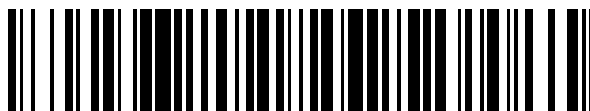


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 134**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2010** **PCT/EP2010/068391**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011** **WO11064358**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2010** **E 10784311 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2504705**

54 Título: **Procedimiento para diagnosticar y monitorizar la isquemia cardíaca en pacientes con dolor torácico agudo y sin infarto de miocardio**

30 Prioridad:

27.11.2009 EP 09177395

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

73 Titular/es:

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE y
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

72 Inventor/es:

HESS, GEORG;
HORSCH, ANDREA y
ZDUNEK, DIETMAR

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 628 134 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

Procedimiento para diagnosticar y monitorizar la isquemia cardíaca en pacientes con dolor torácico agudo y sin infarto de miocardio

5

La presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar el estado isquémico y un procedimiento para monitorizar la evolución de la gravedad del estado isquémico de un sujeto que muestra signos y síntomas de dolor torácico agudo general o síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio (sin elevación de ST). Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar un sujeto susceptible de intervención cardíaca y un procedimiento de decisión sobre la intervención. Los procedimientos de la presente invención se basan en la determinación de la tirosina quinasa-1 similar a fms soluble (sFLT-1) y opcionalmente del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en una muestra de dicho sujeto y comparación de la cantidad de sFLT-1 y, opcionalmente, HGF con al menos una cantidad de referencia.

10

15

Un objetivo de la medicina moderna es proporcionar regímenes de tratamiento personalizados o individualizados. Se trata de regímenes de tratamiento que tienen en cuenta las necesidades o riesgos individuales del paciente. Un riesgo particularmente importante es la presencia de complicaciones cardiovasculares, especialmente en episodios cardiovasculares agudos. Las complicaciones cardiovasculares son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo occidental. Para el tratamiento individual de la persona que sufre una complicación cardiovascular, un diagnóstico fiable tiene un impacto significativo en el éxito del tratamiento de dicha persona. Esto es particularmente importante en el caso de pacientes que muestran signos y síntomas de síndrome coronario agudo (SCA).

20

25

Se cree que los síntomas clínicos del síndrome coronario agudo están provocados por isquemia miocárdica aguda. Los pacientes con dolor torácico o signos y síntomas de angina inestable o síndrome coronario agudo (SCA) frecuentemente acuden a su médico como una emergencia o acuden a los servicios de urgencias. La evaluación clínica de estos pacientes incluye una historia clínica dirigida específicamente a evidencias de enfermedad cardiovascular existente o sus factores de riesgo, análisis del tipo de síntomas descritos, así como signos clínicos asociados a síndrome coronario agudo tales como evidencia de edema pulmonar, hipotensión y/o taqui o bradicardia (Circulation 106: 1893, 2002 / Grupo de trabajo sobre directrices prácticas de la American Heart Association). Además, se realizan ensayos de laboratorio y ECG.

30

35

El dolor torácico agudo es el síntoma principal de SCA. Sin embargo, el dolor torácico no es específico de la enfermedad cardiovascular o SCA. Los síntomas de dolor torácico pueden provenir de trastornos vasculares tales como embolia pulmonar, disección aórtica o hipertensión pulmonar o de enfermedades pulmonares tales como pleuritis, neumonía, traqueobronquitis y neumotórax espontáneo. Los síntomas de dolor torácico agudo también pueden provenir de una enfermedad gastrointestinal tal como reflujo esofágico, úlcera péptica, enfermedad de la vesícula biliar y pancreatitis, causas musculoesqueléticas de dolor agudo incluyen costocondritis, enfermedad de disco cervical, traumatismo o distensión. El herpes zoster también causa dolor torácico agudo. Además, es necesario considerar el trastorno de pánico como diagnóstico diferencial.

40

45

El dolor torácico agudo clínicamente cardíaco se puede identificar por características clínicas tales como presión torácica retroesternal o quemazón o pesadez que se propaga ocasionalmente al cuello, mandíbula, epigastrio, hombros o brazo izquierdo. La gravedad del dolor torácico agudo aumenta con frecuencia de angina a angina inestable e infarto de miocardio. Las causas desencadenantes incluyen estrés físico y emocional o el frío. La gravedad también se asocia a la duración del dolor torácico que varía desde menos de 2 minutos en la angina a más de 30 minutos en el infarto de miocardio. Aunque estos síntomas son bastante característicos en casos graves, los casos leves de dolor torácico cardíaco pueden ser difíciles de separar de las causas no cardíacas. (Braunwald Heart Disease, capítulo 49, página 1196).

50

Los pacientes con signos de síndrome coronario agudo tienen un riesgo significativamente mayor de sufrir una lesión cardíaca no reversible o incluso muerte cardíaca y, por lo tanto, es preciso identificarlos entre los pacientes con síntomas torácicos no traumáticos (Morrow *et al.*, National academy of clinical biochemistry guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndrome, 2007, Circulation 115; 356-375).

55

Un síndrome coronario agudo está provocado por un bloqueo repentino en una arteria coronaria, que reduce significativamente o interrumpe el suministro de sangre a las áreas conectadas del miocardio (músculo cardíaco) y tiene como resultado isquemia (falta de suministro de sangre).

60

El tejido del corazón se vuelve necrótico en caso de isquemia significativa y/o persistente. El infarto de miocardio (IM), también denominado ataque cardíaco, se conoce como necrosis celular en el miocardio (tejido cardíaco) por isquemia, según lo descrito por el Grupo de Trabajo Conjunto ESC/ACCF/AHA/WHF para la Redefinición del Infarto de Miocardio (The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee: Universal definition of myocardial infarction, European Heart Journal (2007), 28, 2525 - 2538).

65

Un trombo es la causa más común de bloqueo de arteria coronaria que, en general, ya se encuentra parcialmente estrechada por ateromas. Un ateroma se puede romper o desgarrar, liberando sustancias que hacen las plaquetas

más adherentes y favoreciendo la formación de trombos. En muchos casos, el trombo se disuelve por sí solo, típicamente en aproximadamente un día. Sin embargo, en ese momento, ya se pueden haber producido algunos daños en el corazón.

La evaluación de la historia clínica (antecedentes de enfermedad de las arterias coronarias (EAC)) es un criterio para el diagnóstico de pacientes que presentan síntomas de SCA (p. ej., dolor torácico durante más de 20 min). Estos pacientes también son diagnosticados mediante electrocardiograma (ECG) y ensayos de troponina. En los casos de un ECG inicialmente no diagnóstico en el momento de la presentación y de un resultado de ensayo de troponina que no cumple los criterios diagnósticos de infarto de miocardio sin elevación de ST, este procedimiento se repite después de 4 – 8 horas. En caso de que el ECG y la determinación de troponina sigan sin cumplir los criterios diagnósticos de infarto de miocardio, el paciente es dado de alta con el diagnóstico de exclusión de infarto de miocardio.

El electrocardiograma (ECG) proporciona información importante para el diagnóstico. Particularmente, si el ECG muestra segmentos ST elevados, se diagnostica un infarto de miocardio con elevación de ST (IMEST). Si el ECG no muestra segmentos ST elevados, se diagnostica un IM sin elevación de ST (IMSEST) cuando se detecta troponina cardíaca en una muestra del paciente correspondiente. Se sospecha que los pacientes sin ECG de diagnóstico y con un nivel de troponina cardíaca inferior a la cantidad que es indicativa de infarto de miocardio presentan angina de pecho inestable (API). La angina inestable y el IMSEST se consideran afecciones estrechamente relacionadas, que comparten una presentación clínica similar. No obstante, difieren en su gravedad. El IMSEST se distingue de la angina inestable por la isquemia que causa daño miocárdico irreversible que es detectable por medio de biomarcadores de necrosis miocárdica (Morrow *et al.*, loc. cit.). En todos los casos descritos, es decir, IMEST, IMSEST y API, el paciente se trata de acuerdo con el diagnóstico.

En caso de que el ECG (electrocardiograma) muestre elevación de ST, se diagnostica un infarto de miocardio con elevación de ST y se considera al paciente para una evaluación de la terapia de perfusión. Si el ECG sigue siendo no-diagnóstico, lo que incluye cambios en la onda ST o T en el ECG, un resultado de troponina T o I que sea diagnóstico de infarto de miocardio sin elevación de ST revela el diagnóstico final. La mayoría de los pacientes con dolor torácico o signos y síntomas de síndrome coronario agudo presentan un ECG no diagnóstico y un resultado de troponina que no cumplen los criterios de IMSEST de acuerdo con las recomendaciones actuales (The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee: Universal definition of myocardial infarction, *European Heart Journal* (2007), 28, 2525 - 2538). Estos pacientes pueden tener infarto de miocardio, pero frecuentemente se presentan dentro de las primeras 4 - 6 horas tras la aparición de los signos/síntomas, es decir, antes de que el marcador de necrosis cardíaca específico comience a liberarse del miocardio y circule en cantidades mayores en el suero o plasma. Otro grupo de pacientes puede tener dolor torácico completamente no relacionado con un trastorno cardíaco y, por lo tanto, no desarrollará cambios característicos en el ECG ni necrosis cardíaca, como lo indican las cantidades mayores de troponina. Estos pacientes serán finalmente diagnosticados de dolor torácico no cardíaco. Un subgrupo de pacientes sometidos a ensayos con mioglobina (mioglobulina) y/o proteína cardíaca de unión a ácidos grasos (H-FABP) presentará evidencias de un infarto de miocardio diagnosticado posteriormente por aumento de troponina posiblemente asociado a cambios en el ECG.

Tal como se ha indicado, los esfuerzos actuales en pacientes con dolor torácico o que presentan síntomas se dirigen a la identificación de infarto de miocardio o a su exclusión. Hasta el momento, el electrocardiograma y las troponinas han sido los puntos clave del diagnóstico positivo de infarto de miocardio o de su exclusión.

La troponina es una proteína estructural del miocardio y se libera durante la necrosis o apoptosis del tejido miocárdico. Además, las troponinas se consideran específicas del tejido miocárdico y, por lo tanto, un aumento de los niveles de troponina en la circulación se considera un indicador de infarto de miocardio. Desafortunadamente, los niveles de troponina aumentan sólo 4 a 6 horas después de que se haya producido un infarto de miocardio y, por lo tanto, dan lugar a un retardo diagnóstico. Este retardo en el reconocimiento del infarto de miocardio puede provocar un retardo en el tratamiento, por ejemplo, por ICP y, en consecuencia, el miocardio se puede volver necrótico, algo que se podría haber evitado mediante una intervención más temprana.

Los intentos de superar este retardo en el reconocimiento del infarto de miocardio han incluido el uso de mioglobina o proteína cardíaca de unión a ácidos grasos. La proteína cardíaca de unión a ácidos grasos (H-FABP) es una proteína citoplasmática de bajo peso molecular con abundante presencia en el miocardio. Se ha reconocido que el miocardio ya ha liberado la H-FABP cuando pierde su función, algo que sucede mucho antes de que se vuelva necrótico. Se ha demostrado claramente que niveles de H-FABP superiores a 5700 pg/ml son indicativos de un aumento futuro del nivel de troponina y de infarto de miocardio y se ha encontrado que un nivel de H-FABP por debajo de 2500 pg/ml no estaba asociado a IM, véase el documento WO 2008/145689.

De forma similar, la mioglobina representa otra molécula que entra en la circulación poco después de un infarto de miocardio. Se ha demostrado que una concentración de mioglobina superior a 77 ng/ml es indicativa de un aumento futuro del nivel de troponina y, por tanto, de infarto de miocardio. Por el contrario, una concentración de mioglobina por debajo de 55 ng/ml hace improbable el desarrollo de un futuro aumento del nivel de troponina y, por tanto, del infarto, véase el documento WO 2009/033831.

En consecuencia, la determinación del nivel de mioglobina y/o H-FABP en suero o plasma es útil para compensar parte de las limitaciones de la determinación de troponina, es decir, la aparición tardía de las troponinas en la circulación (después de 4 - 6 horas), y representa una ayuda para un diagnóstico precoz de IM y, por lo tanto, permite la intervención si la mioglobina o la proteína cardíaca de unión a ácidos grasos predicen el desarrollo de troponina.

Además, el documento US 2007/218498 divulga procedimientos para evaluar pacientes que sufren de síndrome coronario agudo basándose en la determinación del nivel de FLT-1 soluble solo o en combinación con uno o más marcadores tales como mioglobina, troponina I/T, H-FABP y ANP. También se mencionan procedimientos para diagnosticar una afección cardiovascular o para asignar un riesgo pronóstico de uno o más resultados clínicos futuros.

El documento US 2009/155827 enseña procedimientos para diagnosticar diferentes enfermedades tales como enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad cerebrovascular y el síndrome coronario agudo incluyendo infarto de miocardio, basándose en la determinación de FLT-1 soluble y PIGF. Los procedimientos engloban también la determinación de marcadores adicionales tales como mioglobina, péptidos natriuréticos (por ejemplo, ANP), H-FABP y troponina.

El documento WO 2008/074781 enseña un procedimiento para diagnosticar el estado angiogénico de un sujeto que sufre enfermedad cardíaca coronaria basándose en la determinación de las cantidades de PIGF, endoglobina y FLT-1 soluble. El propósito de dicho procedimiento es, por ejemplo, seleccionar una terapia adecuada y decidir si se pueden evitar intervenciones cardíacas complicadas tales como la implantación de endoprótesis vasculares y la cirugía de derivación.

Los pacientes que presentan dolor torácico o síntomas de síndrome coronario agudo son regularmente dados de alta si los síntomas remiten y si no cumplen con los criterios de IM. Dichos pacientes pueden, sin embargo, presentar todavía mayor riesgo de infarto de miocardio, tal como se demostró recientemente mediante registros continuos de ECG (Tvivoni *et al.* J. Am Coll Cardiol 53, 2009, 1422 - 24, Scirica Am Coll Cardiol 53, 2009, 1411 - 1421). En este estudio, una depresión de ST de tan solo 1 minuto y tan solo 1/2 mm indicó isquemia temporal y un resultado pobre. Este procedimiento, sin embargo, no es fácilmente aplicable y requiere tecnología asistida por ordenador y sólo se puede hacer de forma prospectiva. Esto subraya la importancia del reconocimiento de la isquemia, un episodio que precede a la necrosis y a las anomalías miocárdicas metabólicas.

Resumiendo lo anterior, existe una necesidad urgente de un procedimiento para identificar la isquemia en pacientes con dolor torácico o signos o síntomas de síndrome coronario agudo, para determinar el grado de isquemia, su duración, así como anomalías funcionales asociadas a la isquemia. Estos procedimientos también deben permitir la exclusión de la isquemia y la clasificación posterior de los pacientes que presentan dolor torácico o síntomas de síndrome coronario agudo, con el fin de proporcionar un mejor diagnóstico y un mejor tratamiento terapéutico.

Por lo tanto, existe una clara necesidad de medios y procedimientos diagnósticos y pronósticos que permitan un diagnóstico fiable y rápido de la isquemia en un sujeto que muestra signos y síntomas de un síndrome coronario agudo y que tiene una cantidad de una troponina cardíaca inferior al nivel indicativo de un infarto de miocardio. Preferentemente, el individuo también tendrá un ECG no-diagnóstico, preferentemente un ECG que no muestra elevación de ST. Los medios y procedimientos deben permitir un diagnóstico no sólo de la isquemia, sino también permitir una valoración del grado de isquemia y sus cambios, y ayudar en la discriminación de las causas cardíacas y no cardíacas del dolor torácico. Además, el procedimiento debe ayudar a identificar un subgrupo de pacientes con dolor torácico cardíaco que muestren niveles de otros biomarcadores cardíacos como troponina, pero también, en su caso, mioglobina o H-FABP por debajo de la cantidad de referencia diagnóstica característica de la isquemia. Además, será posible una cuantificación de la isquemia en el caso de períodos de isquemia duradera o continua y en el caso de episodios isquémicos recurrentes. El procedimiento y los medios deben permitir además identificar un sujeto que sea susceptible de intervención cardíaca, para decidir si una intervención cardíaca es apropiada para el sujeto y, en caso afirmativo, qué terapia hay que escoger. El procedimiento y los medios deben evitar al menos algunos de los inconvenientes de las técnicas actuales, tal como se han expuesto con anterioridad.

Por lo tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención debe interpretarse como la provisión de medios y procedimientos para satisfacer las necesidades anteriormente mencionadas.

El problema técnico se resuelve mediante los modos de realización caracterizados en las reivindicaciones y en el presente documento.

La presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar un estado isquémico de un sujeto que muestra signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio, por tener una cantidad de troponina T determinada en una muestra del sujeto menor de 0,1 ng/ml, que comprende

(a) determinar la cantidad de tirosina quinasa-1 similar a fms soluble (sFLT-1) o una variante de la misma en una muestra de dicho sujeto,

(b) comparar la cantidad de sFLT-1 o una variante de la misma determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y

(c) diagnosticar el estado isquémico basándose en la información obtenida en la etapa b) y preferentemente basándose en la información obtenida en a) y b), en el que una cantidad de sFLT-1 por debajo de la cantidad de referencia es indicativa de un estado no isquémico no asociado a o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible, y una cantidad de sFLT-1 igual o mayor que la cantidad de referencia es indicativa de un estado isquémico asociado a o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible.

