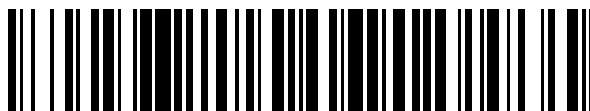


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 461**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009** **E 09179925 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017** **EP 2336784**

54 Título: **GDF-15 y/o troponina T para predecir insuficiencia renal en pacientes con cirugía cardíaca**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HESS, GEORG;
ZDUNEK, DIETMAR y
HORSCH, ANDREA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 647 461 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

GDF-15 y/o troponina T para predecir insuficiencia renal en pacientes con cirugía cardíaca

- 5 GDF-15 es un miembro de la familia TGF beta, se sintetiza como un propéptido de 40 kD y experimenta escisión de su fracción del extremo terminal N para generar una proteína dimérica activa enlazada por disulfuro de 30 kD que se secreta. GDF-15 se ha relacionado con la insuficiencia cardíaca y con lesión por reperfusión cardíaca (Kempf T et al., 2006, Circulation Research, 98: 351-360). Se ha demostrado que GDF-15 es inducido en muchos tejidos en respuesta a diversos tipos de estrés.
- 10 La troponina T es una parte del aparato contráctil de cardiomiocitos. Es un biomarcador bien establecido de necrosis o daño del miocardio. En línea con estos hallazgos, se ha demostrado que los niveles elevados de troponina T medidos dentro de las 24 horas posteriores a la cirugía de revascularización coronaria indican un aumento en el riesgo de complicaciones postoperatorias (Mohammed et al., 2009, Circulation, 120: 843-850).
- 15 Los pacientes con aterosclerosis cardiovascular avanzada se benefician de la intervención cardiovascular percutánea (PCI) tal como se resume en las directrices de ACC/AHA para revascularización con PCI y cirugía de revascularización coronaria (CABG) en pacientes con angina estable (Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R, et al. (2004). "ACC/AHA 2004 guideline update for coronary artery bypass graft surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery)". Circulation 110 (14): e340-437).
- 20 La PCI es principalmente útil en pacientes con estenosis simple de arterias principales o con un número limitado de estenosis en vasos sanguíneos principales. La CABG es principalmente útil en enfermedad de múltiples vasos y estenosis múltiples.
- 25 La cirugía de derivación coronaria está, sin embargo, asociada con un riesgo significativo de complicaciones. La incidencia de lesión renal aguda (AKI) después de la cirugía de derivación coronaria varía de 10 a 20% (Mehta et al., Circulation 2006, 114: 2208-2216). De 1 a 5% de estas personas requieren diálisis postoperatoria. La patogénesis de la AKI postoperatoria parece multifactorial y su asociación con una mayor morbilidad y mortalidad a largo plazo después de la cirugía cardíaca está bien establecida (Brown et al., Annals of Thoracic Surgery 2008, 86: 4-11; Kourliouros et al., European Journal of Cardiothoracic Surgery 2009, en prensa).
- 30 Haase describe que los niveles de NGAL predicen la aparición de lesión renal aguda (AKI) después de una cirugía cardíaca (THE ANNALS OF THORACIC SURGERY JUL 2009, volumen 88, No. 1, julio de 2009 (2009-07), páginas 124-130).
- 35 Partially describe que los niveles urinarios de L-FABP predicen una AKI después de una cirugía cardíaca (KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 73, No. 4, febrero de 2008 (2008-02), páginas 465-472).
- 40 Ahsan describe que un nivel elevado de ácido úrico preoperatorio en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular de alto riesgo confería un riesgo de 4 veces mayor de AKI después de la cirugía (AMERICAN JOURNAL OF NEPHROLOGY 2009, vol. 30, No. 5, 2009, páginas 425-429).
- 45 El documento WO 2009/083950 describe métodos para predecir el riesgo de una función renal alterada.
- El documento EP 1 983 345 A1 da a conocer un kit para medir GDF-1 5 en combinación con troponina y un péptido natriurético. Zimmers describe que GDF-15 se induce después de una quirúrgica y una lesión química y un choque térmico (SHOCK, JUN 2005, val. 23, No. 6, junio de 2005 (2005-06), páginas 543-548).
- 50 El documento WO2009/141357 divulga el uso de GDF-1 5 como marcador en pacientes con diabetes tipo 1.
- La AKI se puede prevenir en pacientes de riesgo. La prevención incluye un cuidadoso balance hídrico durante y después de la cirugía, evitar las bajas temperaturas de perfusión con derivación cardiopulmonar (CPC) (Kourliouros et al., citado anteriormente), evitar los medicamentos nefrotóxicos antes de la cirugía y la aplicación de medicamentos como eritropoyetina después de la cirugía (Song et al., American Journal of Nephrology 2009, 30: 253-260).
- 55 Por lo tanto, es de gran importancia identificar individuos con riesgo de complicaciones antes de la cirugía cardiovascular para evitar factores de riesgo que puedan conducir a la precipitación de la lesión renal aguda. Además, en estos individuos está indicado el seguimiento cuidadoso de la función renal después de la cirugía.
- 60 En consecuencia, el problema técnico que subyace a la presente invención podría verse como la provisión de medios y métodos para la identificación de individuos que tienen un riesgo elevado de padecer lesión renal después de un procedimiento quirúrgico. El problema se resuelve mediante las realizaciones de la presente invención presentadas en las reivindicaciones 1 a 14.
- 65

