un ayuno durante noche de por lo menos 12 horas. Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 1.500 g y 4°C durante 10 minutos y se almacenaron los sobrenadantes en alícuotas a -80°C hasta la utilización posterior. Se evaluó la TFG en los pacientes utilizando la técnica de eliminación del iohexol, tal como se indica en detalle en Bostom et al. (J. Am. Soc. Nephrol. 13:2140-2144, 2002). Los análisis bioquímicos rutinarios, incluyendo la creatinina sérica, la proteinuria, la albúmina sérica y la proteína C-reactiva de alta sensibilidad, se llevaron a cabo tal como se indica en Kronenberg et al. (J. Am. Soc. Nephrol. 11:105-115, 2000). Se midió la NT-proBNP plasmática en un sistema Modular Analytics E170 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) (Spanaus et al., Clin. Chem. 53:1264-1272, 2007). Se midieron las concentraciones plasmáticas de MR-proANP y MR-proADM utilizando ensayos inmunoluminométricos disponibles comercialmente (B.R.A.H.M.S. AG, Hennigsdorf, Alemania). La precisión de dichos dos métodos ha sido evaluada y descrita anteriormente (Morgenthaler et al., Clin. Chem. 50:234-236, 2004; Morgenthaler et al., Clin. Chem. 51:1823-1829, 2005).

Análisis estadísticos

Se llevaron a cabo los análisis estadísticos utilizando el software SPSS versión 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) y el paquete MedCalc 9.4.2.0 (software MedCalc, Mariakerke, Bélgica). Las comparaciones univariantes de las variables continuas entre los diversos grupos se llevaron a cabo utilizando ANOVA univariante, pruebas t no apareadas o las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis o de suma de rangos de Wilcoxon en el caso de variables distribuidas no normalmente. Se compararon las variables dicotomizadas utilizando pruebas χ^2 de Pearson. Los datos se presentan como medias $\pm$ desviaciones estándar (DS) y como medianas y percentiles 25 y 75 para las variables con sesgo, en su caso. Se utilizó el coeficiente de Spearman de correlación de rangos (r_s) para evaluar la relación entre los cuatro parámetros de estudio principales (es decir, TFG, NT-proBNP, MR-proANP y MR-proADM). Se generaron las estimaciones de Kaplan-Meier de la distribución de tiempos entre los valores iniciales y los criterios de evaluación renal, para los pacientes con TFG, NT-proBNP, MR-proANP y MR-proADM superiores e inferiores al valor de la mediana de la población de estudio entera; se calcularon las pruebas de rangos logarítmicos para comparar las curvas de supervivencia entre grupos. Se llevó a cabo un análisis de regresión univariante de riesgos proporcionales de Cox, con la totalidad de los cuatro parámetros dicotomizados según la mediana de concentración de la cohorte entera. Además, se calcularon las estimaciones de riesgo ajustadas para los criterios de evaluación de la progresión utilizando un enfoque incremental para incremento de 1 desviación estándar (DS) de los datos respectivos. Todas las probabilidades eran de dos colas y se consideraron significativos los valores de $P < 0,05$.

Tabla 1: datos clínicos y de laboratorio de valores iniciales de 227 pacientes estratificados según la tasa de filtración glomerular (TFG) en los estadios de la National Kidney Foundation