La presente invención también proporciona un procedimiento para monitorizar el estado isquémico de un sujeto que muestra signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio, por tener una cantidad de troponina T determinada en una muestra del sujeto menor de 0,1 ng/ml, que comprende las etapas de

(a) determinar las cantidades de tirosina quinasa-1 similar a fms soluble (sFLT-1) o una variante de la misma en una muestra de dicho sujeto en al menos en dos momentos temporales diferentes, y

(b) comparar las cantidades de sFLT-1 o una variante de la misma determinada de la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y

(c) diagnosticar el estado isquémico en al menos en dos momentos temporales diferentes, basándose en la información obtenida en la etapa b) y preferentemente basándose en la información obtenida en a) y b) para monitorizar el estado isquémico, en el que una cantidad de sFLT-1 por debajo de la cantidad de referencia es indicativa de un estado no isquémico no asociado a o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible, y una cantidad de sFLT-1 igual o mayor que la cantidad de referencia es indicativa de un estado isquémico asociado a o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible.

En un modo de realización de los procedimientos anteriormente mencionados de la presente invención, se determina además la cantidad de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o una variante del mismo en una etapa aa) adicional en una muestra de dicho sujeto y se compara con al menos una cantidad de referencia para HGF en la etapa bb). Por consiguiente, en la etapa c), el estado isquémico se diagnostica basándose en las cantidades determinadas de sFLT-1 o una variante de la misma y de HGF o una variante del mismo y en la comparación de la cantidad de sFLT-1 con al menos una cantidad de referencia para sFLT-1 y la comparación de la cantidad de HGF con al menos una cantidad de referencia para HGF. Preferentemente, primero se determina la cantidad de sFLT-1 y después la cantidad de HGF, sin embargo, también se contempla que las cantidades de sFLT-1 y HGF se determinen en cualquier orden, es decir, simultáneamente, o primero sFLT-1 y luego HGF, o primero HGF y luego sFLT-1.

El estado isquémico del individuo se determina después de la determinación de troponina, determinando las cantidades de sFLT-1 y/o HGF u, opcionalmente, del marcador adicional. Por consiguiente, la cantidad de troponina cardíaca se determina antes de la determinación de sFLT-1 y/o HGF; y la cantidad de sFLT-1 y/o HGF sólo se determinará en el caso de que la cantidad de troponina sea inferior a la cantidad que se reconoce generalmente en la técnica como indicativa de un infarto de miocardio (IM), en particular de un IMSEST. La cantidad de troponina cardíaca puede incluso ser cero, es decir, no detectable con los ensayos actualmente disponibles.

En otro modo de realización preferido, un ECG del sujeto respectivo se determina simultáneamente a la determinación de sFLT-1 y/o a la determinación de HGF; la medición de ECG también puede preceder a la determinación de sFLT-1 y/o a la determinación de HGF. El estado isquémico del individuo, por lo tanto, se determina preferentemente de forma simultánea o después de la medición de ECG, determinando las cantidades de sFLT-1 y, opcionalmente, de HGF. Por consiguiente, si la medición de ECG se lleva a cabo antes de la determinación de sFLT-1 y/o HGF, la determinación de las cantidades de sFLT-1 y/o HGF se puede aplazar hasta que se registre el ECG. Preferentemente, la cantidad de sFLT-1 y/o HGF sólo se determinará en el caso de que el ECG del sujeto no muestre una elevación de ST. Preferentemente, en el caso de que ECG muestre una elevación de ST, se considerará que el sujeto ha sufrido un IMEST, lo que significa que en general los procedimientos de la presente invención— dirigidos al diagnóstico de un estado isquémico anterior al IM — no se llevarán a cabo.

En el contexto de lo anterior, además, la determinación de las cantidades de una troponina cardíaca y/o la medición de ECG se pueden llevar a cabo simultánea o secuencialmente, incluyendo la determinación de sFLT-1 y/o HGF como se ha expuesto con anterioridad.

La evaluación de la historia clínica (antecedentes de enfermedad arterial coronaria (EAC)) es un criterio para el diagnóstico de pacientes que presentan síntomas de SCA (p. ej., dolor torácico durante más de 20 min). Estos pacientes se diagnostican además para saber si cumplen otros criterios, concretamente mediante el uso de electrocardiograma (ECG), por un lado, y de ensayos de troponina, por otro lado. En los casos de un ECG que no cumple los criterios diagnósticos de infarto de miocardio sin elevación de ST en el momento de la presentación y de un resultado en el ensayo de troponina que no cumple los criterios diagnósticos de infarto de miocardio, este procedimiento se repite después de 4 – 8 horas. En caso de que el ECG y la determinación de troponina sigan sin cumplir los criterios diagnósticos de infarto de miocardio, el paciente es dado de alta con el diagnóstico de exclusión de infarto de miocardio. Los últimos criterios para el diagnóstico del infarto de miocardio (IM) han sido descritos por el Grupo de Trabajo Conjunto ESC/ACCF/AHA/WHF para la Redefinición del Infarto de Miocardio (The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee: Universal definition of myocardial infarction, loc. cit.).

El procedimiento de la presente invención es un procedimiento *in vitro*. Además, puede comprender etapas adicionales de las mencionadas explícitamente con anterioridad. Por ejemplo, otras etapas pueden estar relacionadas con pretratamientos de muestras o evaluación de los resultados obtenidos por el procedimiento. El procedimiento de la presente invención se puede usar también para monitorización, confirmación y subclasificación de un diagnóstico. El procedimiento se puede llevar a cabo manualmente o asistido por automatización. Preferentemente, la etapa (a), (b) y/o (c) pueden estar total o parcialmente asistidas por automatización, por ejemplo, mediante un equipo robótico y sensorial adecuado para la determinación en la etapa (a) o para una comparación implementada por ordenador en la etapa (b).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "signos y síntomas de síndrome coronario agudo" se refiere, por una parte, a aquellos signos que pueden indicar SCA, pero que también que pueden aparecer en enfermedades distintas de SCA. Por consiguiente, esta expresión incluye aquellos signos que no se pueden relacionar inequívocamente con la existencia de SCA, pero que indican una probabilidad de existencia de SCA tal que es obligatorio un examen adicional para confirmación (confirmar/descartar). Un ejemplo del citado signo es el dolor torácico. Por supuesto, el dolor torácico también puede provenir de trastornos vasculares tales como embolia pulmonar, disección aórtica o hipertensión pulmonar o enfermedades pulmonares tales como pleuritis, neumonía, traqueobronquitis y neumotórax espontáneo; enfermedades gastrointestinales tales como reflujo esofágico, úlcera péptica, enfermedad de la vesícula biliar y pancreatitis, causas musculoesqueléticas de dolor agudo incluyen costochondritis, enfermedad de disco cervical, traumatismo o distensión. El herpes zoster también causa dolor torácico agudo. Estas formas de dolor torácico se refieren a menudo como "dolor torácico no cardíaco". Por otra parte, la expresión se refiere a dolor torácico agudo de origen cardíaco que da lugar a síntomas como presión torácica retroesternal o quemazón o pesadez que se propaga ocasionalmente al cuello, mandíbula, epigastrio, hombros o brazo izquierdo. La gravedad del dolor torácico agudo aumenta con frecuencia desde la angina a la angina inestable e infarto de miocardio. Las causas desencadenantes incluyen estrés físico y emocional o el frío. La gravedad también se asocia a la duración del dolor torácico que varía desde menos de 2 minutos en la angina a más de 30 minutos en el infarto de miocardio. Aunque estos síntomas son bastante característicos de casos graves, los casos leves de dolor torácico cardíaco pueden ser difíciles de separar de las causas no cardíacas. Otros síntomas conocidos de SCA son molestias o dolor epigástrico, en el brazo, muñeca o mandíbula, náuseas o vómitos inexplicables, dificultad respiratoria persistente, debilidad, mareos, aturdimiento o síncope, así como cualquier combinación de los mismos.

Sin embargo, en muchos casos los síntomas citados anteriormente no parecen suficientemente específicos como para permitir un diagnóstico seguro y correcto (o para evitar un falso diagnóstico) de SCA. Por ejemplo, es posible que el dolor torácico no se pueda localizar de forma inequívoca. Otro grupo de pacientes puede tener dolor torácico no relacionado en absoluto con un trastorno cardíaco y, por lo tanto, no desarrollar cambios característicos en ECG ni necrosis cardíaca, como lo indican las cantidades mayores de troponina. Estos pacientes serán finalmente diagnosticados de dolor torácico no cardíaco. Un cardiólogo puede ser capaz de confirmar o descartar la existencia de SCA basándose en la identificación de síntomas típicos de SCA y haciendo caso omiso de aquellos síntomas que no son típicos de SCA. Sin embargo, este procedimiento es propenso a errores, y la cardiología moderna requiere la determinación de troponinas cardíacas y de ECG, además de la interpretación de los síntomas del individuo respectivo (y la evaluación de la historia clínica). Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención incluye aquellos individuos que tienen signos y síntomas de SCA, en particular dolor torácico, en los que los signos/síntomas, en particular dolor torácico, no permiten un diagnóstico inequívoco de SCA debido a que posiblemente estén relacionados con SCA, pero posiblemente también estén relacionados con trastornos distintos de SCA; sin embargo, los síntomas, en particular el dolor torácico, requieren un diagnóstico/evaluación adicional de las enfermedades subyacentes, con el fin de confirmar o descartar el SCA. En su caso, también es posible que el individuo al que se aplica el procedimiento de la presente invención muestre síntomas que sean inequívocos de SCA, por ejemplo, un fuerte dolor torácico que se propaga al brazo o al hombro.

El término "diagnosticar", tal como se usa en el presente documento, significa valorar, identificar, evaluar o clasificar el estado isquémico de un sujeto que muestra los signos y síntomas de síndrome coronario agudo y que tiene una cantidad de una troponina cardíaca inferior a la cantidad que es indicativa de un IM, en particular si el sujeto sufre un estado isquémico que conduce a una disfunción cardíaca reversible o a una lesión cardíaca no reversible. El término

"diagnosticar" también se refiere a distinguir, en sujetos que muestran los signos y síntomas de síndrome coronario agudo y preferentemente tienen una cantidad de troponina cardíaca inferior a la cantidad que es indicativa de un IM, entre un sujeto fisiológicamente sano y un sujeto que sufre isquemia que, según el caso, conducirá a una disfunción cardíaca reversible o a una lesión cardíaca no reversible.

El diagnóstico y los criterios aplicados para el diagnóstico de SCA son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, la evaluación de la historia clínica (antecedentes de enfermedad arterial coronaria (EAC)) y dolor torácico durante más de 20 min.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "un sujeto que muestra signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio" abarca un sujeto que muestra signos y síntomas de síndrome coronario agudo que pueden o no estar asociados a la existencia o diagnóstico de un infarto de miocardio, siempre y cuando los signos y síntomas mostrados no sean suficientes para diagnosticar el infarto de miocardio sin dejar dudas sobre el resultado diagnóstico. Los criterios para el diagnóstico del infarto de miocardio han sido descritos por el Grupo de Trabajo Conjunto ESC/ACCF/AHA/WHF para la Redefinición del Infarto de Miocardio (The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee: Universal definition of myocardial infarction, loc. cit.), que ya se han resumido con carácter previo.

Se determina la cantidad de troponina cardíaca y el sujeto muestra una cantidad de una troponina cardíaca inferior a la cantidad que es indicativa de un infarto de miocardio. Alternativamente, se registra un electrocardiograma (ECG) del sujeto y el ECG no cumple con los criterios de infarto de miocardio, preferentemente el paciente no cumple los criterios de IM sin elevación de ST. Aún más preferentemente, se determina el nivel de una troponina cardíaca y se registra un ECG y estos dos parámetros no cumplen los criterios de infarto de miocardio, es decir, la cantidad determinada de troponina es menor que la cantidad que es indicativa de un infarto de miocardio y/o el ECG. En los casos de un ECG que no cumple los criterios de infarto de miocardio en el momento de la presentación y de un resultado en el ensayo de troponina que no cumple los criterios diagnósticos de infarto de miocardio (sin elevación de ST), preferentemente este procedimiento se repite, preferentemente después de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 horas. En caso de que el ECG y la determinación de troponina sigan sin cumplir los criterios diagnósticos de infarto de miocardio, el paciente puede ser dado de alta con el diagnóstico de exclusión de infarto de miocardio.

El término "isquemia" o la expresión "estado isquémico", tal como se usan en el presente documento, se refieren al estado de un suministro reducido de sangre no suficiente para las necesidades metabólicas, en particular no suficiente para el suministro de oxígeno al tejido afectado. La isquemia se puede asociar a, conducir a o causar una alteración de la función miocárdica dependiendo del alcance del miocardio isquémico y la duración de la isquemia. La función miocárdica se normaliza rápidamente después de un único episodio de isquemia que dure menos de 2 minutos. A medida que aumenta la duración y/o gravedad de la isquemia, se produce un retraso temporal en la recuperación de la función, a pesar de que el flujo sanguíneo se haya restablecido. Una oclusión de un vaso de 15 minutos tiene como resultado, por ejemplo, una función miocárdica alterada de 6 h, aunque se restablezca el flujo sanguíneo. Este episodio reversible no está asociado a la necrosis miocárdica, preferentemente el término "isquemia" o la expresión "estado isquémico" abarcan una disfunción cardíaca reversible y lesión cardíaca no reversible, así como un proceso que conduce a, está asociado a o causa una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible. El término "isquemia" o la expresión "estado isquémico" también abarcan una lesión cardíaca que está asociada a, conduce a o causa un infarto de miocardio.

La expresión "disfunción cardíaca reversible" se refiere a una capacidad o actividad de bombeo deteriorada del corazón, que es completamente reversible y que preferentemente se produce sin dejar ningún deterioro estructural significativo en el corazón, incluyendo necrosis de un número significativo de cardiomiocitos. Preferentemente, la capacidad o actividad de bombeo deteriorada no causa ninguna lesión significativa al cuerpo del sujeto. Una disfunción cardíaca reversible puede ser inmediatamente reversible, es decir, en unos pocos segundos o minutos, como en los casos de períodos isquémicos muy cortos. Otros ejemplos de disfunciones cardíacas reversibles incluyen el aturdimiento cardíaco. En estos casos, la reversibilidad se puede demorar durante horas o días.

Si una proporción significativa del miocardio es isquémico, esto puede tener como resultado un estiramiento de las paredes y el rápido aumento de los niveles de péptidos natriuréticos.

En otro modo de realización preferido de la presente invención, se determina la cantidad de un péptido natriurético, es decir, un péptido de tipo BNP del grupo BNP y NT-proBNP o un péptido de tipo ANP del grupo ANP y NT-proANP. Preferentemente, se determina un péptido de tipo ANP, aún más preferentemente NT-proANP, con el fin de diagnosticar un posible deterioro de la circulación del sujeto.

En consecuencia, aunque no está causalmente relacionada con la isquemia, un aumento de las cantidades de los péptidos natriuréticos de tipo ANP con respecto a una cantidad de referencia indica un estado isquémico en ciertas regiones del miocardio, lo que conduce a una mayor necesidad de bombeo para el miocardio no isquémico y, en consecuencia, a un deterioro de la circulación.

En la presente invención, se prefiere la determinación de péptidos natriuréticos de tipo ANP, preferentemente NT-proANP, sobre la determinación de péptidos natriuréticos de tipo BNP, como NT-proBNP. Esto es una consecuencia de la rápida liberación de péptidos de tipo ANP. Después de un aumento de la presión cardíaca y volumen cardíaco (estiramiento de las paredes), la cantidad de NT-proANP aumenta en un período de tiempo de 15 a 60 minutos, lo que permite un diagnóstico rápido de una disfunción circulatoria. Esto es obligatorio en el contexto de la presente invención, con el fin de poder iniciar tratamientos que permitan salvar el miocardio afectado por isquemia, pero que aún no es necrótico.

Por el contrario, los péptidos natriuréticos de tipo BNP, en particular NT-proBNP sólo aumentan en un período de tiempo de 4 a 6 horas después de un aumento de la presión cardíaca y del volumen cardíaco (estiramiento de las paredes), que en muchos casos no es suficiente para el propósito de la presente invención.

En la presente invención se supone que el deterioro de la circulación está asociado a o causado por la formación de regiones isquémicas en el miocardio que han conservado su metabolismo o por regiones de miocardio aturdidas (que tienen un metabolismo y bombeo reducidos con un rendimiento inferior al del miocardio completamente funcional, sin exceder el rendimiento de bombeo a largo plazo del miocardio aturdido). Como consecuencia de la reducida capacidad o actividad de bombeo del miocardio isquémico y/o aturdido, el miocardio restante no afectado tiene que garantizar las necesidades de suministro de sangre del cuerpo y puede tener que aumentar su rendimiento.

En un modo de realización preferido de la presente invención, los sujetos que tienen miocardio aturdido y/o que han sufrido un IMEST se pueden descartar determinando la cantidad de H-FABP y/o mioglobina. En general, este modo de realización comprende la determinación de H-FABP y/o mioglobina, después de determinar una troponina cardíaca y/o registrar un ECG, y antes de determinar las cantidades de sFLT-1 y, opcionalmente, de HGF en las etapas a) y b) del procedimiento de la presente invención, con el fin de determinar si el sujeto ha sufrido un infarto de miocardio, en particular un IMEST.