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a un método para predecir en un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes y que será sometido a un procedimiento quirúrgico, el riesgo de padecer una lesión renal aguda durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra del paciente que se ha obtenido antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico; y
- b) comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia, por lo que se predice el riesgo de que el paciente sufra una lesión renal aguda durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico.

El método de la presente invención, preferiblemente, es un método *in vitro*. Además, puede comprender etapas adicionales a las mencionadas explícitamente anteriormente. Por ejemplo, otras etapas pueden estar relacionadas con tratamientos previos de muestras o evaluación de los resultados obtenidos por el método.

El método puede llevarse a cabo manualmente o asistido por automatización. Preferiblemente, la etapa (a) y/o (b) pueden ser asistidas total o parcialmente por automatización, por ejemplo, mediante un equipo robótico y sensorial adecuado para la determinación en la etapa (a) o una comparación implementada por ordenador en la etapa (b).

El término "predicción del riesgo" tal como se usa en el presente documento se refiere a evaluar la probabilidad según la cual un sujeto sufrirá una lesión renal aguda dentro de una cierta ventana de tiempo, es decir, la ventana de predicción. De acuerdo con la presente invención, la ventana de predicción, preferiblemente, está dentro de 1 día, 2 días o 3 días después de la finalización de la intervención. El punto final de la lesión renal aguda dentro de dicha ventana se hará evidente por un aumento de la creatinina sérica como se define en otra parte en esta especificación.

Sin embargo, como entenderán los expertos en la materia, tal evaluación generalmente no pretende ser correcta para el 100% de los sujetos a investigar. El término, sin embargo, requiere que se pueda hacer una predicción para una porción estadísticamente significativa de los sujetos de una manera correcta y apropiada. La persona experta en la materia puede determinar si una porción es estadísticamente significativa usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferiblemente, la probabilidad prevista por la presente invención permite que la predicción de un riesgo incrementado, normal o disminuido sea correcta para al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de los sujetos de una cohorte dada o población. El término, preferentemente, se refiere a predecir si existe o no un mayor riesgo de lesión renal aguda en comparación con el riesgo promedio de desarrollar una lesión renal aguda en una población de sujetos en lugar de dar una probabilidad precisa de dicho riesgo.