	TFG ml/min./1,73 m ²				Valor de p*
	≥ 90 (n=72)	60-89 (n=49)	30-59 (n=63)	< 30 (n=43)	
Sexo (masculino/femenino), n (%)	50/22 (69,4/30,6)	34/15 (69,4/30,6)	44/19 (68,8/30,2)	26/17 (60,5/39,5)	0,72
Edad (años)	39,9 $\pm$ 13,2	46,1 $\pm$ 11,6	45,9 $\pm$ 11,5	54,4 $\pm$ 8,5	$< 0,001$
Índice de masa corporal (kg/m ²)	24,0 $\pm$ 3,3	25,6 $\pm$ 3,8	25,4 $\pm$ 3,4	26,1 $\pm$ 4,8	0,02
Fumadores actuales, n (%)	18 (25)	11 (22)	11 (18)	9 (21)	0,97
Tensión arterial sistólica (mmHg)	134 $\pm$ 21	140 $\pm$ 24	139 $\pm$ 19	137 $\pm$ 19	0,21
Tensión arterial diastólica (mmHg)	84 $\pm$ 13	88 $\pm$ 15	88 $\pm$ 14	88 $\pm$ 13	0,20
Creatinina sérica (mg/dl)	1,14 $\pm$ 0,22 [0,95;1,11;1,30]	1,54 $\pm$ 0,45 [1,25;1,43;1,70]	2,31 $\pm$ 0,79 [1,70;2,18;2,80]	3,63 $\pm$ 1,28 [2,73;3,50;4,61]	$< 0,001$
TFG (ml/min/1,73 m ²)	120 $\pm$ 28 [97;110;132]	74 $\pm$ 9 [65;71;81]	44 $\pm$ 7 [38;44;50]	19 $\pm$ 7 [12;18;26]	$< 0,001$
Proteinuria (g/24 h/1,73 m ²)	0,60 $\pm$ 0,66 [0,13;0,36;0,82]	1,10 $\pm$ 1,10 [0,16;0,57;1,93]	1,08 $\pm$ 0,94 [0,27;0,81;1,83]	1,03 $\pm$ 0,81 [0,36;0,89;1,52]	0,004
Albúmina sérica (g/dl)	4,70 $\pm$ 0,38	4,46 $\pm$ 0,50	4,55 $\pm$ 0,38	4,53 $\pm$ 0,34	0,01

Proteína C reactiva de alta sensibilidad (mg/l)	0,21 ± 0,27 [0,04;0,09;0,23]	0,32 ± 0,33 [0,13;0,21;0,42]	0,23 ± 0,21 [0,06;0,14;0,36]	0,35 ± 0,38 [0,08;0,18;0,53]	0,01
NT-proBNP (ng/l) [†]	64 ± 76 [22;39;76]	180 ± 221 [45;91;199]	380 ± 616 [78;173;409]	769 ± 846 [232;456;1002]	<0,001
MR-proANP (pmoles/l) [†]	56 ± 28 [37;49;68]	95 ± 49 [60;78;120]	159 ± 123 [82;130;193]	279 ± 161 [168;248;339]	<0,001
MR-proADM (nmoles/l) [†]	0,43 ± 0,12 [0,33;0,42;0,49]	0,65 ± 0,20 [0,50;0,63;0,78]	0,90 ± 0,30 [0,69;0,89;1,01]	1,34 ± 0,39 [1,15;1,28;1,52]	<0,001

Abreviaturas: TFG, tasa de filtración glomerular; MR-proADM, pro-adrenomedulina de región intermedia; MR-proANP, péptido natriurético de tipo proA de región intermedia; NT-proBNP, péptido natriurético de tipo proB aminoterminal.

*Los valores de P son para la comparación entre los 4 grupos obtenidos de la prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA univariante y prueba de Chi cuadrado, en su caso.

Los datos se presentan como medias ± DS y percentiles 25, 50 (=mediana) y 75 para las variables con sesgo, en su caso.

[†] Los niveles plasmáticos de NT-proBNP, MR-proANP y MR-proADM se encontraban disponibles en 222, 221 y 220 de los 227 pacientes, respectivamente.

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Spearman (valores de p) entre las variables TFG, concentraciones plasmáticas de NT-proBNP, MR-proANP y MR-proADM en los 227 pacientes incluidos en los valores iniciales.

	NT-proBNP	MR-proANP	MR-proADM
TFG	-0,609 (<0,001)	-0,705 (<0,001)	-0,815 (<0,001)
NT-proBNP		0,888 (<0,001)	0,737 (<0,001)
MR-proANP		0,845 (<0,001)	

Abreviaturas: TFG, tasa de filtración glomerular; MR-proADM, pro-adrenomedulina de región intermedia; MR-proANP, péptido natriurético de tipo proA de región intermedia; NT-proBNP, péptido natriurético de tipo proB aminoterminal.