En un miocardio aturdido, la función miocárdica se reduce en reposo pero los miocitos siguen siendo viables. La disfunción de VI puede ser reversible en caso de aturdimiento. El miocardio aturdido se observa más comúnmente después de un período transitorio de isquemia seguido por reperusión (función reducida en reposo pero preservada en cuanto a perfusión). Los episodios isquémicos pueden ser individuales o múltiples, breves o prolongados, pero nunca lo suficientemente graves como para provocar lesiones.

La expresión "lesión cardíaca no reversible" se conoce generalmente en el campo y se refiere preferentemente a una lesión cardíaca asociada a muerte celular, preferentemente necrosis de cardiomiocitos, por ejemplo, mediante un proceso necrótico.

Una cantidad de H-FABP y/o mioglobina en una muestra de un sujeto, tal como se define en la presente invención, que es mayor que la cantidad de referencia para confirmar la existencia de IM es indicativa de la existencia reciente de IM en dicho sujeto. Una cantidad de mioglobina y, opcionalmente, H-FABP en un sujeto, tal como se define en la presente invención, que es inferior a la cantidad de referencia para descartar la existencia de IM será un indicador de que no se ha producido recientemente un IM; en este último caso, el sujeto podría sufrir una API. Se debe entender en el contexto de la presente invención que los sujetos, tal como se definen en la presente invención, cuya cantidad de mioglobina se encuentre entre los valores de referencia mencionados anteriormente (la cantidad de referencia para confirmar la existencia reciente de IM y la cantidad de referencia para descartar la existencia reciente de IM) pueden requerir un nuevo diagnóstico. Preferentemente, esto también se puede hacer en sujetos para los que se determinan tanto la cantidad de mioglobina como de H-FABP, en los que ambas cantidades no se corresponden, por ejemplo, una cantidad es mayor (o menor) que la respectiva cantidad de referencia, mientras que la otra cantidad no es mayor (o menor) que la respectiva cantidad de referencia. Particularmente, una cantidad de mioglobina en un sujeto, tal como se define en la presente invención, superior a aproximadamente 77 ng/ml indica una existencia reciente de IM (confirmación), mientras que una cantidad inferior a aproximadamente 55 ng/ml indica que no se ha producido recientemente un IM (descarte). Además, la sensibilidad y especificidad del diagnóstico basado en la determinación de mioglobina en una muestra de un sujeto, tal como se define en la presente invención, es aún mayor cuando, además de la cantidad de mioglobina, se determina la cantidad de H-FABP en una muestra de dicho sujeto y se compara con al menos una cantidad de referencia para H-FABP. Particularmente, una cantidad de H-FABP en un sujeto, tal como se define en la presente invención, superior a aproximadamente 5700 pg/ml indica una existencia reciente de IM (confirmación), mientras que una cantidad inferior a aproximadamente 2500 pg/ml indica que no se ha producido recientemente un IM (descarte).

La expresión "diagnosticar una deficiencia circulatoria" se refiere a valorar si se ha producido o no deficiencia circulatoria en un sujeto, tal como se define en la presente invención, es decir un sujeto que no sufre SCA y que tiene una cantidad de péptidos de tipo ANP, preferentemente NT-proANP, mayor que la cantidad que se considera indicativa de un sujeto sano. La expresión "deficiencia circulatoria" se refiere a la capacidad o actividad disminuida del corazón (miocardio) o de una región del mismo, para bombear a través de la circulación la cantidad de sangre que se requiere para garantizar un suministro de sangre al tejido suficiente para satisfacer las necesidades metabólicas. Con el fin de compensar la capacidad disminuida, el miocardio tiene que aumentar su rendimiento, lo

que tiene como resultado un mayor estrés en las paredes (y la liberación de NT-proANP). Por ejemplo, una determinada región del miocardio se ve afectada por isquemia, lo que tiene como resultado una capacidad de bombeo deteriorada de la región afectada. Para garantizar un suministro de sangre suficiente, se aumenta el rendimiento de bombeo, en particular de aquellas regiones del miocardio que no han resultado afectadas y que han mantenido su capacidad de bombeo completa. Sin embargo, este aumento del rendimiento estimula la expresión de NT-proANP.

Con el fin de compensar la falta de suministro de sangre, el corazón tiene que trabajar más duro de lo habitual, lo que tiene como resultado, en general, un aumento del estrés sobre las paredes del corazón (ya que el corazón tiene que aumentar su capacidad de bombeo). Dicha deficiencia no es perjudicial siempre que la causa subyacente se elimine antes de que se produzca una lesión cardíaca irreversible. Existen varias razones para la deficiencia circulatoria.

El término "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y más preferentemente seres humanos.

El término "simultáneamente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la realización de una actividad, preferentemente la determinación de un marcador usado en el contexto de la presente invención, en el mismo momento temporal. Esto incluye preferentemente mediciones en las que la determinación de un marcador se retrasa ligeramente con respecto a la determinación de otro marcador, por ejemplo, durante segundos o unos pocos minutos, por ejemplo 1 minuto, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos. Es esencial que la determinación del último marcador no se retrase tanto que sus cantidades puedan cambiar en un grado tal que resulte un diagnóstico diferente. "Determinar un marcador" se refiere a la toma de la muestra de fluido corporal en la que se determina la cantidad del marcador, o a la determinación y percepción de la cantidad de marcador, o ambas cosas.

La expresión "determinar (la cantidad de un marcador) en al menos en dos momentos temporales diferentes", tal como se utiliza en el presente documento, pretende abarcar la determinación de la cantidad de marcador en intervalos, en el que la segunda muestra y cada muestra posterior se tomarán en un intervalo que garantice una monitorización eficaz del estado isquémico. En general, el intervalo entre cada muestra es de aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3, 4, 5 o 6 horas. Por ejemplo, la muestra inicial se toma aproximadamente 1 hora después de la aparición de los síntomas de síndrome coronario agudo o inmediatamente después de la presentación del sujeto ante el médico, y cada muestra adicional se toma aproximadamente 1 hora después de las muestras iniciales. El número de muestras tomadas dependerá de la evaluación de la isquemia.

La expresión "síndrome coronario agudo" (SCA) y los criterios para diagnosticar SCA se conocen y entienden por parte del experto en la técnica. La expresión se refiere a una gran variedad de síntomas clínicos causados por isquemia miocárdica aguda. La propia isquemia resulta de la perturbación de una placa aterosclerótica en una arteria coronaria. Se sabe en la técnica que SCA puede ir acompañado de síntomas tales como molestias o dolor epigástrico, en el brazo, muñeca o mandíbula, en particular dolor torácico, en la cual, en particular, el dolor torácico dura más de 20 minutos y se puede propagar al brazo, espalda u hombro. Otros síntomas de un episodio cardiovascular agudo pueden ser náuseas o vómitos inexplicables, dificultad para respirar, debilidad, mareos, aturdimiento, sudoración o síncope, así como cualquier combinación de los mismos. Generalmente, estos síntomas clínicos, especialmente dolor torácico, ocurren repentinamente; pueden aparecer en reposo o después de un esfuerzo mínimo. Además, en el contexto de la presente invención, la expresión "síndrome coronario agudo" también puede estar relacionada con SCA sospechado, asumido o posible, ya que estas expresiones se usan frecuentemente para pacientes que presentan signos y síntomas propios de SCA y en los que el diagnóstico no se ha establecido de forma concluyente (véase Morrow, loc. cit.). Los pacientes con SCA pueden mostrar angina de pecho inestable (API) o estos individuos pueden sufrir un infarto de miocardio (IM). El IM puede ser un infarto de miocardio con elevación de ST (IMEST) o un infarto de miocardio sin elevación de ST (IMSEST). El IM se clasifica como perteneciente a enfermedades cardíacas coronarias (ECC) y está precedido por otros episodios clasificados también como pertenecientes a ECC, como la angina de pecho inestable (API). Sintomático de la API es el dolor torácico que se alivia por la administración sublingual de nitroglicerina. La API está provocada por una oclusión parcial de los vasos coronarios que conduce a hipoxemia e isquemia miocárdica. En caso de que la oclusión sea demasiado grave o total, se produce necrosis miocárdica irreversible (que es el estado patológico subyacente al infarto de miocardio). Generalmente, el IMEST se diagnostica por electrocardiografía, en caso de que el electrocardiograma (ECG) muestre elevación del segmento ST. La determinación de la cantidad de troponina cardíaca al menos seis horas después de la aparición de los síntomas de SCA permite diferenciar API e IMSEST. Si la cantidad de troponina es elevada (indicando daño miocárdico), se asume un IMSEST. El IM puede ocurrir sin síntomas evidentes, es decir, el sujeto no muestra ninguna molestia, y el IM no está precedido de angina de pecho estable o inestable. La existencia de un IM puede ir seguida de una disfunción ventricular izquierda (DVI).

La expresión "troponina cardíaca" se refiere a todas las isoformas de troponinas expresadas en células del corazón y, preferentemente, a las células subendocárdicas. Estas isoformas están bien caracterizadas en la técnica como se describe, por ejemplo, en Anderson 1995, Circulation Research, vol. 76, n.º 4: 681-686 y Ferrieres 1998, Clinical

Chemistry, 44: 487-493. Preferentemente, troponina cardíaca se refiere a troponina T y/o a troponina I y, lo más preferentemente, a troponina T. Se debe entender que las isoformas de troponinas se pueden determinar en el procedimiento de la presente invención de manera conjunta, es decir, simultánea o secuencialmente, o de forma individual, es decir, sin determinar la otra isoforma en absoluto. Las secuencias de aminoácidos para la troponina T humana y la troponina I humana se divulgan en Anderson, loc. cit. y Ferrieres 1998, Clinical Chemistry, 44: 487-493.

La expresión "troponina cardíaca" abarca también variantes de las troponinas específicas mencionadas anteriormente, es decir, preferentemente, troponina I y más preferentemente, troponina T. Dichas variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que las troponinas cardíacas específicas. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si se pueden detectar en los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, mediante ensayos ELISA que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichas troponinas cardíacas. Además, se debe entender que una variante, tal como se hace referencia de acuerdo con la presente invención, deberá tener una secuencia de aminoácidos que difiera debido a al menos una sustitución, eliminación y/o adición de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante sigue siendo al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % idéntica a la secuencia amino de la troponina específica, preferentemente sobre toda la longitud de la troponina específica. Las variantes pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de la especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento incluyen fragmentos de las troponinas cardíacas específicas o los tipos de variantes antes mencionados, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales como se ha mencionado con anterioridad. Preferentemente, las variantes de troponina cardíaca tienen propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítomos) comparables a las de la troponina T o troponina I humana. De este modo, las variantes serán reconocibles por los medios o ligandos antes mencionados usados para la determinación de la cantidad de las troponinas cardíacas. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de las troponinas. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación o miristilación. Preferentemente, la propiedad biológica de la troponina I y su variante es la capacidad para inhibir la actomiosina ATPasa o para inhibir la angiogénesis *in vivo* e *in vitro*, que puede por ejemplo detectarse en base al ensayo descrito por Moses et al. 1999 PNAS USA 96 (6): 2645-2650). Preferentemente, la propiedad biológica de la troponina T y su variante es la capacidad para formar un complejo con troponina C e I, para unirse a iones calcio o para unirse a tropomiosina, preferentemente si está presente como un complejo de troponina C, I y T o un complejo formado por troponina C, troponina I y una variante de troponina T.

La expresión "cantidad de troponina cardíaca", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración de una troponina cardíaca, preferentemente de TnT. Preferentemente, la expresión se refiere a la concentración de una troponina cardíaca en una muestra de plasma o suero de un sujeto. La expresión "cantidad de troponina cardíaca inferior a la cantidad que es indicativa de infarto de miocardio" se puede referir a cualquier cantidad de troponina cardíaca a partir de, e incluyendo, cero y que sea detectable por medios y procedimientos conocidos de la técnica, por ejemplo, mediante ensayos de troponina cardíaca comercialmente disponibles. Preferentemente, la "cantidad de troponina cardíaca que sea detectable" se refiere a una concentración que es igual a o mayor que el límite de detección más bajo del ensayo utilizado para determinar la cantidad de troponina. Preferentemente, la cantidad de troponina que sea detectable se puede referir como cualquier concentración que sea igual o mayor que 0,001 ng/ml, 0,002 ng/ml, 0,005 ng/ml, 0,0075 ng/ml o 0,01 ng/ml. Más preferentemente, la cantidad de troponina cardíaca que sea detectable se refiere a cualquier concentración que sea igual o mayor que 0,002 ng/ml. La expresión "cantidad de troponina que es indicativa de infarto de miocardio" se refiere a una concentración de troponina comúnmente aceptada que indica un infarto de miocardio.

La troponina T se sometió al ensayo de troponina T de alta sensibilidad utilizando el analizador ELECSYS 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo tiene un intervalo de medición de 3 – 10 000 ng/ml o pg/ml. Se encontró que la precisión del ensayo estaba entre 0,8 y 2,6 por ciento, dependiendo de la concentración de troponina en la muestra.

Preferentemente, la cantidad del biomarcador determinado en la muestra, preferentemente la cantidad de troponina cardíaca, considerada como indicativa de infarto de miocardio, se refiere a una concentración que está por encima de la concentración del percentil 95, preferentemente por encima del percentil 99, de una población de referencia adecuada (puntuación de discriminación). Esta cantidad se basa en una recomendación formulada por el Grupo de Trabajo Conjunto ESC/ACCF/AHA/WHF para la Redefinición del Infarto de Miocardio (The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee: Universal definition of myocardial infarction, loc. cit.) El experto en la técnica sabe cómo seleccionar una población de referencia adecuada y cómo determinar la concentración del percentil 95 y 99. Se debe entender que esta concentración puede diferir según el ensayo usado para determinar la concentración de troponina cardíaca y según la población de referencia seleccionada. Las cantidades de troponina cardíaca preferentes indicativas de IM en el contexto de la presente invención pueden ser, pero no están limitadas a, una cantidad de al menos aproximadamente 0,05 ng/ml, de al menos aproximadamente 0,075 ng/ml, de al menos aproximadamente 0,099 ng/ml, de al menos aproximadamente 0,1 ng/ml, de al menos

aproximadamente 0,2 ng/ml y de al menos aproximadamente 0,3 ng/ml.

En un modo de realización preferido de los procedimientos de la presente invención, la cantidad de troponina, particularmente la cantidad de troponina T, en un sujeto que muestra los signos y síntomas de síndrome coronario agudo y que tiene una cantidad de una troponina cardíaca inferior a la cantidad que se considera indicativa de infarto de miocardio (como se define en la presente solicitud) es igual a o mayor que aproximadamente 0,002 y menor que aproximadamente 0,1 ng/ml. El percentil 99 calculado de acuerdo con los requisitos del Grupo de Trabajo Conjunto ESC/ACCF/AHA/WHF para la Redefinición del Infarto de Miocardio, loc. cit., fue de 0,14 ng/ml, que es la cantidad más preferida indicativa de IM.

La expresión "sFLT1 soluble", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que es una forma soluble del receptor FLT1 de VEGF. Se identificó en medio de cultivo acondicionado de células endoteliales de vena umbilical humana. El receptor FLT-1 soluble (sFLT-1) endógeno es cromatográfica e inmunológicamente similar a sFLT-1 recombinante humana y se une al [¹²⁵I] VEGF con una afinidad elevada comparable. Se muestra que sFLT1 humana forma un complejo estabilizado con VEGF con el dominio extracelular de KDR/Flk-1 *in vitro*. Preferentemente, sFLT-1 se refiere a sFLT-1 humana. Más preferentemente, la sFLT-1 humana se puede deducir de la secuencia de aminoácidos de FLT-1 como se muestra en el número de acceso GenBank P17948, GI: 125361. Una secuencia de aminoácidos para sFLT-1 de ratón se muestra en el número de acceso GenBank BAA24499.1, GI: 2809071. Además, se debe entender que una variante, tal como se hace referencia de acuerdo con la presente divulgación, tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, eliminación y/o adición de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante sigue siendo, preferentemente, al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 92 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a la secuencia amino de la sFLT-1 específica. Las variantes pueden ser variantes alélicas, variantes de empalme o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de la especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento incluyen fragmentos de la sFLT-1 específica o de los tipos de variantes antes mencionados, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales como se ha mencionado con anterioridad. Preferentemente, las variantes de sFLT-1 tienen propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítipo) y/o propiedades biológicas comparables a las de sFLT-1 humana. De este modo, las variantes serán reconocibles por los medios o ligandos antes mencionados usados para la determinación de la cantidad de sFLT-1. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de sFLT1. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones pos-traduccionales tales como glicosilación, fosforilación o miristilación. Preferentemente, la propiedad biológica de sFLT-1 es la capacidad de unirse a VEGF con alta afinidad y/o formar un complejo estabilizado con VEGF con el dominio extracelular de KDR/Flk-1.