El paciente es un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes. Más preferiblemente, el paciente padece aterosclerosis cardiovascular que requiere tratamiento por cirugía de revascularización coronaria (CABG). En un paciente que padece enfermedades que acompañan a la arteriosclerosis cardiovascular, preferiblemente diabetes y enfermedad cardiovascular, aumenta el riesgo de que el paciente sufra una lesión renal aguda. La enfermedad cardiovascular es, preferiblemente, insuficiencia cardíaca o hipertensión. La diabetes es, preferiblemente, diabetes tipo 1 o tipo 2. Preferiblemente, la gravedad de la enfermedad cardiovascular en pacientes que necesitan CABG es mayor que en pacientes que necesitan otros tipos de procedimientos quirúrgicos.

Preferiblemente, una gravedad creciente de la enfermedad cardiovascular aumenta el riesgo de que el paciente sufra de AKI después del procedimiento quirúrgico (preferiblemente grave). Excepto por las enfermedades o afecciones específicas antes mencionadas, el paciente de riesgo debe ser, preferiblemente, aparentemente sano.

El término "procedimiento quirúrgico", preferiblemente, se refiere a cualquier procedimiento quirúrgico que requiera anestesia general y soporte pulmonar o cardiopulmonar. También preferiblemente, un procedimiento quirúrgico severo se caracteriza por una duración de más de 30 minutos, preferiblemente más de aproximadamente 1 o más de aproximadamente 2 horas. Más preferiblemente, un procedimiento quirúrgico es cirugía ortopédica, una resección tumoral, cirugía del tracto gastrointestinal que no implica la resección del tumor (por ejemplo, la eliminación de divertículos) y cirugía cardíaca. Más preferiblemente, el procedimiento quirúrgico es cirugía cardíaca. La cirugía cardíaca es, preferiblemente, cirugía de revascularización coronaria (CABG). La CABG está indicada si un paciente sufre estenosis de las arterias coronarias que no pueden tratarse con éxito con otros métodos como la intervención coronaria percutánea (PCI). Este suele ser el caso si se ven afectados varios vasos o si la estenosis no está claramente localizada. La CABG se realiza "con ayuda de una bomba", es decir, el corazón se detiene y no late durante la cirugía, o "sin bomba", es decir, el corazón continúa latiendo durante el procedimiento.

El término "lesión renal aguda" o "AKI" se refiere a una función renal alterada. Preferiblemente, la AKI se caracteriza por un aumento de la creatinina sérica de al menos 0,3 mg/dl dentro de las 72 horas posteriores a la cirugía o por un aumento de al menos el 50% desde la línea base. Por lo general, no todos los casos de AKI conducen a un deterioro funcional de los riñones que requeriría una terapia de reemplazo renal. En casos severos de lesión renal aguda, se requiere terapia de reemplazo renal por hemodiálisis para apoyar la función renal defectuosa del paciente.

La lesión renal aguda, preferiblemente, se produce durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico.

Preferiblemente, la AKI comienza durante el procedimiento quirúrgico o, como máximo, 1, 2 o 3 días después de la cirugía. Dependiendo del método de diagnóstico aplicado, solo puede ser reconocible varios días después del inicio.

Más preferiblemente, la lesión renal aguda no solo se asocia temporalmente sino también de manera causal con el procedimiento quirúrgico, es decir, el procedimiento quirúrgico o las circunstancias circundantes son la razón por la cual el paciente en cuestión sufre una lesión renal aguda.