Tabla 3: datos clínicos y de laboratorio de valores iniciales de 177 pacientes con seguimiento completado y estratificación adicional de aquellos con y sin progresión de la enfermedad renal durante el periodo de seguimiento

	Pacientes que no han progresado (n=112)	Pacientes que han progresado (n=65)	Valor de p
Sexo (masculino/femenino), n (%)	74/38 (66/34)	44/21 (68/32)	0,83
Edad (años)	44,8 ± 12,6	49,1 ± 11,1	0,03
Índice de masa corporal (kg/m ²)	24,9 ± 3,5	25,7 ± 3,9	0,13
Fumadores actuales, n (%)	18 (16)	16 (25)	0,21
Tensión arterial sistólica (mmHg)	136 ± 22	137 ± 17	0,72
Tensión arterial diastólica (mmHg)	86 ± 14	88 ± 12	0,34
Creatinina sérica (mg/dl)	1,54 ± 0,61 [1,14;1,40;1,80]	3,21 ± 1,31 [2,21;3,10;3,94]	<0,001
Tasa de filtración glomerular (ml/min/1,73 m ²)	79 ± 38 [50;74;99]	38 ± 25 [20;33;46]	<0,001
Proteinuria (g/24 h/1,73 m ²)	0,87 ± 0,95 [0,14;0,46;1,25]	1,25 ± 0,83 [0,61;1,09;1,78]	<0,001
Albúmina sérica (g/dl)	4,57 ± 0,43	4,53 ± 0,36	0,50
Proteína C reactiva de alta sensibilidad (mg/l)	0,28 ± 0,32 [0,07;0,17;0,39]	0,29 ± 0,31 [0,08;0,16;0,43]	0,59
NT-proBNP (ng/l)*	182 ± 305 [44;84;176]	579 ± 717 [117;321;745]	<0,001
proANP (pmoles/l)*	97 ± 66 [48;74;128]	225 ± 171 [111;164;274]	<0,001
proADM (nmoles/l)*	0,63 ± 0,28 [0,43;0,55;0,79]	1,15 ± 0,42 [0,91;1,13;1,36]	<0,001

Abreviaturas: TFG, tasa de filtración glomerular; MR-proADM, pro-adrenomedulina de región intermedia; MR-proANP, péptido natriurético de tipo proA de región intermedia; NT-proBNP, péptido natriurético de tipo proB aminoterminal.

Los datos se presentan como medias $\pm$ DS y percentiles 25, 50 (=mediana) y 75 para las variables con sesgo, en su caso.

*Los niveles plasmáticos de NT-proBNP, MR-proANP y MR-proADM se encontraban disponibles en 174, 174 y 173 de los 177 pacientes, respectivamente.

Tabla 4: asociación de las variables de valores iniciales con la progresión de la enfermedad renal durante el periodo de observación utilizando modelos de regresión múltiple de riesgos proporcionales de Cox

Variable (incremento)	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3	
	Ajustado para edad y sexo		Ajustado para edad, sexo, TFG y proteinuria		Ajustado para edad, sexo, TFG, proteinuria y NT-proBNP	
	PR (IC al 95%)	p	PR (IC al 95%)	p	PR (IC al 95%)	p
TFG (por cada incremento de 1 DS)*	0,21 (0,13-0,34)	<0,001	-		-	
Proteinuria (por cada incremento de 1 DS) [†]	1,27 (1,02-1,58)	0,032	-		-	
NT-proBNP (por cada incremento de 1 DS) [‡]	1,45 (1,24-1,69)	<0,001	1,15 (0,96-1,38) [#]	0,127	-	
MR-proANP (por cada incremento de 1 DS) [§]	2,88 (2,25-3,68)	<0,001	2,11 (1,59-2,80) [#]	<0,001	2,90 (1,94-4,34) ^{##}	<0,001
MR-proADM (por cada incremento de 1 DS) [¶]	3,41 (2,61-4,45)	<0,001	2,60 (1,85-3,64) [#]	<0,001	2,62 (1,84-3,74) ^{##}	<0,001

Abreviaturas: TFG, tasa de filtración glomerular; MR-proADM, pro-adrenomedulina de región intermedia; MR-proANP, péptido natriurético de tipo proA de región intermedia; NT-proBNP, péptido natriurético de tipo proB aminoterminal.

*Para la TFG: un incremento de 1 DS eran 39 ml/min./1,73 m², [†]para la proteinuria era de 0,92 g/24 h/1,73 m², [‡]para la NT-proBNP era de 527 ng/l, [§]para la MR-proANP era de 131 pmoles/l y [¶]para MR-proADM era de 0,42 nmoles/l, respectivamente.

*MR-proANP, MR-proADM y NT-proBNP no fueron incluidos simultáneamente sino que se ajustaron para las mismas variables: edad, sexo, TFG y proteinuria.