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) se identificó por primera vez en 1984 y 1985 y se purificó como un mitógeno potente de hepatocitos de cultivo primario. El HGF es una forma precursora de cadena sencilla, y el procesamiento adicional por proteasas de serina en la forma bicatenaria se acopla a su activación. Las proteasas de serina responsables de la activación de HGF incluyen activador de HGF o enzima de conversión de HGF y activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA). El receptor para HGF se identificó como un producto de proto-oncogén c-Met. El receptor c-Met está compuesto por una cadena a de 50 kDa y una cadena h de 145 kDa. La unión del HGF al receptor c-Met induce la activación de la tirosina quinasa, dando como resultado una fosforilación posterior de los residuos de tirosina agrupados en el extremo C-terminal. El HGF tiene un papel organotrófico en la regeneración y protección de varios órganos, incluyendo el hígado, el pulmón, el estómago, el páncreas, el corazón, el cerebro y el riñón. El factor de crecimiento de los hepatocitos regula el crecimiento celular, la motilidad celular y la morfogénesis mediante activación de una cascada de señalización de tirosina quinasa después de la unión al receptor proto onco génico c-Met. El factor de crecimiento de los hepatocitos es segregado por células mesenquimales y actúa como citoquina multifuncional sobre células de origen principalmente epitelial. Su capacidad para estimular la mitogénesis, la motilidad celular y la invasión de la matriz le confieren un papel central en la angiogénesis, la tumorigénesis y la regeneración de los tejidos. Se segrega como un único polipéptido inactivo y se escinde por medio de proteasas de serina en una cadena alfa de 69 kDa y una cadena beta de 34 kDa. Un enlace disulfuro entre las cadenas alfa y beta produce la molécula heterodimérica activa. La proteína pertenece a la subfamilia de plasminógeno de las peptidasas S1, pero no tiene actividad de proteasa detectable. El empalme alternativo de este gen produce múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas. Una secuencia de aminoácidos para HGF de ratón se muestra en el número de acceso GenBank NP034557.2, GI: 46048249. Una secuencia de aminoácidos para HGF humano se muestra en el número de acceso GenBank NP000592.3 GI: 33859835. Preferentemente, HGF se refiere a HGF humano. Además, se debe entender que una variante, tal como se hace referencia de acuerdo con la presente invención, tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, eliminación y/o adición de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante sigue siendo, preferentemente, al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 92 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a la secuencia amino del HGF específica. Las variantes pueden ser variantes alélicas, variantes de empalme o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de la especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento incluyen fragmentos del HGF específica o de los tipos de variantes antes mencionados, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales que se han mencionado con anterioridad. Preferentemente, las variantes de HGF tienen propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítipo) y/o propiedades biológicas comparables a las de

HGF humana. De este modo, las variantes serán reconocibles por los medios o ligandos antes mencionados usados para la determinación de la cantidad de las troponinas cardíacas. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de HGF. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones pos-traduccionales tales como glicosilación, fosforilación o miristilación. Preferentemente, la propiedad biológica de HGF es la capacidad de unirse al receptor proto-oncogénico c-Met.

La expresión "péptidos de tipo ANP" comprende pre-pro ANP, pro ANP, NT-proANP y variantes ANP de los mismos (véase, por ejemplo, Bonow, 1996, Circulation 93: 1946-1950). El pre-pro péptido comprende un péptido de señal corto, que se escinde enzimáticamente para liberar el pro péptido. El pro péptido se escinde adicionalmente para dar lugar a un pro péptido N-terminal (NT-proANP) y la hormona activa ANP con 28 aminoácidos. El ANP tiene un efecto vasodilatador y provoca la excreción de agua y sodio a través del tracto urinario.

El ANP tiene una semividua más corta que su contraparte inactiva NT-proANP. El ANP se produce y se libera exclusivamente a partir del atrio. Por lo tanto, la cantidad de ANP puede reflejar predominantemente la función auricular. El término "variantes" en este contexto se refiere a péptidos sustancialmente similares a ANP y NT-proANP. La expresión "sustancialmente similar" se comprende bien por parte del experto en la técnica. En particular, una variante puede ser una isoforma o alelo que muestre intercambios de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la isoforma peptídica más prevalente en la población humana. Además, se debe entender que una variante, tal como se hace referencia de acuerdo con la presente invención, tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, eliminación y/o adición de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante sigue siendo, preferentemente, al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 92 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a la secuencia amino del ANP o NT-proANP. Las variantes pueden ser variantes alélicas, variantes de empalme o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de la especie. También son sustancialmente similares los productos de degradación proteolítica que todavía son reconocidos por los medios diagnósticos o por ligandos dirigidos contra el péptido de longitud completa respectivo, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales, tal como se ha mencionado con anterioridad. Preferentemente, las variantes de péptido de tipo ANP tienen propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítipo) y propiedades biológicas comparables a las del péptido de tipo ANP humano respectivo. De este modo, las variantes serán reconocibles por los medios o ligandos antes mencionados usados para la determinación de la cantidad del péptido de tipo ANP. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de NT-proANP. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones pos-traduccionales tales como glicosilación, fosforilación o miristilación. Preferentemente, la propiedad biológica del ANP es la capacidad vasodilatadora y/o la capacidad de excreción de sodio y agua.

El término "variante" también se refiere a un péptido modificado por vía pos-traduccional, tal como un péptido glicosilado. Una "variante" es también un péptido que ha sido modificado después de la recogida de la muestra, por ejemplo, mediante unión covalente o no covalente de un marcador, particularmente un marcador radiactivo o fluorescente, al péptido. La medición de la cantidad de un péptido modificado después de la recogida de muestra se entiende como la medición de cantidad de péptido originalmente no modificado.

En el contexto de la presente invención, el péptido de tipo ANP es preferentemente NT-proANP.

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 se pueden obtener por técnicas bien conocidas e incluyen preferentemente muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferentemente, muestras de sangre, plasma o suero. Se pueden obtener muestras de tejidos u órganos a partir de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. Las células separadas se pueden obtener a partir de los fluidos corporales o tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como centrifugación o clasificación celular. Preferentemente, las muestras de células, tejidos u órganos se obtienen a partir de dichas células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos a los que se hace referencia en el presente documento. Preferentemente, el término "muestra" se refiere a una muestra de plasma o suero, más preferentemente una muestra de suero.

En la presente invención, la muestra se obtiene en un momento temporal apropiado que es conocido por el experto en la materia. Se debe tener en cuenta que el sujeto en estudio sufre un estado fisiopatológico agudo (SCA), lo que requiere un diagnóstico rápido y una decisión rápida sobre un tratamiento adecuado. Preferentemente, la muestra se obtiene a partir de un sujeto de acuerdo con la presente invención de forma breve, por ejemplo, después de aproximadamente 1 hora, no más de aproximadamente 2 horas, no más de aproximadamente 3 horas, no más de aproximadamente 4 horas, no más de aproximadamente 5 horas o no más de aproximadamente 6 horas después de la aparición de los síntomas de síndrome coronario agudo. Preferentemente, la muestra se toma inmediatamente (es decir, unos pocos minutos, es decir, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 30, aproximadamente 45 o aproximadamente 1 hora) después de la presentación del sujeto ante el médico.

En el caso de que las cantidades de sFLT-1 y/u, opcionalmente, HGF y/u, opcionalmente, un péptido de tipo ANP se determinen de forma repetida, preferentemente al menos dos veces, para monitorizar la gravedad de la isquemia, la

segunda muestra y cada muestra posterior se tomará en un intervalo de tiempo que garantice una monitorización eficaz del estado isquémico. En general, el intervalo entre cada muestra es de aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3, 4, 5 o 6 horas. Por ejemplo, la muestra inicial se toma

aproximadamente 1 hora después de la aparición de los signos y/o síntomas de síndrome coronario agudo o inmediatamente después de la presentación del sujeto ante el médico, y cada muestra adicional se toma aproximadamente 1 hora después de las muestras iniciales. El número de muestras tomadas dependerá de la evaluación de la isquemia.

La determinación de la cantidad de una troponina cardíaca, preferentemente troponina T, o la cantidad de sFLT-1, o la cantidad de HGF, o cualquier otro péptido o polipéptido o proteína a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva se refiere a la medición de la cantidad o concentración, preferentemente de forma semi-cuantitativa o cuantitativa. Los términos polipéptido y proteína se usan de manera intercambiable a lo largo de la presente solicitud. La medición se puede realizar de forma directa o indirecta. 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 propio péptido o polipéptido y cuya intensidad se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presentes en la muestra. Dicha señal —, en ocasiones referida en el presente documento como señal de intensidad, se puede obtener, por ejemplo, midiendo 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 a partir de un componente secundario (es decir, un componente que no es el propio péptido o polipéptido) o un sistema de lectura biológica, por ejemplo, respuestas celulares mesurables, ligandos, marcadores o productos de reacción enzimáticos.

De acuerdo con la presente invención, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido se puede lograr por todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos y procedimientos de inmunoensayo que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo en sándwich, de competición u otros. Dichos ensayos desarrollarán una señal que es indicativa de la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la intensidad de la señal se puede correlacionar, preferentemente, de forma directa o indirecta (por ejemplo, de forma inversamente proporcional) con la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Otros procedimientos adecuados comprenden medir una propiedad física o química específica para el péptido o polipéptido, tal como su masa molecular precisa o su espectro de RMN. Dichos procedimientos comprenden, preferentemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos de cromatografía. Además, los procedimientos incluyen procedimientos basados en ELISA de microplacas, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (disponibles, por ejemplo, en analizadores Elecsys™), CBA (un ensayo enzimático de unión a cobalto, disponible por ejemplo en analizadores Roche-Hitachi™) y ensayos de aglutinación de látex (disponibles, por ejemplo, en analizadores Roche-Hitachi™).

Preferentemente, 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 es indicativa de la cantidad del péptido o polipéptido con dicho péptido o polipéptido durante un período de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular. Para medir las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade, preferentemente, a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión cuantificable de un gen indicador o la secreción de una sustancia, por ejemplo, un péptido, un polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia generará una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad del péptido o polipéptido.

También preferentemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica que se puede obtener a partir del péptido o polipéptido en la muestra. Tal como se ha descrito anteriormente, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada en una variable m/z específica para el péptido o polipéptido, observada en espectros de masas o un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido puede comprender, preferentemente, las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) eliminar (opcionalmente) el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una señal de intensidad. La unión, de acuerdo con la presente invención, incluye tanto la unión covalente como la no covalente. Un ligando, de acuerdo con la presente invención, puede ser cualquier compuesto, por ejemplo, un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña, que se une al péptido o polipéptido descrito en el presente documento. Los ligandos preferentes incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos tales como receptores o socios de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos que comprenden los dominios de unión para los péptidos y aptámeros, por ejemplo, aptámeros de ácidos nucleicos o péptidos. Los procedimientos para preparar dichos ligandos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también se ofrecen por parte de los proveedores comerciales. El experto en la técnica está familiarizado con procedimientos para desarrollar derivados de tales ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Estos derivados se pueden entonces someter a ensayo para su unión de acuerdo con procedimientos de cribado conocidos en la técnica, por ejemplo, visualización de

fagos. Los anticuerpos a los que se hace referencia en el presente documento incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unirse a antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos híbridos humanizados en los que 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 normalmente al menos los residuos de aminoácidos de unión al antígeno del donante, pero también pueden comprender otros residuos de aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos se pueden preparar por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido. De acuerdo con la presente invención, unión específica significa que el ligando o agente no debe unirse sustancialmente a ("reaccionar de forma cruzada" con) otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra que se va a analizar. Preferentemente, el péptido o polipéptido unido específicamente se debe unir con una afinidad al menos 3 veces mayor, más preferentemente al menos 10 veces mayor e incluso más preferentemente al menos 50 veces mayor que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si todavía se puede distinguir y medir inequívocamente, por ejemplo, de acuerdo con su tamaño en ensayo de inmunotransferencia, o por su abundancia relativamente mayor en la muestra. La unión del ligando se puede medir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Preferentemente, dicho procedimiento es semicuantitativo o cuantitativo. Los procedimientos adecuados se describen a continuación.

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

En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, se puede medir un producto de reacción enzimática (por ejemplo, la cantidad de una proteasa se puede medir midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo, en un ensayo de inmunotransferencia). Alternativamente, el ligando puede presentar propiedades enzimáticas por sí mismo y el complejo "ligando/péptido o ligando/polipéptido" o el ligando que estaba unido por el péptido o polipéptido, respectivamente, se puede poner en contacto con un sustrato adecuado que permita la detección mediante la generación de una señal de intensidad. Para la medición de productos de reacción enzimática, la cantidad de sustrato es preferentemente saturante. El sustrato también se puede marcar con un marcador detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para producir una cantidad detectable, preferentemente medible, del producto que se va a producir. En lugar de medir la cantidad de producto, se puede medir el tiempo necesario para la aparición de una cantidad dada (por ejemplo, detectable) de producto.

En tercer lugar, el ligando se puede acoplar de forma covalente o no covalente a un marcador que permita la detección y medición del ligando. El marcaje se puede realizar mediante procedimientos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcador de forma directa (covalente o no covalentemente) al ligando. El marcaje indirecto implica la unión (covalente o no covalentemente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario se debe unir específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario se puede acoplar a un marcador adecuado y/o ser el objetivo (receptor) del 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 sistema bien conocido de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también se puede "marcar" con uno o más marcadores conocidos en la técnica. Dichos marcadores pueden entonces ser dianas para ligandos de orden superior. Los marcadores adecuados incluyen biotina, digoxigenina, His-Tag, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, marcador myc, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A, proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, el marcador está preferentemente en el extremo N-terminal y/o en el extremo C-terminal. Los marcadores adecuados son todos los marcadores detectables por un procedimiento de detección apropiado. Los marcadores típicos incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridano, luminol, rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radiactivos, marcadores magnéticos ("por ejemplo, perlas magnéticas", incluyendo marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de los mismos. Los sustratos adecuados para la detección incluyen di-amino-benzidina (DAB), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4 cloro-3-indolil-fosfato, disponible como solución de reserva preparada de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación enzima-sustrato adecuada puede dar como resultado un producto de reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que se puede medir de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando 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 manera análoga. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo Texas, fluoresceína y los tintes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Otros marcadores fluorescentes están disponibles, por ejemplo, en Molecular Probes (Oregon). También se contempla el uso de puntos de cuanto como marcadores fluorescentes. Los marcadores radiactivos típicos incluyen ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P y similares. Un marcador radiactivo se puede detectar por cualquier procedimiento conocido y apropiado, por ejemplo, una película sensible a la luz o un dispositivo de formación de imágenes de fósforo. Los procedimientos de medición

adecuados de acuerdo con la presente invención incluyen también precipitación (particularmente inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia generada por vía eléctrica), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática), inmunoensayos enzimáticos de tipo intercalado, inmunoensayos de electroquimioluminiscencia de tipo intercalado (ECLIA), fluoroinmunoensayo de lantánidos con disociación mejorada (DELFA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría mejorada con látex, o inmunoensayos en fase sólida. Otros procedimientos conocidos en la técnica (tales como electroforesis de gel, electroforesis de gel 2D, electroforesis de gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), inmunotransferencia y espectrometría de masas) se pueden usar solos o en combinación con marcaje u otros procedimientos de detección, tal como se describió con anterioridad.

La cantidad de un péptido o polipéptido se puede determinar, también preferentemente, como sigue: (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el péptido o polipéptido tal como se especificó anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) medir la cantidad de péptido o polipéptido que está unido al soporte. El ligando, elegido preferentemente del grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está preferentemente presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para la fabricación de soportes sólidos se conocen bien en la técnica e incluyen, entre otros, materiales de columna comercialmente disponibles, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede estar unido a muchos vehículos diferentes. Ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los procedimientos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando se conocen bien e incluyen, pero no se limitan a, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. También se contempla el uso de "matrices de suspensión" como matrices de acuerdo con la presente invención (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12). En dichas matrices de suspensión, el vehículo, por ejemplo, una microperla o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consiste en diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que portan diferentes ligandos. Se conocen generalmente procedimientos para producir dichas matrices, por ejemplo, basados en química en fase sólida y grupos protectores fotolábiles (Patente de EE. UU. 5.744.305).

Preferentemente, la cantidad de sFLT-1 y la cantidad de HGF (si se mide HGF) y la cantidad de los péptidos de tipo ANP y, según el caso, las cantidades de otros péptidos medidas en el contexto de la presente invención se determinan en una muestra de sangre, por ejemplo, una muestra de suero o plasma, obtenida a partir de un sujeto tal como se define en la presente invención. Preferentemente, dicha determinación se realiza mediante ELISA. Dicha determinación por ELISA se puede realizar, por ejemplo, utilizando el inmunoensayo Quantikine Human HGF, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE.UU., y/o el inmunoensayo Quantikine Human Soluble VEGF R1/Flt-1 (para sFLT-1), R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE.UU., y el inmunoensayo NT-proANP de Biomedica Medizinprodukte, Viena, Austria. Según el caso, las cantidades respectivas de sFLT-1 y/o de HGF, tal como se especifica en otra parte de la presente solicitud, se pueden determinar, respectivamente, usando el estuche de ensayo HBT ELISA para la proteína de unión a ácidos grasos de tipo corazón humano (HyCult Biotechnology, Uden, Países Bajos) para la determinación de la cantidad de H-FABP y utilizando el sistema de ensayo de mioglobina Tina-Quant® (Roche Diagnostics) para la determinación de la cantidad de mioglobina.