El término "Factor 15 de diferenciación de crecimiento" o "GDF-15" se refiere a un polipéptido que es un miembro de la superfamilia de citoquinas del factor de crecimiento transformante (TGF)- β . Los términos polipéptido, péptido y proteína se usan de forma intercambiable a lo largo de esta especificación. El GDF-15 se clonó originalmente como citoquina 1 inhibidora de macrófagos y más tarde también se identificó como el factor β de crecimiento transformante placentario, proteína morfogénica ósea placentaria, gen 1 antiinflamatorio no esteroideo activado por fármacos y factor derivado de próstata (Bootcov citado anteriormente; Hromas, 1997 *Biochim Biophys Acta* 1354: 40-44, Lawton 1997, *Gene* 203: 17-26, Yokoyama-Kobayashi 1997, *J Biochem (Tokio)*, 122: 622-626; Paralkar 1998, *J Biol Chem* 273: 13760-13767). De forma similar a otras citoquinas relacionadas con TGF- β , GDF-15 se sintetiza como una proteína precursora inactiva, que experimenta homodimerización enlazada por disulfuro. Tras la escisión proteolítica del propéptido del extremo terminal N, se secreta GDF-15 como una proteína dímera de ~28 kDa (Bauskin 2000, *Embo J* 19: 2212-2220). Las secuencias de aminoácidos y las actividades biológicas para GDF-15 se describen en los documentos WO99/06445, WO00/70051, WO2005/113585, Bottner 1999, *Gene* 237: 105-111, Bootcov citado anteriormente, Tan citado anteriormente, Baek 2001, *Mol Pharmacol* 59: 901-908, Hromas citado anteriormente, Paralkar citado anteriormente, Morrish 1996, *Placenta* 17: 431-441 o Yokoyama-Kobayashi citado anteriormente.

El término "troponina" se refiere a todas las isoformas de troponina expresadas en las células del corazón y, preferiblemente, las células subendocárdicas. Estas isoformas están bien caracterizadas en la técnica como se describe, por ejemplo, en Anderson 1995, *Circulation Research*, vol. 76, no. 4: 681-686 y Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493. Preferiblemente, troponina se refiere a troponina T y/o troponina I. Por consiguiente, ambas troponinas pueden determinarse juntas en el método de la presente invención, es decir, simultánea o secuencialmente, o individualmente, es decir, sin determinar la otra isoforma en absoluto. Secuencias de aminoácidos para la troponina T humana y la troponina I humana se describen en Anderson, citado anteriormente y Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493. El término "troponina" abarca también variantes de las troponinas específicas antes mencionadas, es decir, preferiblemente, de troponina T o troponina I.

Los términos "GDF-15", "péptido natriurético" y "troponina" usados en la presente memoria también abarcan variantes de los polipéptidos específicos mencionados anteriormente. Tales variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que el polipéptido específico de la presente invención. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en esta memoria descriptiva, por ejemplo, mediante ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos. Además, debe entenderse que una variante a la que se hace referencia de acuerdo con la presente invención tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, supresión y/o adición de aminoácidos en la que la secuencia de aminoácidos de la variante es todavía, preferiblemente, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% idéntica con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la presente invención, preferiblemente en toda la longitud del péptido. Preferiblemente, en el concurso de identidad de secuencias de aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos, el término "al menos aproximadamente" se refiere a una identidad de secuencia que excede el valor numérico exacto indicado. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, el grado de identidad se determinará comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, donde el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (por ejemplo, espacios o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para una alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se presenta el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en el intervalo de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede llevar a

cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Add. 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 método de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) o por inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para comparación, GAP y BESTFIT se emplean preferiblemente para determinar su alineamiento óptimo y, por lo tanto, el grado de identidad. Preferiblemente, se usan los valores predeterminados de 5,00 para el peso del espacio y 0,30 para la longitud del peso del espacio. Las variantes mencionadas anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parágrafo u ortólogo específico de la especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en este documento incluyen fragmentos o subunidades del polipéptido específico o los tipos de variantes mencionados anteriormente siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas esenciales y/o actividades biológicas mencionadas anteriormente.

Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de los polipéptidos de la presente invención. Además, se incluyen variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación o miristilación.

La determinación de la cantidad de GDF-15, un péptido natriurético, troponina o cualquier otro péptido o polipéptido al que se hace referencia en esta memoria descriptiva se refiere a la medición de la cantidad o concentración, preferiblemente de forma semicuantitativa o cuantitativa. La medición se puede hacer directa o indirectamente. La medición directa se refiere a la medición de la cantidad o concentración del péptido o polipéptido basándose en una señal que se obtiene a partir del péptido o polipéptido en sí y cuya intensidad se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presente en la muestra. Dicha señal, a veces denominada aquí señal de intensidad, puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta incluye medir una señal obtenida de un componente secundario (es decir, un componente que no es el péptido o polipéptido en sí mismo) o un sistema de lectura biológica, por ejemplo, respuestas celulares medibles, ligandos, marcadores o productos de reacción enzimática.