^{##}MR-proANP y MR-proADM no fueron incluidos simultáneamente sino que se ajustaron para las mismas variables: edad, sexo, TFG, proteinuria y NT-proBNP.

Descripción de los dibujos

Figura 1: secuencia de aminoácidos del péptido precursor de la adrenomedulina (ADM) (pre-pro-ADM). Los aminoácidos 1 a 21 forman un péptido de señal. Los aminoácidos 22 a 41 forman el péptido N-20 terminal de pro-ADM (proADM N20). Los aminoácidos 45 a 92 forman el péptido MR-proADM. La ADM madura comprende los aminoácidos 95 a 146. Los aminoácidos 148 a 185 forman el fragmento C-terminal de proADM.

Figura 2: secuencia de aminoácidos del péptido pro-adrenomedulina (proADM).

Figura 3: secuencia de aminoácidos del péptido N-terminal 20 de la pro-adrenomedulina (proADM N20; PAMP). El péptido PAMP puede presentar un extremo C-terminal amidado.

Figura 4: secuencia de aminoácidos de la MR pro-adrenomedulina (MR-proADM).

Figura 5: secuencia de aminoácidos del péptido adrenomedulina maduro (ADM). El péptido ADM puede presentar un extremo C-terminal amidado y/o puede estar glucosilado.

Figura 6: secuencia de aminoácidos del precursor del péptido natriurético auricular (ANP) (pre-pro-ANP). Los aminoácidos 1 a 25 forman un péptido de señal.

Figura 7: secuencia de aminoácidos de proANP.

Figura 8: secuencia de aminoácidos de la ANP madura.

Figura 9: secuencia de aminoácidos de NT-proANP.

Figura 10: secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 53 a 90 de proANP.

Figura 11: gráficos de Kaplan-Meier que muestran la progresión de la enfermedad renal en pacientes con ERC que se estratificaron en dos grupos según las medianas de MR-proANP (10^6 pmoles/l) en valores iniciales.

Figura 12: gráficos de Kaplan-Meier que muestran la progresión de la enfermedad renal en pacientes con ERC que se estratificaron en dos grupos según las medianas de MR-proADM (0,75 nmoles/l) en valores iniciales.

Figura 13: curva de Kaplan-Meier con un valor de corte óptimo para MR-proADM. Sensibilidad=0,766, especificidad=0,809, rangos logarítmicos: $p < 0,001$.

Figura 14: curva de Kaplan-Meier con valor de corte óptimo para MR-proANP. Sensibilidad=0,891, especificidad=0,582, rangos logarítmicos: $p < 0,001$.

Listado de secuencias

<110> B.R.A.H.M.S. AG

<120> Biomarcadores de pronóstico para la progresión de la enfermedad renal crónica primaria

<130> B60404PCT

<150> EP 08167312.1

<151> 22-10-2008

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 185

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 618 077 T3

<400> 1

```

Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe
 1      5      10     15
Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys
 20     25     30
Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met
 35     40     45
Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala
 50     55     60
Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro
 65     70     75     80
Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg
 85     90     95
Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe
100    105    110
Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr
115    120    125
Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln
130    135    140
Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly
145    150    155    160
Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro
165    170    175
Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu
180    185

```

<210> 2

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys Trp
1 5 10 15

Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met Ser Ser Ser Tyr Pro
20 25 30

Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile Arg
35 40 45

Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro Glu Asp Ser Ser Pro
50 55 60

Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn
65 70 75 80

Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val
85 90 95

Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp
100 105 110

Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr Gly Arg Arg
115 120 125

Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly Arg Thr Leu Val Ser
130 135 140

Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro Pro Ser Gly Ser Ala
145 150 155 160

Pro His Phe Leu

<210> 3

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys Trp
1 5 10 15

Ala Leu Ser Arg
20

10

<210> 4

<211> 40

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Leu Arg Met Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala
20 25 30

Ser Arg Ser Pro Glu Asp Ser Ser
35 40

<210> 5

<211> 52

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
1 5 10 15

Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
20 25 30

Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
35 40 45

Pro Gln Gly Tyr
50

10

<210> 6

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 6

Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser Phe Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val
20 25 30

Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu
35 40 45

Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser
50 55 60

Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val
65 70 75 80

Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala

ES 2 618 077 T3

	85	90	95
	Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys	100	105 110
	Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser	115	120 125
	Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu	130	135 140
	Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr Arg Arg	145	150
5	<210> 7 <211> 126 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 7 Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys 1 5 10 15 Asn Leu Leu Asp His Leu Glu Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val 20 25 30 Val Pro Pro Gln Val Leu Ser Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala 35 40 45 Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro 50 55 60 Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser 65 70 75 80 Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala 85 90 95 Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg 100 105 110 Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr 115 120 125		
10	<210> 8 <211> 28 <212> PRT <213> Homo sapiens		
15	<400> 8 Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly 1 5 10 15 Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr 20 25		
20	<210> 9 <211> 98 <212> PRT <213> Homo sapiens		

<400> 9

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

Pro Arg

5 <210> 10
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 10

Pro	Glu	Val	Pro	Pro	Trp	Thr	Gly	Glu	Val	Ser	Pro	Ala	Gln	Arg	Asp
1				5					10					15	
Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Trp	Asp	Ser	Ser	Asp	Arg	Ser	Ala
			20					25				30			
Leu	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu										
		35													

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria o para el seguimiento de la terapia de la enfermedad renal crónica en un paciente que padece la enfermedad renal crónica primaria y en el que dicho paciente no está en la fase terminal de una enfermedad renal, que comprende las etapas siguientes:
 - a. proporcionar una muestra de un paciente que padece la enfermedad renal crónica primaria,
 - b. determinar el nivel de MR-proADM,
 - c. comparar el nivel de MR-proADM con un valor predeterminado y correlacionar el nivel de MR-proADM con la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria, en el que un nivel de MR-proADM aumentado en los valores iniciales es un predictor de progresión.
2. Método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que dicho paciente se clasifica como que progresa o que no progresa.
3. Método *in vitro* según la reivindicación 1 o 2, en el que el nivel de MR-proADM es determinado y utilizado como marcador único.
4. Método *in vitro* según la reivindicación 1 o 2, en el que la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria es mejorada determinando y utilizando adicionalmente el nivel de por lo menos un parámetro de laboratorio o marcador adicional seleccionado de entre el grupo que comprende: creatinina, TFG, proteinuria, albúmina, CRP, cistatina C, GDF15, ST2, NGAL, procalcitonina y sus fragmentos, BNP o fragmentos del mismo o sus precursores o fragmentos de los mismos, pro-vasopresina y los fragmentos de la misma incluyendo la coceptina, la vasopresina y la neurofisiina II, pro-endotelina-1 y los fragmentos de la misma incluyendo CT-proET-1, NT-proET-1, endotelina-1 grande y endotelina-1 y ANP o fragmentos del mismo o sus precursores o fragmentos de los mismos.
5. Método *in vitro* según las reivindicaciones 1 a 4, en el que adicionalmente se determina por lo menos un parámetro clínico seleccionado de entre el grupo que comprende: edad, sexo, tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica, tratamiento antihipertensor, índice de masa corporal y hábitos tabáquicos actuales.
6. Método *in vitro* para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria y para el seguimiento de la terapia de la enfermedad renal crónica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de MR-proADM solo o conjuntamente con otros parámetros de laboratorio o clínicos útiles de manera predictora se utiliza para la predicción de la progresión de la enfermedad renal crónica primaria mediante un método que puede seleccionarse de entre las alternativas siguientes:
 - comparación con la mediana del nivel de MR-proADM en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de pacientes con enfermedad renal crónica primaria,
 - comparación con un cuantil del nivel de ANP y/o ADM o fragmentos de los mismos o sus precursores o fragmentos de los mismos en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de pacientes con enfermedad renal crónica primaria,
 - calcular sobre la base del análisis de riesgos proporcionales de Cox o utilizando unos cálculos de índices de riesgo, tales como el IRN (índice de reclasificación neta) o el IDI (índice de discriminación integrada).
7. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de MR-proADM es medido utilizando un ensayo diagnóstico que comprende una o más sondas de captura dirigidas contra uno o más epítomos ubicados en las posiciones de aminoácido 45-92 de pre-proADM.