El término "cantidad", tal como se utiliza en el presente documento, abarca la cantidad absoluta (por ejemplo, de sFLT-1 o HGF), la cantidad o concentración relativa (por ejemplo, de sFLT-1 o HGF), así como cualquier valor o parámetro que se correlacione con la misma. Dichos valores o parámetros comprenden valores de señal de intensidad de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas a partir de dichos péptidos mediante mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en espectros de masas o espectros de RMN. Además, se incluyen todos los valores o parámetros que se obtienen mediante mediciones indirectas especificadas en otra parte de la presente descripción, por ejemplo, cantidades de expresión determinadas a partir de sistemas de lectura biológica en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidos a partir de ligandos unidos de forma específica. Se debe entender que los valores que se correlacionan con las cantidades o parámetros anteriormente mencionados también se pueden obtener por medio de todas las operaciones matemáticas convencionales.

El término "comparación", tal como se utiliza en el presente documento, abarca la comparación de la cantidad del péptido, polipéptido, proteína comprendida en la muestra a analizar con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada en otra parte de la presente descripción. Se debe entender que comparación, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una comparación de parámetros o valores correspondientes, por ejemplo, una cantidad absoluta se compara con una cantidad de referencia absoluta mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia o una señal de intensidad obtenida a partir de una muestra de ensayo se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación mencionada en la etapa (b) del procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo manualmente o asistida por ordenador. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada se puede comparar con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos mediante un programa informático. El programa informático puede evaluar adicionalmente el resultado de la comparación, es

decir, proporcionar automáticamente la valoración deseada en un formato de salida adecuado. Basándose en la comparación de la cantidad o cantidades determinadas en la etapa a) con la cantidad o cantidades de referencia adecuadas, es posible diagnosticar el IM en dicho sujeto. Se debe entender que una cantidad de sFLT-1 determinada en la etapa (a) de los procedimientos de la presente invención se compara en la etapa (b) con una cantidad de referencia para sFLT-1 tal como se especifica en otra parte de la presente solicitud y que una cantidad de HGF se compara con una cantidad de referencia para HGF.

Por consiguiente, la expresión "cantidad de referencia", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad que permite determinar el estado isquémico (que también se puede denominar "grado de isquemia" en el contexto de la presente invención) en un sujeto que muestra los signos y síntomas de síndrome coronario agudo y que tiene una cantidad de una troponina cardíaca que es inferior a la cantidad que se considera indicativa de un infarto de miocardio (por lo tanto, en un sujeto tal como se define en la presente invención). La comparación con cantidades de referencia permite diagnosticar si la isquemia conducirá a una disfunción cardíaca / lesión cardíaca. La aparición de los síntomas de SCA ha tenido lugar de forma reciente. "Existencia reciente" en este contexto significa que la aparición se ha producido, preferentemente, dentro de un periodo de 6 horas, más preferentemente dentro de un periodo de 4 horas, y del modo más preferido dentro de un periodo de 2 horas antes de que la muestra fuera obtenida a partir de dicho sujeto. Preferentemente, las cantidades de referencia para la gravedad del grado de isquemia pueden proceder de sujetos tal como se definen en la presente invención a los que se les ha diagnosticado síntomas de SCA que han aparecido preferentemente dentro de un periodo de 6 horas, más preferentemente dentro de un periodo de 4 horas y del modo más preferido dentro de un periodo de 2 horas antes de que se obtuviera la muestra, y en los que el resultado del sujeto, concretamente, la existencia de IM, en particular, IMSEST, API, aturdimiento miocárdico, disfunción circulatoria o EAC, se determinó sin signos de SCA.

La expresión "cantidades de referencia", tal como se utiliza en el presente modo de realización de la presente invención, se refiere a cantidades de los polipéptidos que permiten diagnosticar el estado isquémico en un individuo como es un sujeto fisiológicamente sano o un sujeto que tiene un estado isquémico que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible.

Por lo tanto, las cantidades de referencia proceden en general de un sujeto conocido como un sujeto fisiológicamente sano, o un sujeto que tiene un estado isquémico que conduce a una disfunción cardíaca reversible o a una lesión cardíaca no reversible.

En todos los modos de realización de la presente invención, la cantidad/cantidades de los respectivos marcadores utilizados en la misma (una troponina cardíaca, en particular, la troponina T; sFLT-1; HGF y, en algunos modos de realización, NT-proANP) que indican el estado isquémico de un individuo, se determinan por procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

En general, para determinar la cantidad/cantidades o relaciones entre cantidades que permiten establecer el diagnóstico deseado de acuerdo con el modo de realización respectivo de la presente invención, ("umbral", "cantidad de referencia"), la cantidad/cantidades o relaciones entre cantidades del péptido o péptidos respectivos se determinan en grupos de pacientes apropiados. De acuerdo con el diagnóstico que se va a establecer, el grupo de pacientes puede comprender, por ejemplo, sólo individuos sanos, o puede comprender individuos sanos e individuos que padecen el estado fisiopatológico que se va a determinar, o puede comprender sólo individuos que padecen el estado fisiopatológico que se va a determinar, o puede comprender individuos que sufren los diversos estados fisiopatológicos entre los que hay que distinguir mediante el marcador o marcadores respectivos usando procedimientos analíticos validados. Los resultados que se obtienen se recogen y analizan por procedimientos estadísticos conocidos por el experto en la técnica. Los valores umbral obtenidos se establecen entonces de acuerdo con la probabilidad deseada de padecer la enfermedad y se vinculan al valor umbral particular. Por ejemplo, puede ser útil elegir el valor de mediana, el percentil 60, 70, 80, 90, 95 o incluso 99 del colectivo de pacientes sanos y/o no sanos, para establecer el valor o los valores umbral, el valor o los valores de referencia o las relaciones entre cantidades.

Se puede establecer un valor de referencia de un marcador de diagnóstico y la cantidad del marcador en una muestra de paciente se puede comparar de forma sencilla con el valor de referencia. La sensibilidad y especificidad de un ensayo diagnóstico y/o pronóstico depende de algo más que de la "calidad" analítica del ensayo, también depende de la definición de lo que constituye un resultado anormal. En la práctica, las curvas características operativas del receptor o curvas "ROC" se calculan típicamente representando el valor de una variable frente a su frecuencia relativa en poblaciones "normales" y "con enfermedad". Para cualquier marcador particular de la invención, las distribuciones de cantidades de marcadores para sujetos con y sin una enfermedad probablemente se solapan. En tales condiciones, un ensayo no distingue absolutamente entre lo normal y la enfermedad con un 100 % de precisión, y el área de solapamiento indica la zona en la que el ensayo no puede distinguir entre lo normal y la enfermedad. Se selecciona un umbral por encima del cual (o por debajo del cual, dependiendo de cómo cambie el marcador con la enfermedad) se considera que el ensayo es anormal y por debajo del cual el ensayo se considera normal. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permita la identificación correcta de una enfermedad. Las curvas ROC se pueden utilizar incluso cuando los resultados de los ensayos no dan necesariamente un número exacto. Siempre que los resultados se puedan clasificar, se puede crear

una curva ROC. Por ejemplo, los resultados de un ensayo en muestras de "enfermedad" se podrían clasificar según el grado (es decir 1 = bajo, 2 = normal y 3 = alto). Esta clasificación se puede correlacionar con los resultados en la población "normal", y se crea una curva ROC. Estos procedimientos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Hanley *et al.*, Radiology 143: 29-36(1982).

En ciertos modos de realización, se seleccionan marcadores y/o paneles de marcadores que exhiben al menos aproximadamente un 70 % de sensibilidad, más preferentemente al menos aproximadamente un 80 % de sensibilidad, aún más preferentemente al menos aproximadamente un 85 % de sensibilidad, aún más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de sensibilidad, y del modo más preferido al menos aproximadamente un 95 % de sensibilidad, combinada con al menos aproximadamente un 70 % de especificidad, más preferentemente al menos aproximadamente un 80 % de especificidad, aún más preferentemente al menos aproximadamente un 85 % de especificidad, todavía más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de especificidad y del modo más preferido al menos aproximadamente un 95 % de especificidad. En modos de realización particularmente preferentes, tanto la sensibilidad como la especificidad son al menos aproximadamente un 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 85 %, aún más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % y del modo más preferido al menos aproximadamente un 95 %. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5 % de una medida dada.

En otros modos de realización, se usa una razón de probabilidad positiva, razón de probabilidad negativa, razón de momios (odds ratio) o cociente de riesgos (hazard ratio) como una medida de la capacidad de un ensayo para predecir el riesgo de padecer una enfermedad o diagnosticar una enfermedad. En el caso de una razón de probabilidad positiva, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los sujetos de los grupos de "enfermos" que entre los de los grupos de "control"; un valor mayor que 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de enfermos; y un valor menor que 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de control. En el caso de una razón de probabilidad negativa, un valor de 1 indica que un resultado negativo es igualmente probable entre los sujetos de los grupos de "enfermos" que entre los de los grupos de "control"; un valor mayor que 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de ensayo; y un valor menor que 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de control. En ciertos modos de realización preferentes, los marcadores y/o paneles de marcadores se seleccionan preferentemente para presentar una razón de probabilidad positiva o negativa de al menos aproximadamente 1,5 o más o aproximadamente 0,67 o menos, más preferentemente de al menos aproximadamente 2 o más o aproximadamente 0,5 o menos, aún más preferentemente de al menos aproximadamente 5 o más o aproximadamente 0,2 o menos, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 10 o más o aproximadamente 0,1 o menos y del modo más preferido de al menos aproximadamente 20 o más o aproximadamente 0,05 o menos. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5 % de una medida dada.

En el caso de una razón de momios, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los sujetos de los grupos de "enfermos" que entre los de los grupos de "control"; un valor mayor que 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de enfermos; y un valor menor que 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de control. En ciertos modos de realización preferentes, los marcadores y/o paneles de marcadores se seleccionan preferentemente para presentar una razón de momios de al menos aproximadamente 2 o más o aproximadamente 0,5 o menos, más preferentemente de al menos aproximadamente 3 o más o aproximadamente 0,33 o menos, aún más preferentemente de al menos aproximadamente 4 o más o aproximadamente 0,25 o menos, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 5 o más o aproximadamente 0,2 o menos y del modo más preferido de al menos aproximadamente 10 o más o aproximadamente 0,1 o menos. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5 % de una medida dada.

En el caso de una razón de riesgos, un valor de 1 indica que el riesgo relativo de un punto final (por ejemplo, muerte) es igual en ambos grupos "enfermo" y "control"; un valor mayor que 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de enfermos; y un valor menor que 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de control. En ciertos modos de realización preferentes, los marcadores y/o paneles de marcadores se seleccionan preferentemente para presentar una razón de riesgos de al menos aproximadamente 1,1 o más o aproximadamente 0,91 o menos, más preferentemente de al menos aproximadamente 1,25 o más o aproximadamente 0,8 o menos, aún más preferentemente de al menos aproximadamente 1,5 o más o aproximadamente 0,67 o menos, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 2 o más o aproximadamente 0,5 o menos y del modo más preferido de al menos aproximadamente 2,5 o más o aproximadamente 0,4 o menos. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5 % de una medida dada.

Aunque en el presente documento se describen paneles ejemplares, se pueden reemplazar, añadir o eliminar uno o más marcadores de estos paneles ejemplares siempre que sigan proporcionando resultados clínicamente útiles. Los paneles pueden comprender tanto marcadores específicos de una enfermedad (por ejemplo, marcadores que aumentan o disminuyen en caso de infección bacteriana, pero no en otros estados de enfermedad) y/o marcadores no específicos (por ejemplo, marcadores que aumentan o disminuyen debido a inflamación, independientemente de la causa; marcadores que aumentan o disminuyen debido a cambios en la hemostasia, independientemente de la

causa, etc.). Aunque ciertos marcadores no pueden ser individualmente definitivos en los procedimientos descritos en el presente documento, un patrón particular de "huella dactilar" de cambios puede, en efecto, actuar como un indicador específico del estado de enfermedad. Tal como se analizó anteriormente, ese patrón de cambios se puede obtener a partir de una única muestra, o puede considerar opcionalmente cambios temporales en uno o más miembros del panel (o cambios temporales en un valor de respuesta del panel).

Con el fin de comprobar si un valor de referencia elegido proporciona un diagnóstico suficientemente seguro en pacientes que padecen la enfermedad de interés, se puede determinar, por ejemplo, la eficacia (E) de los procedimientos de la invención para un valor de referencia dado utilizando la siguiente fórmula:

$$E = (TP/TO) \times 100;$$

en la que TP = verdaderos positivos y TO = número total de ensayos = TP + FP + FN + TN, en el que FP = falsos positivos; FN = falsos negativos y TN = verdaderos negativos. E tiene el siguiente intervalo de valores: $0 < E < 100$. Preferentemente, un valor de referencia sometido a ensayo proporciona un diagnóstico suficientemente seguro siempre que el valor de E sea de al menos aproximadamente 50, más preferentemente de al menos aproximadamente 60, más preferentemente de al menos aproximadamente 70, más preferentemente de al menos aproximadamente 80, más preferentemente de al menos aproximadamente 90, más preferentemente de al menos aproximadamente 95, más preferentemente de al menos aproximadamente 98.

Si los individuos están sanos o sufren un cierto estado fisiopatológico, el diagnóstico se realiza por procedimientos establecidos conocidos por el experto en la técnica. Los procedimientos difieren en cuanto al estado fisiopatológico individual.

Los algoritmos para establecer el diagnóstico deseado se exponen en la presente solicitud, en los pasajes referidos al respectivo modo de realización, al que se hace referencia.

Por consiguiente, la presente invención también comprende un procedimiento para determinar la cantidad umbral indicativa de un estado fisiológico y/o patológico y/o un cierto estado patológico, que comprende las etapas de determinar en grupos de pacientes apropiados las cantidades del marcador o marcadores apropiados, recopilar los datos y analizarlos mediante procedimientos estadísticos y establecer los valores umbral.

El término "aproximadamente", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a $\pm 20\%$, preferentemente $\pm 10\%$, preferentemente $\pm 5\%$ de una medida o valor dado.

Las cantidades de referencia para sFLT-1 que indican estados isquémicos, tal como se definen en la presente invención (cantidades umbral), son las siguientes: aproximadamente 92 pg/ml, más preferentemente alrededor de 109 pg/ml. Las cantidades de sFLT-1 por debajo de los valores citados anteriormente son indicativas de un estado no isquémico no asociado o que no conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible. Las cantidades de sFLT-1 iguales o mayores que las cantidades de referencia citadas anteriormente son indicativas de un estado isquémico asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible.

Una cantidad de referencia para HGF para estados isquémicos, tal como se define en la presente invención (cantidades umbral), es la siguiente: aproximadamente 0,62 pg/ml, más preferentemente aproximadamente 0,73 pg/ml. Las cantidades de HGF por debajo de los valores citados anteriormente son indicativas de un estado no isquémico no asociado o que no conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible. Las cantidades de HGF iguales o mayores que las cantidades de referencia citadas anteriormente son indicativas de un estado isquémico asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible.

Preferentemente, en el caso de que los valores determinados de sFLT-1 y, opcionalmente, de HGF no indiquen un estado isquémico, el individuo no requiere ningún examen adicional en cuanto a enfermedades cardíacas. En general, ese individuo puede ser enviado a casa.

En caso de que se diagnostique un estado isquémico, el individuo respectivo puede requerir un examen adicional en cuanto a enfermedades cardíacas o cardiovasculares. En un modo de realización preferido, por consiguiente, la presente invención comprende etapas de diagnóstico adicional del individuo en el que se han determinado las cantidades de sFLT-1 y/o HGF. Otros procedimientos de diagnóstico adecuados en el contexto de la presente invención incluyen ensayos de esfuerzo de diversos tipos, por ejemplo, ECG de esfuerzo físico, ecocardiografía de esfuerzo físico, tomografía computerizada de esfuerzo físico, exploración con talio de esfuerzo físico y angiografía (invasiva o virtual, por ejemplo, mediante tomografía computerizada en espiral).

Preferentemente, las cantidades de referencia para NT-proANP para deficiencia circulatoria, tal como se define en la presente invención (cantidades umbral), son las siguientes: aproximadamente 1320 pg/ml, más preferentemente aproximadamente 1674 pg/ml. Las cantidades de NT-proANP iguales o mayores que los valores citados

anteriormente son indicativas de deficiencia circulatoria.

Se debe observar que los valores de HGF y NT-proANP pueden cambiar debido a la existencia de enfermedades crónicas en un individuo, por ejemplo, insuficiencia cardíaca, insuficiencia o fallo renal y –, en el caso de HGF, – enfermedad hepática aguda o crónica. En el caso de una enfermedad crónica, los valores citados anteriormente pueden ser significativamente más elevados (por ejemplo 2, 5, 7, 8 o 10 veces mayores) que los valores citados anteriormente que son aplicables a individuos que no tienen una enfermedad crónica, en particular que no tienen una enfermedad cardíaca crónica, más allá del síndrome coronario agudo.