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 métodos de inmunoensayo que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos tipo sándwich, de competición u otros formatos de ensayo. Dichos ensayos desarrollarán una señal que es indicativa de la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la intensidad de la señal puede, preferiblemente, correlacionarse directa o indirectamente (por ejemplo, inversamente proporcional) a la cantidad de polipéptido presente en una muestra.

Otros métodos adecuados comprenden medir una propiedad física o química específica para el péptido o polipéptido tal como su masa molecular precisa o espectro de RMN. Dichos métodos comprenden, preferiblemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN, o dispositivos de cromatografía. Además, los métodos incluyen métodos basados en microplacas de ELISA, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (disponibles por ejemplo en analizadores Elecsys^{MR}), CBA (un ensayo enzimático de unión de cobalto, disponible por ejemplo en analizadores Roche-Hitachi^{MR}) y ensayos de aglutinación de látex (disponibles, por ejemplo, en los analizadores Roche-Hitachi^{MR}).

Preferiblemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende las etapas de (a) poner en contacto una célula capaz de provocar una respuesta celular cuya intensidad es indicativa de la cantidad del péptido o polipéptido con dicho péptido o polipéptido durante un período de tiempo adecuado, (b) la medición de la respuesta celular. Para medir las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se agrega, preferiblemente, a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión medible de un gen informador o la secreción de una sustancia, por ejemplo, un péptido, polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia generará una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad del péptido o polipéptido.

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

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido, preferiblemente, comprende las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una señal de intensidad. La unión de acuerdo con la presente invención incluye tanto unión covalente como 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 este documento. Los ligandos preferidos incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o

5 polipéptidos tales como receptores o parejas 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 métodos para preparar tales ligandos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los proveedores comerciales también ofrecen identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados. La persona experta en la técnica está familiarizada con los métodos para desarrollar derivados de tales ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Estos derivados pueden someterse a prueba para determinar la unión de acuerdo con los procedimientos de exploración conocidos en la técnica, por ejemplo, presentación en fagos. Los anticuerpos como se mencionan aquí incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, 10 tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unirse al antígeno o al hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos híbridos humanizados en los que 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 del donante incluirán usualmente 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 del donante. Dichos híbridos se pueden preparar mediante varios métodos bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido. La unión específica de acuerdo con la presente invención significa que el ligando o agente no debe unirse sustancialmente a ("reacción cruzada" con) otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra a analizar. Preferiblemente, el péptido o polipéptido específicamente unido debería estar unido con una afinidad al menos 3 veces más alta, más preferiblemente al menos 10 veces más alta e incluso más preferiblemente al menos 50 veces más alta que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si aún se puede distinguir y medir de manera inequívoca, por ejemplo, de acuerdo con su tamaño en una transferencia Western, o por su abundancia relativamente mayor en la muestra. La unión del ligando se puede medir mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente, dicho método es 20 semicuantitativo o cuantitativo. Los métodos 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.

30 En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse un producto de reacción enzimático (por ejemplo, la cantidad de una proteasa puede medirse midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo, en una transferencia Western). Alternativamente, el ligando puede exhibir propiedades enzimáticas en sí mismo y el complejo "ligando/péptido o polipéptido" o el ligando que estaba unido por el péptido o polipéptido, respectivamente, pueden ponerse 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, preferiblemente la cantidad de sustrato es saturante. El sustrato también puede marcarse con una etiqueta detectable antes de la reacción. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un período de tiempo adecuado. Un período de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca una cantidad de producto detectable, preferiblemente medible. En lugar de medir la cantidad de producto, 40 puede medirse el tiempo necesario para la aparición de una cantidad determinada (por ejemplo, detectable) de producto.