Fig. 1

SEC ID n° 1 (secuencia de aminoácidos de pre-pro-ADM) :

```

1      MKLVSVAlMY LGSLAFLGAD TARLDVASEF RKKWNKWALS RGKRELRMSS
51     SYPTGLADV K AGPAQTLIRP QDMKGASRSP EDSSPDAARI RVKRYRQSMN
101    NFQGLRSFGC RFGTCTVQKL AHQIYQFTDK DKDNVAPRSK ISPQGYGRRR
151    RRSLEAGPG  RTLVS SKPQA HGAPAPPSGS APHFL

```

Fig. 2

SEC ID n° 2 (secuencia de aminoácidos de pro-ADM) :

```

1      ARLDVASEFR KKWNKWALSR GKRELRMSSS YPTGLADVKA GPAQTLIRPQ
51     DMKGASRSPE DSSPDAARIR VKRYRQSMNN FQGLRSFGCR FGTCTVQKLA
101    HQIYQFTDKD KDNVAPRSKI SPQGYGRRRR RSLPEAGPGR TLVSSKPQAH
151    GAPAPPSGSA PHFL

```

Fig. 3

SEC ID n° 3 (secuencia de aminoácidos de pro-ADM N20) :

```

1      ARLDVASEFR KKWNKWALSR

```

Fig. 4

SEC ID n° 4 (secuencia de aminoácidos de MR-pro-ADM) :

```

1      ELRMSSSYPT GLADV KAGPA QTLIRPQDMK GASRSPEDSS PDAARIRV

```

Fig. 5

SEC ID n° 5 (secuencia de aminoácidos de ADM) :

```

1      YRQSMNNFQG LRSFGCRFGT CTVQKLAHQI YQFTDKDKDN VAPRSKISPQ
51     GY

```


Fig. 6

SEC ID n° 6 (secuencia de aminoácidos de pre-pro-PNA) :

```

1      MSSFSTTTVS FLLLLAFQLL GQTRANPMYN AVSNADLMDF KNLLDHLEEK
51     MPLEDEVVPP QVLSEPNEEA GAALSPLPEV PPWTGEVSPA QRDGGALGRG
101    PWDSSDRSAL LKSKLRALLT APRSLRRSSC FGGRMDRIGA QSGLG CNSFR
151    YRR

```

Fig. 7

SEC ID n° 7 (secuencia de aminoácidos de pro-PNA) :

```

1      NPMYNAVSNA DLMDFKNLLD HLEEKMPLED EVVPPQVLSE PNEEAGAALS
51     PLPEVPPWTG EVSPAQRDGG ALGRGPWDSS DRSALLKSKL RALLTAPRSL
101    RRSSCFGGRM DRIGAQSGLG CNSFRY

```

Fig. 8

SEC ID n° 8 (secuencia de aminoácidos de PNA) :

```

1      SLRRSSCFGG RMDRIGAQSG LG CNSFRY

```

Fig. 9

SEC ID n° 9 (secuencia de aminoácidos de NT-propNA) :

```

1      NPMYNAVSNA DLMDFKNLLD HLEEKMPLED EVVPPQVLSE PNEEAGAALS
51     PLPEVPPWTG EVSPAQRDGG ALGRGPWDSS DRSALLKSKL RALLTAPR