La expresión "al menos una cantidad de referencia" significa una o más de una cantidad de referencia, por ejemplo, dos cantidades de referencia.

En un modo de realización preferido de la presente invención, la determinación de los marcadores citados anteriormente se lleva a cabo en intervalos, con el fin de determinar la evaluación de la cantidad de marcador. Esto puede ser útil en la valoración de si tiene lugar o no un episodio agudo.

Se asume un episodio agudo si la cantidad determinada de al menos uno de los marcadores sFLT-1, HGF y/o NT-proANP es mayor que las cantidades de referencia citadas con carácter previo. Preferentemente, la desviación es de, al menos aproximadamente un 20 %, o al menos aproximadamente un 30 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 100 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 200 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 500 %, en particular al menos aproximadamente un 1000 %.

El intervalo de tiempo entre dos determinaciones de un marcador concreto(o los marcadores) es de al menos aproximadamente 15 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 90 minutos, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5 o al menos aproximadamente 6 horas. El experto en la técnica es consciente de que el intervalo de tiempo y la desviación pueden variar de acuerdo con el estado del individuo, la tendencia de la cantidad del marcador respectivo a modificar (es decir, el desarrollo de isquemia y/o deficiencia circulatoria), etc.

Otro modo de realización de la presente invención comprende la determinación de H-FABP y/o mioglobina, después de determinar una troponina cardíaca y/o medir un ECG, y antes de determinar las cantidades de sFLT-1 y, opcionalmente, de HGF en las etapas a) y b) del procedimiento de la presente invención, con el fin de determinar si el sujeto ha sufrido un infarto de miocardio, en particular un IMSEST.

Una cantidad de mioglobina y, opcionalmente, H-FABP, en un sujeto, tal como se define en la presente invención, que es superior a la cantidad de referencia para confirmar la existencia de IM será indicativa de una existencia reciente de IM en dicho sujeto. Una cantidad de mioglobina y, opcionalmente, H-FABP en un sujeto, tal como se define en la presente invención, que es inferior a la cantidad de referencia para descartar la existencia de IM será un indicador de que no se ha producido recientemente un IM; por lo que dicho sujeto podría sufrir una API. Se debe entender en el contexto de la presente invención que los sujetos, tal como se definen en la presente invención, cuya cantidad de mioglobina se encuentre entre los valores de referencia mencionados anteriormente (la cantidad de referencia para confirmar la existencia reciente de IM y la cantidad de referencia para descartar la existencia reciente de IM) pueden requerir un nuevo diagnóstico.

Preferentemente, esto también se puede hacer en sujetos para los que se determinan tanto la cantidad de mioglobina como de H-FABP, en los que ambas cantidades no se corresponden, por ejemplo, una cantidad es mayor (o menor) que la respectiva cantidad de referencia, mientras que la otra cantidad es no mayor (o menor) que la respectiva cantidad de referencia. Particularmente, una cantidad de mioglobina en un sujeto, tal como se define en la presente invención, superior a 77 ng/ml indica una existencia reciente de IM (confirmación), mientras que una cantidad inferior a 55 ng/ml indica que no se ha producido recientemente un IM (descarte). Además, la sensibilidad y especificidad del diagnóstico basado en la determinación de mioglobina en una muestra de un sujeto, tal como se define en la presente invención, es aún mayor cuando, además de la cantidad de mioglobina, se determina la cantidad de H-FABP en una muestra de dicho sujeto y se compara con al menos una cantidad de referencia para H-FABP. Particularmente, una cantidad de H-FABP en un sujeto, tal como se define en la presente invención, superior a 5700 pg/ml indica una existencia reciente de IM (confirmación), mientras que una cantidad inferior a 2500 pg/ml indica que no se ha producido recientemente un IM (descarte).

La mioglobina es una hemoproteína citoplasmática que consiste en una única cadena polipeptídica de 154 aminoácidos y que se expresa casi exclusivamente en miocitos cardíacos y fibras musculares esqueléticas oxidativas. Al igual que la hemoglobina, la mioglobina se une de forma reversible al oxígeno y, por lo tanto, puede facilitar el transporte de oxígeno desde los glóbulos rojos hasta las mitocondrias durante períodos de mayor actividad metabólica o servir como depósito de oxígeno en condiciones hipóxicas o anóxicas. Ordway G. y Garry D. J., Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. 2004. Journal of Experimental Biology 207, 3441-3446 (2004).

La proteína de unión a ácidos grasos de tipo cardíaco, denominada también en el presente documento H-FABP o proteína cardíaca de unión a ácidos grasos, es una pequeña proteína citosólica que funciona como el transportador principal de ácidos grasos de cadena larga en el cardiomiocito, desde la membrana celular a sus sitios intracelulares de metabolismo en las mitocondrias, donde entran en el ciclo del ácido cítrico. La H-FABP está presente en el miocardio y generalmente se cree que se libera rápidamente en la circulación en respuesta a una lesión miocárdica. Diversos estudios muestran que H-FABP es un marcador bioquímico temprano de infarto de miocardio, por ejemplo, Okamoto *et al.*, Clin Chem Lab Med 38(3):231-8 (2000) Human heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein (H-FABP) for the diagnosis of acute myocardial infarction. Clinical evaluation of H-FABP in comparison with myoglobin and creatine kinase isoenzyme MB; O'Donoghue *et al.*, Circulation, 114:550-557 (2006) Prognostic Utility of Heart-Type Fatty Acid Binding Protein in patients with acute coronary syndromes o Ruzgar *et al.*, Heart Vessels, 21:209-314 (2006) The use of human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic marker of myocardial necrosis in patients with acute coronary syndrome, and its comparison with troponin T and its creatine kinase-myocardial band).

La mioglobina y H-FABP, tal como se usan en la presente invención, abarcan también respectivamente variantes de polipéptidos de mioglobina y H-FABP. Dichas variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que los polipéptidos específicos de mioglobina y H-FABP. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si se pueden detectar en los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, mediante ensayos ELISA que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen respectivamente de forma específica dichos polipéptidos de mioglobina y H-FABP. Además, se debe entender que una variante, tal como se hace referencia de acuerdo con la presente invención, tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, eliminación y/o adición de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante sigue siendo, preferentemente, al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 92 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica, respectivamente, a la secuencia amino de los dichos polipéptidos específicos de mioglobina y H-FABP. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante algoritmos que se conocen bien en la técnica. Preferentemente, el grado de identidad se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, en la que el fragmento de la secuencia de aminoácidos de la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácidos idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Se puede llevar a cabo la alineación óptima de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. APL. Math. 2:482 (1981)), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443 (1970)), mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988)), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Genética de Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para comparación, GAP y BESTFIT se emplean preferentemente para determinar su alineación óptima y, por lo tanto, el grado de identidad. Preferentemente, se usan los valores por defecto de 5,00 para el peso de huecos y de 0,30 para la longitud del peso de huecos. Las variantes a las que se ha hecho referencia anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de la especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento incluyen fragmentos de los polipéptidos específicos de mioglobina y H-FABP o los tipos de variantes antes mencionados, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales que se han mencionado con anterioridad. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de los polipéptidos de mioglobina y H-FABP. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones pos-traduccionales tales como fosforilación o miristilación. Preferentemente, la propiedad biológica de la mioglobina es la capacidad de unirse de forma reversible a oxígeno. Preferentemente, la propiedad biológica de H-FABP es el transporte de ácidos grasos de cadena larga desde la membrana celular hasta sus sitios intracelulares de metabolismo en las mitocondrias, donde entran en el ciclo del ácido cítrico.

Se debe entender que, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención descrito en el presente documento anteriormente y a continuación, se pueden usar los anticuerpos para sFLT-1 y, preferentemente además, HGF o medios para la determinación de los mismos para la preparación de una composición diagnóstica destinada a diagnosticar la isquemia y la evolución de la gravedad de la misma en un sujeto que muestra los signos y síntomas de síndrome coronario agudo y que tiene una cantidad de una troponina cardíaca inferior a la cantidad considerada como indicativa de un infarto de miocardio.

Por consiguiente, la presente invención se refiere además a un procedimiento para identificar un sujeto susceptible de intervención cardíaca, en el que el sujeto muestra signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio por tener una cantidad de troponina T determinada en una muestra del sujeto menor de 0,1 ng/ml, que comprende

(a) determinar la cantidad de sFLT-1 o una variante de la misma en una muestra de dicho sujeto, y

(b) comparar la cantidad de sFLT-1 o una variante de la misma determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia,

(c) diagnosticar el estado isquémico basándose en la información obtenida en la etapa b), preferentemente en las etapas a) y b), e

(d) identificar el sujeto, basándose en la información obtenida en la etapa c), en el que una cantidad de sFLT-1 por debajo de la cantidad de referencia es indicativa de un estado no isquémico no asociado o que no conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible, y una cantidad de sFLT-1 igual a o mayor que la cantidad de referencia es indicativa de un estado isquémico asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible, y en caso de que el valor de sFLT-1 no indique un estado isquémico, el individuo no requiere ningún examen adicional en cuanto a enfermedades cardíacas, y en caso de que se diagnostique una enfermedad isquémica por la cantidad de sFLT-1, el individuo respectivo se somete a una intervención cardíaca.

Además, la presente invención se refiere también a un procedimiento para recomendar o decidir sobre una posible intervención cardíaca o iniciar una posible intervención cardíaca en un sujeto que muestra los signos y síntomas de síndrome coronario agudo (SCA) pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio, basándose en la comparación de las cantidades de tirosina quinasa-1 similar a fms soluble (sFLT-1) o de una variante del mismo en una muestra de dicho sujeto, con respecto a al menos una cantidad de referencia. El procedimiento puede comprender al menos una de las siguientes etapas: a) determinar la cantidad de sFLT-1 o una variante de la misma en una muestra de dicho sujeto, b) comparar la cantidad de sFLT-1 o una variante de la misma determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, c) recomendar o decidir sobre el inicio de una intervención cardíaca, iniciar la intervención cardíaca o abstenerse de la intervención cardíaca, basándose en la información obtenida en la etapa c).

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento para recomendar o decidir sobre una posible intervención cardíaca o iniciar una posible intervención cardíaca en un sujeto que muestra signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio por tener una cantidad de troponina T determinada en una muestra del sujeto menor de 0,1 ng/ml, que comprende

(a) determinar la cantidad de sFLT-1 o una variante de la misma en una muestra de dicho sujeto, y

(b) comparar la cantidad de sFLT-1 o una variante de la misma determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia,

(c) diagnosticar el estado isquémico basándose en la información obtenida en la etapa b), preferentemente en las etapas a) y b), y

(d) recomendar o decidir sobre el inicio de una intervención cardíaca, iniciar la intervención cardíaca o abstenerse de la intervención cardíaca, basándose en la información obtenida en la etapa c), en el que una cantidad de sFLT-1 por debajo de la cantidad de referencia es indicativa de un estado no isquémico no asociado o que no conduce a una disfunción cardíaca reversible o a una lesión cardíaca no reversible, y una cantidad de sFLT-1 igual a o mayor que la cantidad de referencia es indicativa de un estado isquémico asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible, y en caso de que el valor de sFLT-1 no indique un estado isquémico, el individuo no requiere ningún examen adicional en cuanto a enfermedades cardíacas, y en caso de que se diagnostique una enfermedad isquémica por la cantidad de sFLT-1, el individuo respectivo se somete a una intervención cardíaca.

En un modo de realización del procedimiento anteriormente mencionado de la presente invención, se determina además la cantidad de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o una variante del mismo en una etapa aa) adicional en una muestra de dicho sujeto y se compara con al menos una cantidad de referencia para HGF en la etapa bb). En consecuencia, en la etapa c), el estado isquémico se diagnostica basándose en las cantidades determinadas de sFLT-1 y de HGF o una variante de los mismos y en la comparación de la cantidad de sFLT-1 con al menos una cantidad de referencia para sFLT-1 y la comparación de la cantidad de HGF con al menos una cantidad de referencia para HGF. Preferentemente, primero se determina la cantidad de sFLT-1 y después la cantidad de HGF, sin embargo, también se contempla que las cantidades de sFLT-1 y HGF se determinan en cualquier orden, es decir, simultáneamente, o primero sFLT-1 y luego HGF, o primero HGF y luego sFLT-1.

El estado isquémico del individuo se determina después de la determinación de troponina, determinando las cantidades de sFLT-1 y/o HGF u, opcionalmente, del marcador adicional. Por consiguiente, la cantidad de troponina cardíaca se determina antes de la determinación de sFLT-1 y/o HGF; y la cantidad de sFLT-1 y/o HGF sólo se determinará en el caso de que la cantidad de troponina sea inferior a la cantidad que se reconoce generalmente en la técnica como indicativa de un infarto de miocardio (IM), en particular de un IMSEST. La cantidad de troponina

cardíaca puede incluso ser cero, es decir, no detectable con los ensayos actualmente disponibles.

En otro modo de realización preferido, un ECG del sujeto respectivo se determina simultáneamente a la determinación de sFLT-1 y/o a la determinación de HGF; pudiendo preceder la medida de ECG a la determinación de sFLT-1 y/o a la determinación de HGF. El estado isquémico del individuo, por lo tanto, se determina preferentemente de forma simultánea o después del registro de un ECG, determinando las cantidades de sFLT-1 y, opcionalmente, de HGF. Por consiguiente, si el registro del ECG se lleva a cabo antes de la determinación de sFLT-1 y/o HGF, la determinación de las cantidades de sFLT-1 y/o HGF se puede aplazar hasta que se registre el ECG. Preferentemente, la cantidad de sFLT-1 y/o HGF sólo se determinará en el caso de que el ECG del sujeto no muestre una elevación de ST. Preferentemente, en el caso de que ECG muestre una elevación de ST, se considerará que el sujeto ha sufrido un IMEST, lo que significa que en general no se llevarán a cabo los procedimientos de la presente invención— dirigidos al diagnóstico de un estado isquémico anterior al IM —.

Los modos de realización preferidos antes mencionados del procedimiento de la presente invención se pueden llevar a cabo de manera que sólo se determine el nivel de una troponina cardíaca o se registre un ECG; o el procedimiento de la presente invención incluya tanto la determinación del nivel de una troponina cardíaca como el registro de un ECG.

Las cantidades de referencia de sFLT-1 y HGF son las citadas previamente para indicar un estado isquémico en un individuo.

Las cantidades de referencia para sFLT-1 que indican estados isquémicos, tal como se definen en la presente invención (cantidades umbral), son las siguientes: aproximadamente 92 pg/ml, más preferentemente aproximadamente 109 pg/ml. Las cantidades de sFLT-1 por debajo de los valores citados anteriormente son indicativas de un estado no isquémico no asociado a o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible. Las cantidades de sFLT-1 iguales o mayores que las cantidades de referencia citadas anteriormente son indicativas de un estado isquémico asociado a o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible.

Una cantidad de referencia para HGF para estados isquémicos, tal como se define en la presente invención (cantidades umbral), son las siguientes: aproximadamente 0,62 pg/ml, más preferentemente aproximadamente 0,73 pg/ml. Las cantidades de HGF por debajo de los valores citados anteriormente son indicativas de un estado no isquémico no asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible. Las cantidades de HGF iguales o mayores que las cantidades de referencia citadas anteriormente son indicativas de un estado isquémico asociado a o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible.

En el caso de que los valores de sFLT-1 y, opcionalmente, de HGF no indiquen un estado isquémico, el individuo no requiere ningún examen adicional en cuanto a enfermedades cardíacas. En general, el individuo puede ser enviado a casa.

En el caso de que se diagnostique una enfermedad isquémica por las cantidades de sFLT-1 y opcionalmente HGF, el individuo respectivo, en un modo de realización preferido de la presente invención, recibirá un régimen de tratamiento como se especifica a continuación, también denominado "intervención cardíaca".

En el caso de que se diagnostique una enfermedad isquémica por las cantidades de sFLT-1 y opcionalmente HGF, el individuo respectivo puede requerir un examen adicional en cuanto a enfermedades cardíacas o cardiovasculares. En un modo de realización preferido, estos procedimientos de diagnóstico adicionales en el contexto de la presente invención incluyen ensayos de esfuerzo de diversos tipos, por ejemplo, p. ej. esfuerzo físico, ecocardiografía de esfuerzo físico, tomografía computarizada de esfuerzo físico, exploración con talio de esfuerzo físico y angiografía (invasiva o virtual, por ejemplo, mediante tomografía computarizada en espiral). Dependiendo de los resultados del examen adicional, el individuo respectivo recibirá un régimen de tratamiento tal como se especifica a continuación, también denominado "intervención cardíaca".

En un modo de realización preferido adicional de la presente invención, se determina la cantidad de NT-proANP con el fin de diagnosticar una posible deficiencia circulatoria del sujeto.

Las cantidades de referencia para el péptido de tipo ANP, en particular NT-proANP, son las citadas previamente en relación con la deficiencia circulatoria. Las cantidades de referencia para NT-proANP para deficiencia circulatoria, tal como se define en la presente invención (cantidades umbral), son las siguientes: aproximadamente 1320 pg/ml, más preferentemente aproximadamente 1674 pg/ml. Las cantidades de NT-proANP iguales o mayores que los valores citados anteriormente son indicativas de deficiencia circulatoria.