En tercer lugar, el ligando se puede acoplar covalentemente o no covalentemente a una etiqueta que permita la detección y medición del ligando. El marcado puede hacerse por métodos directos o indirectos. El marcado directo implica el acoplamiento de la etiqueta directamente (covalente o no covalentemente) al ligando. El marcado indirecto implica la unión (covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario se puede acoplar con 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 usa a menudo para aumentar la señal. Los ligandos adecuados de orden secundario y superior pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios y el bien conocido sistema de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también puede "marcarse" con una o más etiquetas como se conoce en la técnica. Tales etiquetas pueden ser objetivos para ligandos de orden superior. Las etiquetas adecuadas incluyen biotina, digoxigenina, etiqueta de His, glutatión S-transferasa, FLAG, GFP, etiqueta de myc, hemaglutinina del virus de la gripe A (HA), proteína de unión a la maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta está preferiblemente en el extremo terminal N y/o el extremo terminal C. Etiquetas adecuadas son cualquiera de las etiquetas detectables mediante un método de detección apropiado. Las etiquetas típicas incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridina, luminol, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radiactivos, marcadores magnéticos (por ejemplo, perlas magnéticas, que incluyen etiquetas paramagnéticas y superparamagnéticas) y etiquetas fluorescentes. Las etiquetas enzimáticamente activas incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y sus derivados. Los sustratos adecuados para la detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina, NBT-BCIP (cloruro de tetrazolio 4-nitro azul y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como solución madre lista para usar de Roche Diagnostics), CDP-Star^{MR} (Amersham Biosciences), ECF^{MR} (Amersham Biosciences). Una combinación de enzima-sustrato adecuada puede dar como resultado un producto de reacción coloreado, fluorescencia o 60 quimioluminiscencia, que puede medirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando una

película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). En cuanto a medir la reacción enzimática, los criterios dados anteriormente se aplican análogamente. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Rojo Texas, fluoresceína y los colorantes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Se encuentran disponibles otras etiquetas fluorescentes, por ejemplo, a través de Molecular Probes (Oregón). También se contempla el uso de puntos cuánticos como etiquetas fluorescentes. Las etiquetas radiactivas típicas incluyen ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P , ^{33}P y similares. Una etiqueta radioactiva puede detectarse mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo, una película sensible a la luz o un generador de imágenes de fósforo. Los métodos de medición adecuados de acuerdo con la presente invención también incluyen precipitación (particularmente inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia generada por electricidad), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), pruebas inmunológicas de enzimas tipo sándwich, inmunoensayos de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), ensayo inmunofluorométrico con lantánido de disociación mejorada (DELFA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría mejorada con látex o pruebas inmunes en fase sólida. Otros métodos conocidos en la técnica (tales como electroforesis en gel, electroforesis bidimensional en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), transferencia de Western y espectrometría de masas), pueden usarse solos o en combinación con etiquetado u otros métodos de detección como se describió anteriormente.

La cantidad de un péptido o polipéptido se puede determinar también, preferiblemente, como sigue: (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el péptido o polipéptido como se especificó anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) medir la cantidad de péptido o polipéptido que está unida al soporte. El ligando, preferiblemente elegido del grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está presente preferiblemente en un soporte sólido en forma inmovilizada.

Los materiales para fabricar soportes sólidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, materiales en columna comercialmente disponibles, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas de metal coloidal, virutas y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos, pozos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede estar unido a muchos vehículos diferentes. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, 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 fines de la invención. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, pero sin limitarse 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 tales matrices de suspensión, el portador, por ejemplo, una microperla o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consiste en diferentes microesferas o microesferas, posiblemente etiquetadas, que portan diferentes ligandos. Los métodos para producir tales matrices, por ejemplo, basados en química en fase sólida y grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (documento US 5.744.305).