```

Fig. 10

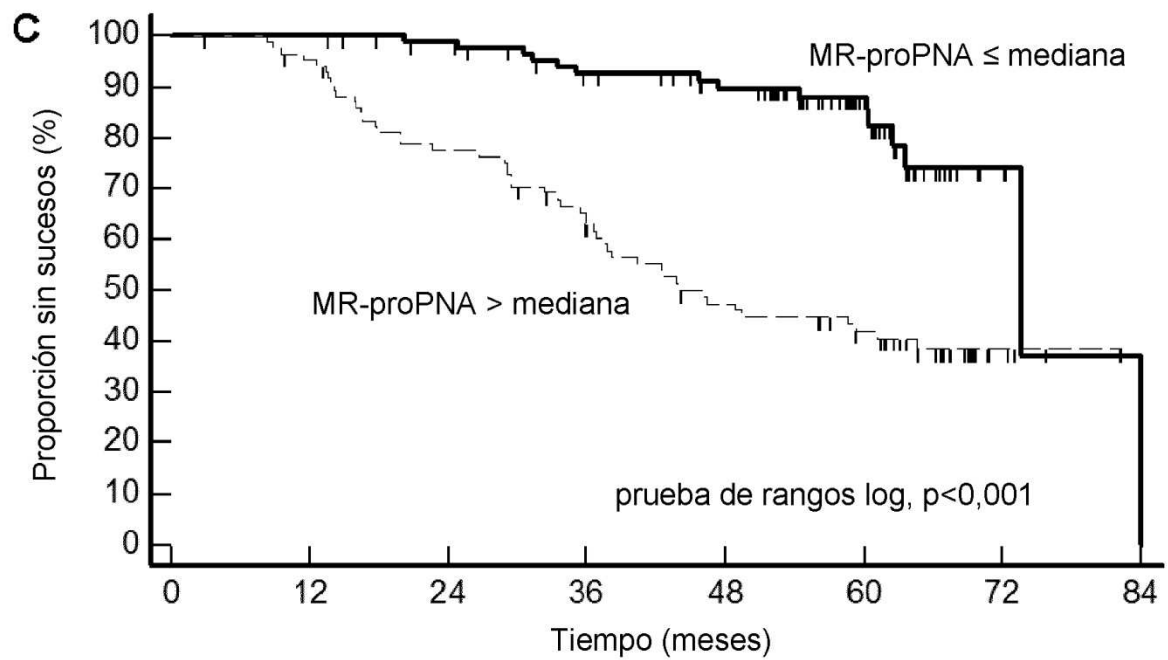
SEC ID n° 10 (secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 53 a 90 de propNA) :

```

1      PEVPPWTGEV SPAQRDGGAL GRGPWDSSDR SALLKSKL

```

Fig. 11



Número en riesgo

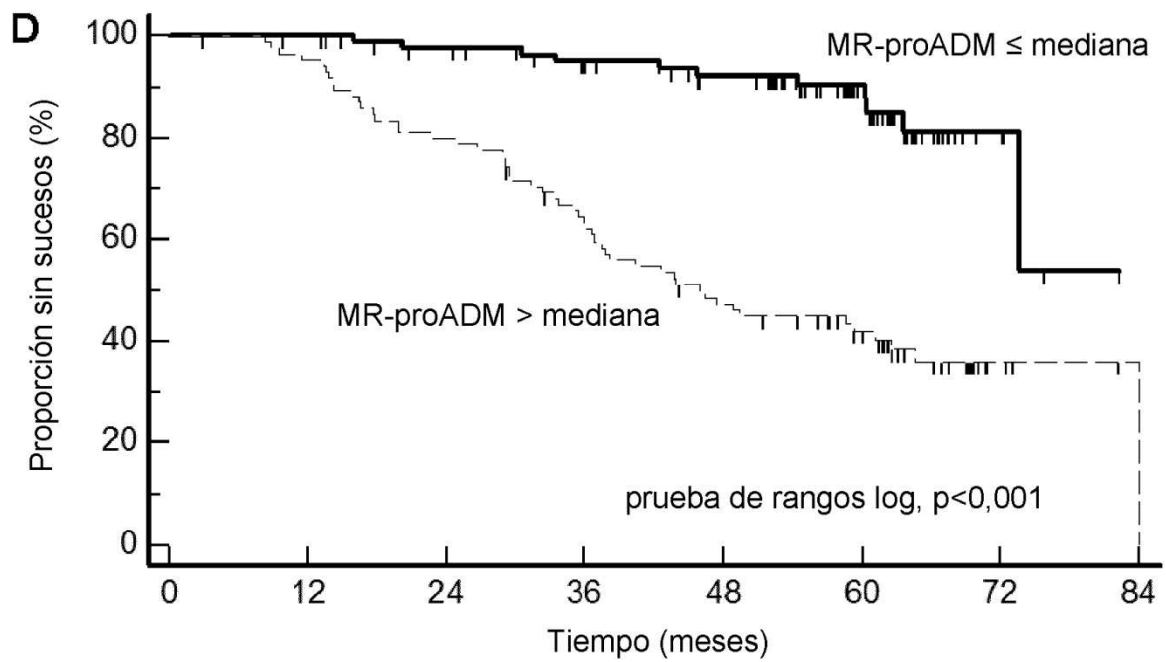
Grupo 1. MR-proPNA $\leq 10^6$ pmoles/l (línea continua)

87	87	82	71	63	32	4	1
----	----	----	----	----	----	---	---

Grupo 2. MR-proPNA $> 10^6$ pmoles/l (línea discontinua)