Otro modo de realización de la presente invención comprende la determinación de H-FABP y/o mioglobina, después de determinar una troponina cardíaca y/o registrar un ECG, y antes de determinar los niveles de sFLT-1 y, opcionalmente, de HGF en las etapas a) y b) del procedimiento de la presente invención, con el fin de determinar si

el sujeto ha sufrido ya un infarto de miocardio, en particular un IMSEST.

Una cantidad de mioglobina y, opcionalmente, H-FABP, en un sujeto, tal como se define en la presente invención, que es superior a la cantidad de referencia para confirmar la existencia de IM será indicativa de una existencia reciente de IM en dicho sujeto. Una cantidad de mioglobina y, opcionalmente, H-FABP en un sujeto, tal como se define en la presente invención, que es inferior a la cantidad de referencia para descartar la existencia de IM será un indicador de que no se ha producido recientemente un IM; por lo que dicho sujeto podría sufrir una API. Se debe entender en el contexto de la presente invención que los sujetos, tal como se definen en la presente invención, cuya cantidad de mioglobina se encuentre entre los valores de referencia mencionados anteriormente (la cantidad de referencia para confirmar la existencia reciente de IM y la cantidad de referencia para descartar la existencia reciente de IM) pueden requerir un nuevo diagnóstico. Preferentemente, esto también se puede hacer en sujetos para los que se determinan tanto la cantidad de mioglobina como de H-FABP, en los que ambas cantidades no se corresponden, por ejemplo, una cantidad es mayor (o menor) que la cantidad de referencia respectiva, mientras que la otra cantidad no es mayor (o menor) que la cantidad de referencia respectiva.

Gracias al procedimiento anteriormente mencionado, se puede realizar fácilmente una estratificación de riesgo/éxito antes de someter a un paciente a una intervención cardíaca. En caso de que el paciente resulte no ser susceptible de una intervención cardíaca, dicho tratamiento peligroso, lento y/o costoso se puede evitar. De esta forma, además de evitar que un sujeto sufra los efectos secundarios adversos y graves que acompañan a una intervención cardíaca, el procedimiento de la presente invención será beneficioso para el sistema de salud en el que se ahorrarán recursos.

Se debe entender, en el contexto del procedimiento anteriormente mencionado de la presente invención, que un sujeto al que se le ha diagnosticado que no ha sufrido IM, pero que presenta un estado isquémico o un desarrollo de su estado isquémico que se supone que dará lugar a una disfunción cardíaca reversible o lesión cardíaca no reversible, es susceptible de intervención cardíaca.

El término "identificación", tal como se usa en el presente documento, significa valorar si un sujeto es susceptible o no de una intervención cardíaca. Tal como comprenderán los expertos en la técnica, tal valoración no suele pretender ser correcta para todos (es decir, 100 %) los sujetos a identificar. El término, sin embargo, requiere que se pueda identificar una parte estadísticamente significativa de sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). El experto en la técnica puede determinar sin mayor problema si una parte estadísticamente significativa utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más preferentemente, el procedimiento de la presente invención puede identificar apropiadamente al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de los sujetos de una población.

La expresión "intervención cardíaca" abarca los regímenes de tratamiento que el experto en la técnica considere adecuados. La expresión comprende intervenciones quirúrgicas, microcirugía, otras terapias invasivas que afectan al sistema cardiovascular y, preferentemente, al corazón, así como procedimientos conservadores (no quirúrgicos) de tratamiento. Los procedimientos conservadores se conocen en la técnica e incluyen procedimientos no farmacológicos y procedimientos farmacológicos. Los procedimientos farmacológicos se refieren a la administración de productos farmacéuticos. Los fármacos apropiados incluyen inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA), en particular Enalapril, Captopril, Ramipril, Trandolapril; antagonistas del receptor de angiotensina y antagonistas de aldosterona, en particular Losartán, Valsartán, Irbesartán, Candesartán, Telmisartán, Eprosartán, Espironolactona; estatinas, en particular Atorvastatina, Fluvastatina, Lovastatina, Pravastatina, Rosuvastatina, Simvastatina; betabloqueantes, tales como propranolol, metoprolol, bisoprolol, carvedilol, bucindolol, nebivolol; nitratos; agonistas adrenérgicos, tales como dobutamina, dopamina, epinefrina, isoprotenerol, norepinefrina, fenilefrina; agentes antiplaquetarios, en particular aspirina y clopidogrel; anticoagulantes, en particular warfarina, heparina, inhibidores de trombina, fármacos trombolíticos. Preferentemente, las intervenciones cardíacas, tal como se utilizan en el presente documento, son regímenes de tratamiento que tienen como objetivo restablecer el suministro de oxígeno adecuado del corazón. Esto se consigue, preferentemente, restableciendo el flujo sanguíneo a través de los vasos sanguíneos que soportan el corazón, es decir, los vasos sanguíneos coronarios. Esos vasos sanguíneos pueden presentar deficiencias debido, por ejemplo, a placas trombóticas o ateroscleróticas. Por consiguiente, las intervenciones cardíacas comprenderán, preferentemente, una destrucción y/o retirada de dichas placas y una restauración del vaso, si es necesario. Las intervenciones cardíacas preferentes de acuerdo con la presente invención se seleccionan entre el grupo que consiste en angioplastia coronaria percutánea, angioplastia coronaria transluminal percutánea con globo, angioplastia con láser, implantación de endoprótesis vascular coronaria, implantación de derivación o técnicas intraluminales con el objetivo de restablecer el flujo sanguíneo, la permeabilidad del vaso, estabilizar la placa y/o reducir la carga de trombo intracoronario.

En el caso de que un individuo sufra una deficiencia circulatoria (como se indica por niveles elevados de un péptido natriurético de tipo ANP), la deficiencia circulatoria en general remite cuando se elimina la causa subyacente de la isquemia.

- 5 Además, la presente divulgación describe un estuche o dispositivo para llevar a cabo los procedimientos de la presente invención que comprende medios para determinar la cantidad de sFLT-1 y, opcionalmente, HGF en una muestra de un sujeto y medios para comparar dicha cantidad con al menos una cantidad de referencia.

10 El término "estuche", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una colección de los medios antes mencionados, preferentemente, proporcionados por separado o en un único recipiente. El estuche puede además comprender medios para determinar la cantidad de una troponina cardíaca. Opcionalmente, el estuche puede comprender adicionalmente un manual del usuario para interpretar los resultados de cualquier medición con respecto al diagnóstico del estado isquémico en un sujeto tal como se define en la presente invención. En particular, dicho manual puede incluir información sobre qué cantidades determinadas corresponden a qué tipo de diagnóstico.

15 Esto se describe en detalle en otra parte de la presente memoria descriptiva. Adicionalmente, dicho manual de usuario puede proporcionar instrucciones sobre el uso correcto de los componentes del estuche para determinar la cantidad de los biomarcadores respectivos.

20 El término "dispositivo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un sistema de medios que comprenden al menos los medios mencionados anteriormente conectados operativamente entre sí para permitir el diagnóstico del estado isquémico o la identificación de un sujeto susceptible de intervención cardíaca. La invención del dispositivo puede además comprender medios para determinar la cantidad de una troponina cardíaca. Los medios preferentes para determinar la cantidad de sFLT-1 y HGF y medios para llevar a cabo la comparación se divulgan anteriormente en relación con el procedimiento de la invención. La forma de conectar los medios de una manera operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplican medios para determinar automáticamente la cantidad de los péptidos, los datos obtenidos mediante dichos medios de funcionamiento automático se pueden procesar, por ejemplo, mediante un programa informático para obtener los resultados deseados. Preferentemente, en tal caso los medios están integrados en un único dispositivo. Dicho dispositivo puede, por consiguiente, 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 se usan medios tales como tiras reactivas para determinar la cantidad de los péptidos o polipéptidos, los medios para comparación pueden comprender tiras de control o tablas que asignan la cantidad determinada a una cantidad de referencia. Las tiras reactivas se acoplan, preferentemente, a un ligando que se une específicamente a los péptidos o polipéptidos a los que se hace referencia en el presente documento. La tira o dispositivo, preferentemente, comprende medios para detectar la unión de dichos péptidos o polipéptidos a dicho ligando. Los medios de detección preferidos se divulgan en relación con modos de realización relacionados con el procedimiento de la invención anterior. En tal caso, los medios están operativamente unidos de forma que el usuario del sistema reúne el resultado de la determinación de la cantidad y el valor diagnóstico o pronóstico de la misma gracias a las instrucciones e interpretaciones proporcionadas en un manual. Los medios pueden aparecer como dispositivos separados en tal modo de realización y, preferentemente, se empaquetan juntos en forma de estuche. El experto en la técnica apreciará el modo de unión de los medios sin mayor problema. Dispositivos preferentes son aquellos que se pueden aplicar sin el conocimiento particular de un médico especialista, por ejemplo, tiras reactivas o dispositivos electrónicos que simplemente requieran la carga de una muestra. Los resultados se pueden proporcionar como resultado de datos bruto que requiere interpretación por parte del médico.

45 Preferentemente, la salida del dispositivo está, sin embargo, procesada, es decir, evaluada, de forma que no se requiera la interpretación de los datos en bruto por parte del médico. Otros dispositivos preferidos comprenden las unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo, biosensores, matrices, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen específicamente los sFLT-1 o HGF, dispositivos de resonancia de plasmón superficial, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masa, etc.) o las unidades/dispositivos de evaluación mencionados anteriormente de acuerdo con el procedimiento de la invención.

50

La presente divulgación también describe el uso de un estuche o dispositivo para determinar la cantidad de sFLT-1 y, opcionalmente, HGF en una muestra de un sujeto de sFLT-1 y, opcionalmente, HGF y/o medios para determinar la cantidad de sFLT-1 y, opcionalmente, HGF y/o medios para comparar la cantidad de sFLT-1 y, opcionalmente, HGF con al menos una cantidad de referencia para: diagnosticar el estado isquémico en un sujeto que muestra los signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio; y/o monitorizar la gravedad del estado isquémico en dicho sujeto; y/o estratificar/valorar el riesgo de que dicho sujeto sufra de un infarto de miocardio; y/o identificar a dicho sujeto que es susceptible de intervención cardíaca; y/o decidir sobre la posible intervención cardíaca de dicho sujeto.

60

La presente divulgación también describe el uso de al menos un anticuerpo contra sFLT-1 y, opcionalmente, HGF y/o medios para determinar la cantidad de sFLT-1 y, opcionalmente, HGF y/o medios para comparar la cantidad de sFLT-1 y, opcionalmente, HGF con al menos una cantidad de referencia para la fabricación de una composición diagnóstica para: diagnosticar el estado isquémico en un sujeto que muestra los signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio; y/o monitorizar la gravedad del estado isquémico en dicho sujeto; y/o estratificar/valorar el riesgo de que dicho sujeto sufra de un

65

infarto de miocardio; y/o identificar a dicho sujeto que es susceptible de intervención cardíaca; y/o decidir sobre la posible intervención cardíaca de dicho sujeto.

Los siguientes Ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención.

Ejemplos

En los ejemplos siguientes, se usaron los siguientes ensayos para la determinación de las cantidades de los respectivos péptidos:

Se determinó la troponina T con la prueba de inmunoensayo de troponina T de alta sensibilidad (hs) de Roche Diagnostics, utilizando el analizador ELECSYS 2010. 1ª incubación: 50 µl de muestra, un anticuerpo monoclonal sometido a tratamiento con biotina anti-troponina T cardíaca y un anticuerpo monoclonal anti-troponina T cardíaca marcado con un complejo de rutenio ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) reaccionan para formar un complejo tipo intercalado. 2ª incubación: Tras la adición de micropartículas revestidas con estreptavidina, el complejo se une a la fase sólida a través de la interacción de biotina y estreptavidina. La mezcla de reacción se aspira a la celda de medición donde las micropartículas se capturan magnéticamente sobre la superficie del electrodo. Las sustancias no unidas se eliminan. La emisión quimioluminiscente se induce mediante la aplicación de una tensión al electrodo y se mide mediante un fotomultiplicador. Los resultados se determinan a través de una curva de calibración.

El HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) se sometió a ensayo mediante inmunoensayo ligado a enzima (RD Systems, Minneapolis, ref. DHG00) usando un anticuerpo monoclonal específico para HGF y una microplaca previamente revestida. Se toman los patrones y las muestras haciendo uso de pipetas y se colocan en los pocillos y cualquier HGF presente se une por medio del anticuerpo inmovilizado. Después de eliminar las sustancias no unidas mediante lavado, se añade a los pocillos un anticuerpo policlonal ligado a enzima específico para HGF. Después de un lavado para eliminar cualquier reactivo anticuerpo-enzima no unido, se añade una solución de sustrato a los pocillos y el color se desarrolla en proporción a la cantidad de HGF unida en la etapa inicial. Se detiene el desarrollo del color y se mide la intensidad del color.

El NT-proANP se determinó con el ensayo ELISA de proANP (B1-20892) obtenido en Biomedica, Viena, Austria. Este ensayo de intercalado comprende un anticuerpo policlonal de oveja específico para NT-proANP unido a una tira de micro-valoración. La muestra se añade a la tira de micro-valoración para que el proANP se pueda unir al anticuerpo. Después de la unión del proANP al primer anticuerpo, se añade al recipiente un segundo anticuerpo específico de proANP. Este segundo anticuerpo se conjuga con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de la incubación, el anticuerpo conjugado con enzima no unido se elimina lavando la tira de micro-valoración. Finalmente, se añade tetrametilbencidina (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 de la velocidad inicial de conversión de TMB es una medida para la cantidad de NT-proANP en la muestra.

El sFLT-1 se determinó con un inmunoensayo sFLT-1 para ser utilizado con los analizadores Elecsys y COBAS de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania. El ensayo se basa en el principio de intercalado y comprende dos anticuerpos monoclonales de la especie sFLT-1. El primero de ellos está sometido a tratamiento con biotina y el segundo está marcado con un complejo tris(2,2'-bipiridil)rutenio(TT). En una primera etapa de incubación, ambos anticuerpos se incuban con la muestra. Se forma un complejo intercalado que comprende sFLT-1 y los dos anticuerpos diferentes. En una etapa posterior de incubación se añaden perlas revestidas con estreptavidina a este complejo. Las perlas se unen a los complejos intercalados. La mezcla de reacción se aspira a continuación a una celda de medición en la que las perlas se capturan magnéticamente sobre la superficie de un electrodo. La aplicación de un voltaje induce entonces una emisión quimioluminiscente del complejo de rutenio que se mide mediante un fotomultiplicador. La cantidad de luz depende de la cantidad de complejos intercalados presentes en el electrodo.

Los ensayos mencionados también se emplean preferentemente en el contexto general de la presente invención para la determinación de los respectivos péptidos.

Ejemplo 1. Determinación de los valores de referencia

149 personas, con una edad media de 42,8 años se sometieron a ensayos para la presencia de sFLT-1, pro ANP y HGF; tanto en el momento del ensayo como en las 2 semanas anteriores, estaban asintomáticas, específicamente no presentaban dolor torácico, y tampoco había evidencias de disfunción cardíaca como indicaron los ensayos de NT-proBNP.

Resultados (véase Tabla 1):

Tabla 1:

	NT-pro ANP	sFLT-1	HGF
Mediana	780 pg/ml	52 pg/ml	0,16 pg/ml
25 %	610 pg/ml	42 pg/ml	0,03 pg/ml
75 %	850 pg/ml	71 pg/ml	0,35 pg/ml
95 %	1320 pg/ml	92 pg/ml	0,62 pg/ml
99 %	1674 pg/ml	109 pg/ml	0,73 pg/ml

En el contexto de la presente invención, se considera preferentemente el percentil 95 como un valor de referencia apropiado: Se considera que los individuos que muestran valores de marcador por encima del mismo sufren un estado isquémico. Más preferentemente, el percentil 99 define el valor de referencia indicativo de un estado isquémico. Con respecto a NT-proANP, se considera asimismo preferentemente el percentil 95 y más preferentemente el percentil 99 como el valor de referencia que define qué valores son indicativos de una deficiencia circulatoria.

Ejemplo 2: sFLT-1, HGF y NT-proANP en pacientes con dolor torácico y sospecha de síndrome coronario agudo

Se incluyeron en el estudio un total de 33 pacientes (edad media de 62 años, intervalo de 47 – 72 años, 21 varones, 12 mujeres) que presentaban signos y síntomas de síndrome coronario agudo en urgencias dentro de las 2 horas posteriores a la aparición de los síntomas. 14/33 tenían un historial familiar de enfermedad arterial crónica y 21/33 tenían una enfermedad establecida de las arterias coronarias, 5/33 informaron sobre un infarto de miocardio previo. Todos los pacientes tenían una función renal normal determinada por creatinina sérica, los niveles de H-FABP y mioglobina estuvieron por debajo del valor de corte para infarto de miocardio (IM) futuro (véase documentos WO 2008/145689, WO 2009/033831). Los pacientes incluidos en el análisis fueron los pacientes que no cumplían los criterios de IMSEST al final del seguimiento. Todos los pacientes cumplían los criterios del Grupo de Trabajo Conjunto ESC/ACCF/AHA/WHF para la Redefinición del Infarto de Miocardio (The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee: Universal definition of myocardial infarction, European Heart Journal (2007), loc. cit.), en cuanto a que todas las muestras en las que se midió la cantidad de troponina estuvieron por debajo del percentil 99 (0,14 ng/ml, media de 0,079 ng/ml) en todos los momentos temporales medidos y durante el intervalo de tiempo recomendado (en la presentación y (al menos) 6-9 horas después de la presentación).