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. Se pueden obtener muestras de fluidos corporales mediante técnicas bien conocidas e incluyen, preferiblemente, muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferiblemente, muestras de sangre, plasma o suero. Se pueden obtener muestras de tejido u órgano de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. Las células separadas se pueden obtener de los fluidos corporales o los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como centrifugación o clasificación de células. Preferiblemente, las muestras de células, tejidos u órganos se obtienen a partir de aquellas células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos a los que se hace referencia en este documento. Preferiblemente, la muestra se ha tomado antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico. Más preferiblemente, la muestra se ha tomado dentro de un intervalo de tiempo de 1 día antes hasta 6 semanas antes de que se lleve a cabo el procedimiento quirúrgico. La muestra es, preferiblemente, tomada 1 día o 2 días antes del procedimiento quirúrgico. En un paciente estable, es decir, en un paciente cuyo estado de salud no cambia, también se prefiere tomar la muestra dentro de 1 semana o 2 semanas antes del procedimiento quirúrgico. En un paciente inestable, se toma la muestra, preferiblemente dentro de las 6 horas, 12 horas o 24 horas antes del procedimiento quirúrgico.

El término "comparar", como se usa en el presente documento, abarca comparar la cantidad del péptido o polipéptido comprendido por la muestra a analizar con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada en otra parte en esta descripción. Debe entenderse que la comparación como se usa en este documento se refiere a una comparación de parámetros o valores correspondientes, por ejemplo, se compara una cantidad absoluta con una cantidad de referencia absoluta mientras se compara una concentración con una concentración de referencia o una señal de intensidad obtenida de una muestra de ensayo se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación a la que se hace referencia en la etapa (c) del método de la presente invención puede llevarse a cabo de forma manual o asistida por ordenador. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada se puede comparar con los valores correspondientes a las 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 evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Con base en la

comparación de las cantidades determinadas en la etapa a) y la cantidad de referencia del método de la presente invención, es posible predecir el riesgo del sujeto de sufrir una o más de las complicaciones mencionadas en este documento. Por lo tanto, la cantidad de referencia debe elegirse de modo que una diferencia o similitud en las cantidades comparadas permita identificar a aquellos pacientes que están en riesgo de padecer una lesión renal aguda después de un procedimiento quirúrgico.

De acuerdo con esto, el término "cantidad de referencia" como se usa en este documento se refiere a una cantidad que permite predecir si un paciente tiene un mayor riesgo de padecer una lesión renal aguda después de un procedimiento quirúrgico. Por consiguiente, la referencia puede derivarse de (i) una muestra tomada de un paciente antes de someterse a una cirugía y que se sabe que ha sufrido una AKI después o (ii) una muestra tomada de un paciente antes de someterse a una cirugía y que se sabe que ha sufrido de AKI después de la cirugía.

Preferiblemente, la cantidad de referencia se determina sobre la base de una cantidad media promediada obtenida de un grupo de pacientes que cumplen los criterios de (i) o de (ii), descritos anteriormente. Además, la cantidad de referencia puede definir una cantidad umbral, por lo que una cantidad mayor que el umbral será indicativa para un sujeto que está en mayor riesgo de AKI. La cantidad de referencia aplicable para un sujeto individual puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos tales como la edad, el sexo o la subpoblación, así como de los medios utilizados para la determinación del polipéptido o péptido al que se hace referencia en este documento. Se puede determinar una cantidad de referencia adecuada mediante el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia a analizar conjuntamente, es decir, de forma simultánea o posteriormente, con la muestra de prueba. Una cantidad de referencia preferida que sirve como umbral puede derivarse del límite superior de la normalidad (ULN), es decir, el límite superior de la cantidad fisiológica que se encuentra en muestras de una población de sujetos antes de someterse a una cirugía y que no han sufrido o no padecen las complicaciones definidas anteriormente, es decir, sujetos que se sabe que no han sufrido una AKI después de la cirugía. El ULN para una población dada de sujetos se puede determinar mediante diversas técnicas bien conocidas. Una técnica adecuada puede ser determinar la mediana o promedio de la población para las cantidades de péptido o polipéptido que se determinarán en el método de la presente invención.