87	81	65	50	36	28	5	0
----	----	----	----	----	----	---	---

Fig. 12



Número en riesgo

Grupo 1: MR-proADM $\leq 0,75$ nmoles/l (línea continua)

87	86	79	70	61	34	5	0
----	----	----	----	----	----	---	---

Grupo 2: MR-proADM $> 0,75$ nmoles/l (línea discontinua)

86	81	68	51	38	26	4	1
----	----	----	----	----	----	---	---

Fig. 13

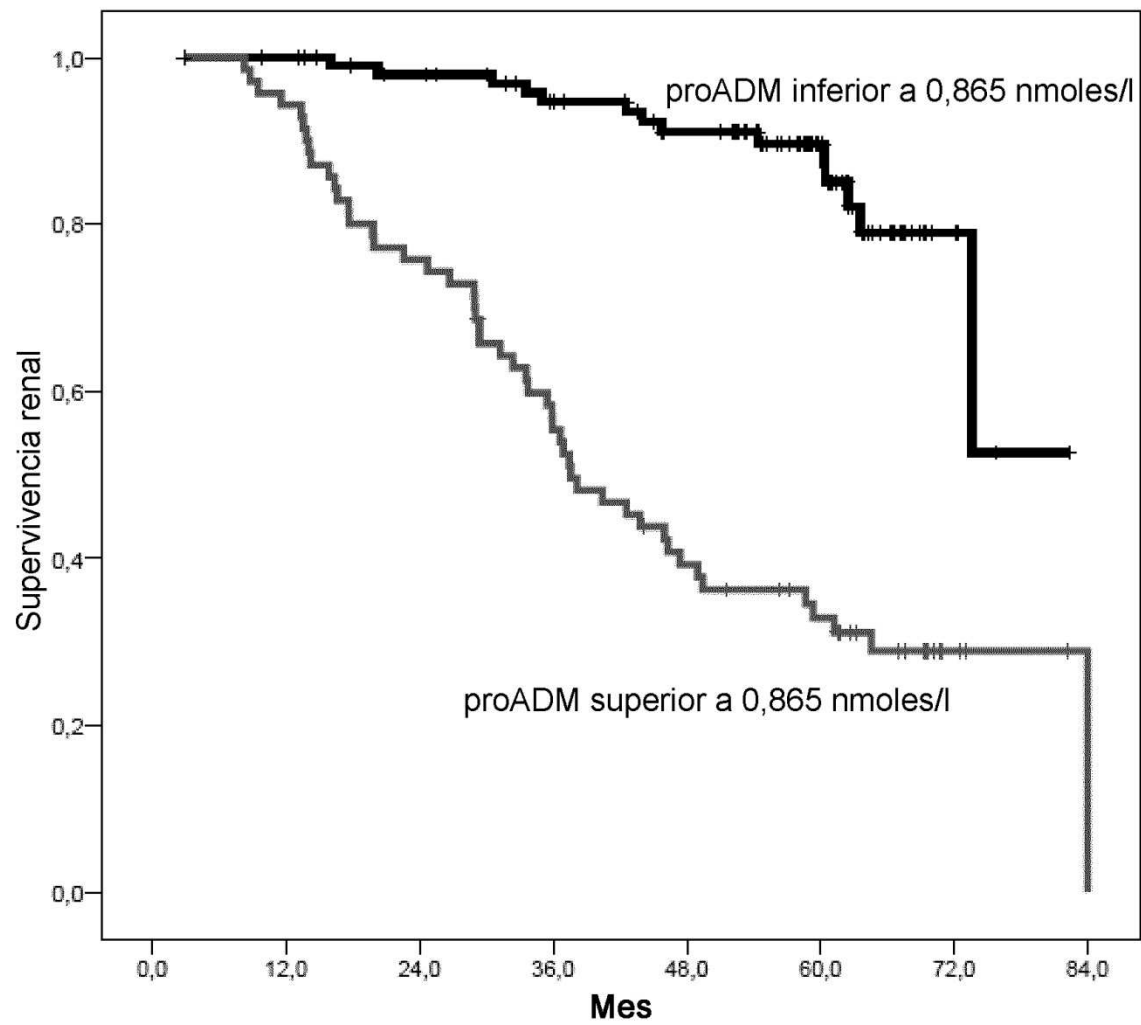


Fig. 14