Ninguno de los pacientes presentó aumento en los niveles de mioglobina, H-FABP o NT-proBNP (más/menos un 20 %) durante el período de observación. Por lo tanto, ninguno de los pacientes seleccionados para el presente estudio mostró un infarto de miocardio de acuerdo con las directrices actuales. Se observaron cambios en el nivel de sFLT-1/HGF en 27 pacientes y no se produjeron cambios en 6 pacientes, lo que indica que 27 pacientes presentaron evidencia bioquímica de isquemia y 6 pacientes carecieron de dichos signos. Se observaron cambios agudos en la función circulatoria en 11 pacientes, tal como se indica en los cambios en las concentraciones de NT-proANP. Los cambios agudos en la función circulatoria sólo se observaron en pacientes con evidencia analítica de isquemia.

Las muestras de suero se extrajeron por punción venosa, se centrifugaron en un plazo de 30 minutos y el sobrenadante del suero se mantuvo a –20 °C hasta su análisis.

Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La **Tabla 2** ilustra los cambios observados en sFLT-1 y/o HGF en 33 pacientes que presentan síndrome coronario agudo y sin desarrollo de infarto de miocardio.

La **Tabla 3** presenta los resultados individuales de pacientes seleccionados.

El paciente n.º 14 presentó evidencia bioquímica de isquemia, tal como viene indicado por una concentración aumentada de HGF y sFLT-1. En el transcurso de la observación, los niveles de sFLT-1 y HGF disminuyeron indicando una reversión de la evidencia bioquímica de isquemia que fue compatible con el alivio del dolor en este paciente sin medicación adicional (el paciente recibió nitroglicerina en pulverización por parte del médico de emergencias antes de presentarse en urgencias). Los niveles de pro ANP aumentaron ligeramente durante el período de observación, indicando que el episodio no había provocado cambios funcionales agudos significativos.

El paciente n.º 21 presentó signos y síntomas de SCA que volvieron a aparecer durante aproximadamente 5 minutos durante la visita en urgencias, mientras que el nivel de sFLT-1 aumentó ligeramente en la presentación, luego disminuyó y nuevamente aumentó, lo que resultó compatible con el dolor torácico observado durante el período de

observación. El dolor torácico inicial se asoció a cambios funcionales significativos, tal como viene indicado por un aumento significativo de los niveles de pro ANP poco después de la presentación. Esto fue compatible con una taquicardia ventricular observada (durante aproximadamente 30 segundos) en la ambulancia durante el traslado a urgencias.

El paciente n.º 40 presentó un episodio grave de isquemia confirmado por un incremento de los niveles de sFLT-1 y HGF con respecto a las cantidades de referencia definidas anteriormente; el paciente también mostró evidencias de cambios funcionales agudos, tal como viene indicado por un aumento significativo de los niveles de pro ANP una hora después de la presentación en urgencias. El uso de nitroglicerina en pulverización hizo desaparecer los síntomas de isquemia, así como la evidencia bioquímica de isquemia, por lo que los pacientes no desarrollaron infarto de miocardio.

El paciente n.º 42 fue admitido en urgencias con signos y síntomas de SCA; en el momento de la presentación, se observaron niveles significativamente elevados de sFLT-1 y HGF cuando se compararon con las cantidades de referencia definidas con anterioridad. Durante el seguimiento, los niveles de sFLT-1 y HGF disminuyeron lentamente, indicando isquemia grave inicial seguida de isquemia moderada que finalmente remitió. Se observó un ligero aumento de los niveles de pro ANP en la presentación y a las 24 h de seguimiento.

El paciente n.º 43 presentó signos y síntomas de SCA, que ya no estaban presentes cuando acudió a urgencias. Tenía niveles ligeramente elevados de sFLT-1 y HGF en relación con las cantidades de referencia definidas anteriormente, pero sin signos bioquímicos definidos de isquemia. Sus niveles de pro ANP no cambiaron durante el período total de observación. Basándose en la presentación clínica, finalmente se consideró que sufría síntomas no cardíacos, aunque se sabía que este paciente presentaba una enfermedad conocida de las arterias coronarias.

El paciente n.º 52 se presentó con SCA todavía presente en el momento de su presentación en urgencias. Fue tratado con nitroglicerina en pulverización y los síntomas desaparecieron. Durante la monitorización por ECG en urgencias, no se reconoció una arritmia significativa. La evidencia bioquímica de isquemia fue reversible, como lo demuestran las mediciones de sFLT-1 y HGF (los niveles de marcador aumentaron o disminuyeron, dependiendo del grado de isquemia). Se observaron ligeros cambios en los niveles de pro ANP durante la presentación en urgencias.

Los pacientes no desarrollaron infarto de miocardio.

Tabla 2:

N.º de paciente	Intervalo de tiempo (horas) después de la presentación	TnT (ng/ml)	HGF (pg/ml)	sFLT-1 (pg/ml)	NT-proANP (pg/ml)
14	0	0,0052	37,44	6631,95	4115,65
	1	0,0059	11,49	1668,09	4500,56
	2	0,0061	7,11	680,64	5151,40
	3	0,0058	7,93	717,12	5900,91
21	0	0,0049	1,89	431,66	<635
	1	0,0058	0,88	83,96	36963,76
	2	0,0042	0,70	431,00	45324,67
	3	0,0061	1,01	71,90	31076,23
	4	0,0057	1,16	17,10	25059,18
40	2	0,0112	55,34	359,75	<635

	3	0,0109		6425,50	6463,30
	4	0,0118	35,87	4315,16	6168,70
	5	0,0121	23,94	2715,41	5628,02
	<24 h p1	0,0109	0,77	182,78	7271,33
42	0	0,0121	21,50	9041,81	23094,70
	1	0,0139	11,96	4677,82	18533,80
	2	0,0132	8,69	1561,08	15476,21
	3	0,0119	7,04	1150,10	16769,73
	4	0,0108	8,36	1203,32	17845,08
	5	0,0112	8,45	1083,85	16433,54
	6	0,0098	7,87	1070,64	16842,25
	<24 h pl	0,0101	1,31	176,77	25900,17
43	0	0,0046	0,80	128,98	16689,61
	2	0,0042	0,63	117,12	15619,63
	3	0,0039	0,67	117,12	19013,81
	4	0,0041	0,65	117,12	18435,65
52	0	0,0098	17,08	45,02	15668,18
	2	0,0106	16,42	2329,96	24974,49
	3	0,0111	9,06	1315,80	21617,98
	4	0,0131	7,28	941,52	19231,37
	5	0,0129	7,05	816,68	15239,65

Tabla 3: Número de pacientes que muestran cambios en sFLT-1 y/o NT-proANP de al menos un 20 % con respecto a los valores basales

	Cambio en sFLT-1	Cambio en NT-proANP
sí	27	6
no	6	0

5

Ejemplo comparativo 1: sFLT-1, HGF y NT-proANP en pacientes con IM

22 pacientes que desarrollaron infarto de miocardio mostraron concentraciones de troponina T que no cumplían los criterios del Grupo de Trabajo Conjunto ESC/ACCF/AHA/WHF para la Redefinición del Infarto de Miocardio (The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee: Universal definition of myocardial infarction, European Heart Journal (2007), loc. cit.), aunque 4 pacientes (incluido el paciente n.º 2, Tabla 4) mostraron una concentración de troponina T por encima del percentil del 99 % de una población de referencia normal. La población de referencia que desarrolla IM simplemente ilustra que todos los pacientes que desarrollaron IM presentaron niveles mayores de sFLT-1 y HGF en comparación con la población de referencia sana, tal como se indica en la Tabla 1 (y por lo tanto sirve como "control positivo") en el presente estudio.

15

En todos los pacientes, los niveles de sFLT-1, HGF y pro ANP se incrementaron al comienzo del estudio en comparación con las cantidades de referencia definidas anteriormente (dos de estos pacientes se muestran en la Tabla 4). 6 pacientes recibieron un diagnóstico de IMEST (es decir, cumplieron los criterios de IMSEST de acuerdo con el Grupo de Trabajo Conjunto ESC/ACCF/AHA/WHF para la Redefinición del Infarto de Miocardio (The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee: Universal definition of myocardial infarction, European Heart Journal (2007), loc. cit.) al final del seguimiento). El resto de los pacientes presentaron IMSEST de acuerdo con el Grupo de Trabajo Conjunto ESC/ACCF/AHA/WHF para la Redefinición del Infarto de Miocardio.

Paciente n.º 1: se presentó con signos y síntomas de SCA, en la presentación mostró elevación de los niveles de sFLT-1 y HGF en relación con las cantidades de referencia definidas anteriormente que disminuyeron durante el seguimiento y después de que remitieran los signos de isquemia. 4 h después de la presentación en el hospital, los niveles de troponina T aumentaron, al igual que los niveles de NT-proANP como signo de cambio funcional agudo. Debido a los niveles crecientes de troponina T, el paciente fue sometido a angiografía coronaria y se le implantó una endoprótesis vascular.

Paciente n.º 2: se presentó con signos y síntomas de SCA, que todavía estuvieron presentes cuando acudió a urgencias. En ECG, mostró elevación de ST en II, III y a VF, indicando un infarto de miocardio de la pared posterior del ventrículo izquierdo. Presentaba niveles muy elevados de sFLT-1 y HGF en relación con las cantidades de referencia definidas anteriormente, el nivel de troponina T se incrementó en comparación con la cantidad de referencia definida anteriormente, pero no se diagnosticó IMSEST en ese momento. Se programó inmediatamente una angiografía, justo antes de la intervención se obtuvo una segunda muestra que mostraba un aumento en los niveles de NT-proANP y troponina T y niveles continuamente elevados de HGF y sFLT-1 con respecto a las cantidades de referencia definidas con anterioridad. En la angiografía, se implantó una endoprótesis vascular y se restableció el flujo coronario.

Los resultados se muestran en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4: sFLT-1, HGF y NT-proANP en pacientes con IM

N.º de paciente	Diagnóstico	Intervalo de tiempo (horas) después de la presentación en el hospital	TnT hs (pg/ml)	NT-proANP (pg/ml)	HGF (ng/ml)	sFLT-1 (pg/ml)
1	IMSEST	0	1,81	4611,05	7,21	2160,48
	IMSEST	4 horas	20,33	6431,66	1,51	274,03
2	IMEST	0	22,03	13826,19	62,64	7382,76
	IMEST	2,5 horas	481,41	27423,76	57,25	6673,91

Los datos muestran que las cantidades de sFLT-1 y HGF son más elevadas en la isquemia más grave (IMEST vs. IMSEST). Los niveles de sFLT-1 y HGF proporcionan información a corto plazo sobre el estado isquémico, como se puede apreciar por el hecho de que sus respectivas cantidades disminuyen incluso en pacientes con IMEST después de varias horas. Los datos muestran, además, que la isquemia puede causar una disfunción circulatoria, como viene indicado por los niveles elevados de NT-proANP.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para diagnosticar un estado isquémico de un sujeto que muestra signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio por tener una cantidad de troponina T determinada en una muestra del sujeto menor de 0,1 ng/ml, que comprende
 - (a) determinar la cantidad de tirosina quinasa-1 similar a fms soluble (sFLT-1) en una muestra de dicho sujeto,
 - 10 (b) comparar la cantidad de sFLT-1 determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
 - (c) diagnosticar el estado isquémico basándose en la información obtenida en la etapa b), en el que una cantidad de sFLT-1 por debajo de la cantidad de referencia es indicativa de un estado no isquémico no asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible, y una cantidad de sFLT-1 igual a o mayor que la cantidad de referencia es indicativa de un estado isquémico asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible.
- 20 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que adicionalmente se determina la cantidad de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y se compara con un valor de referencia para HGF.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la cantidad de referencia para sFLT-1 indicativa de un estado isquémico es de aproximadamente 92 pg/ml, más preferentemente de aproximadamente 109 pg/ml.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una cantidad de referencia para HGF es aproximadamente 0,62 pg/ml, más preferentemente 0,73 pg/ml, en el que una cantidad de HGF por debajo de la cantidad de referencia es indicativa de un estado no isquémico no asociado o que no conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible, y una cantidad de HGF igual a o mayor que la cantidad de referencia es indicativa de un estado isquémico asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible.
- 30 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el procedimiento comprende adicionalmente determinar la cantidad de un péptido de tipo ANP, preferentemente NT-proANP en la muestra para la determinación de una deficiencia circulatoria en el sujeto.
- 35 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que una cantidad de NT-proANP igual a o mayor que aproximadamente 1320 pg/ml, más preferentemente aproximadamente 1674 pg/ml, es indicativa de una deficiencia circulatoria.
- 40 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el procedimiento comprende adicionalmente medir un ECG del sujeto respectivo.
- 45 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el procedimiento comprende adicionalmente la determinación de una mioglobina y/o proteína cardíaca de unión a ácidos grasos (H-FABP) en la muestra.
- 50 9. Un procedimiento para monitorizar el estado isquémico de un sujeto que muestra signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio por tener una cantidad de troponina T determinada en una muestra del sujeto menor de 0,1 ng/ml, que comprende las etapas de
 - (a) determinar las cantidades de tirosina quinasa-1 similar a fms soluble (sFLT-1) en una muestra de dicho sujeto en al menos en dos momentos temporales diferentes, y
 - (b) comparar las cantidades de sFLT-1 determinadas en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia, y
 - 55 (c) diagnosticar el estado isquémico en al menos en dos momentos temporales diferentes, basándose en la información obtenida en la etapa b) para monitorizar el estado isquémico, en el que una cantidad de sFLT-1 por debajo de la cantidad de referencia es indicativa de un estado no isquémico no asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible, y una cantidad de sFLT-1 igual a o mayor que la cantidad de referencia es indicativa de un estado isquémico asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o una lesión cardíaca no reversible.
 - 60 10. Un procedimiento para identificar un sujeto susceptible de intervención cardíaca, en el que el sujeto muestra signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio por tener una cantidad de troponina T determinada en una muestra del sujeto menor de 0,1 ng/ml, que comprende
- 65

(a) determinar la cantidad de sFLT-1 en una muestra de dicho sujeto, y

(b) comparar la cantidad de sFLT-1 determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia,

(c) diagnosticar el estado isquémico basándose en la información obtenida en la etapa b), e

(d) identificar el sujeto, basándose en la información obtenida en la etapa c), en el que una cantidad de sFLT-1 por debajo de la cantidad de referencia es indicativa de un estado no isquémico no asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o a una lesión cardíaca no reversible, y una cantidad de sFLT-1 igual a o mayor que la cantidad de referencia es indicativa de un estado isquémico asociado o que conduce a una disfunción cardíaca no reversible o una lesión cardíaca no reversible, y en caso de que el valor de sFLT-1 no indique un estado isquémico, el individuo no requiere ningún examen adicional en cuanto a enfermedades cardíacas, y en caso de que se diagnostique una enfermedad isquémica por la cantidad de sFLT-1, el individuo respectivo se somete a una intervención cardíaca.

11. Un procedimiento para recomendar o decidir sobre una posible intervención cardíaca o iniciar una posible intervención cardíaca en un sujeto que muestra signos y síntomas de síndrome coronario agudo pero que no cumple los criterios diagnósticos de un infarto de miocardio por tener una cantidad de troponina T determinada en una muestra del sujeto menor de 0,1 ng/ml, que comprende

(a) determinar la cantidad de sFLT-1 en una muestra de dicho sujeto, y

(b) comparar la cantidad de sFLT-1 determinada en la etapa a) con al menos una cantidad de referencia,

(c) diagnosticar el estado isquémico basándose en la información obtenida en la etapa b), y

(d) recomendar o decidir sobre el inicio de una intervención cardíaca, iniciar la intervención cardíaca o abstenerse de la intervención cardíaca, basándose en la información obtenida en la etapa c), en el que una cantidad de sFLT-1 por debajo de la cantidad de referencia es indicativa de un estado no isquémico no asociado o que conduce a una disfunción cardíaca reversible o a una lesión cardíaca no reversible, y una cantidad de sFLT-1 igual a o mayor que la cantidad de referencia es indicativa de un estado isquémico asociado o que conduce a una disfunción cardíaca no reversible o una lesión cardíaca no reversible, y en caso de que el valor de sFLT-1 no indique un estado isquémico, el individuo no requiere ningún examen adicional en cuanto a enfermedades cardíacas, y en caso de que se diagnostique una enfermedad isquémica por la cantidad de sFLT-1, el individuo respectivo se somete a una intervención cardíaca.

12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que la intervención cardíaca se selecciona entre el grupo de: administración de productos farmacéuticos; angioplastia coronaria percutánea, angioplastia coronaria transluminal percutánea con globo, angioplastia con láser, implantación de endoprótesis vascular coronaria, implantación de derivación o técnicas intraluminales con el objetivo de restablecer el flujo sanguíneo, la permeabilidad del vaso, estabilizar la placa y/o reducir la carga de trombo intracoronario.