Se pueden establecer las cantidades de referencia de un marcador de diagnóstico (es decir, de GDF-15, un péptido natriurético o troponina), y se puede comparar simplemente el nivel del marcador en una muestra del paciente con la cantidad de referencia. La sensibilidad y especificidad de una prueba de diagnóstico y/o pronóstico dependen de algo más que la "calidad" analítica de la prueba; también dependen de la definición de lo que constituye un resultado anormal. Preferiblemente, la distribución de las cantidades medidas de los marcadores de la presente invención en una población de pacientes que han sufrido una lesión renal aguda después de un procedimiento quirúrgico se compara con la distribución de las cantidades de dicho marcador en pacientes sin dichas complicaciones.

Preferiblemente, dicha distribución se determina en muestras tomadas antes de la cirugía. Los métodos estadísticos bien conocidos por las personas expertas en la técnica se pueden usar para definir una cantidad umbral que se puede usar para separar pacientes en riesgo de padecer dichas complicaciones y pacientes que no están en riesgo.

Especialmente preferido para este propósito es el cálculo de las curvas características operativas del receptor, o curvas "ROC". Las curvas ROC normalmente se calculan graficando el valor de una variable frente a su frecuencia relativa en poblaciones "normales" y "enfermas". Para cualquier marcador en particular, una distribución de niveles de marcador para sujetos con y sin enfermedad probablemente se superpondrá. Bajo tales condiciones, una prueba no distingue absolutamente un estado normal de uno de enfermedad con una precisión del 100%, y el área de solapamiento indica dónde la prueba no puede distinguir el estado normal de la enfermedad. Se puede seleccionar un umbral, por encima del cual (o por debajo del cual, dependiendo de cómo un marcador cambia con la enfermedad), se considera que la prueba es anormal y por debajo de la cual la prueba 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 condición. Las curvas ROC pueden usarse incluso cuando los resultados de las pruebas no dan necesariamente un número exacto. Siempre que se puedan clasificar los resultados, se puede crear una curva ROC.

Por ejemplo, los resultados de una prueba en muestras de "enfermedad" pueden clasificarse 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 puede crear una curva ROC. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hanley et al., *Radiology* 143: 29-36 (1982).

En ciertas realizaciones, los marcadores (es decir, GDF-15, un péptido natriurético o troponina) se seleccionan para exhibir al menos aproximadamente 70% de sensibilidad, más preferiblemente al menos aproximadamente 80% de sensibilidad, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 85% de sensibilidad, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de sensibilidad, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de sensibilidad, combinado con al menos aproximadamente 70% de especificidad, más preferiblemente al menos aproximadamente 80% de especificidad, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 85% de especificidad, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de especificidad, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de especificidad. En realizaciones particularmente preferidas, tanto la sensibilidad

como la especificidad son al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95%.

5 Antes de la cirugía, una cantidad de GDF-15 por debajo de aproximadamente 1.078 pg/mL, preferiblemente, descarta el riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de GDF-15 por encima de aproximadamente 1.717 pg/mL indica, preferiblemente, un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de GDF-15 por encima de aproximadamente 2573 pg/mL indica, preferiblemente, un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Los citados valores umbral pueden ser adoptados para decidir según los percentiles 75 o para
10 descartar con base a los percentiles 25 mencionados en la Tabla 1a, más adelante.

15 Antes de la cirugía, una cantidad de troponina por debajo de aproximadamente 7,7 pg/mL o aproximadamente 13,3 pg/mL, preferiblemente, descarta el riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de troponina superior a aproximadamente 25,5 pg/mL o aproximadamente 33,1 pg/mL indica, preferiblemente, un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de troponina superior a aproximadamente 60,9 pg/mL indica, preferiblemente, un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Los citados valores umbral pueden ser adoptados para decidir según los percentiles 75 o para descartar con base a los percentiles 25 mencionados en la Tabla 1b, más adelante.

20 Antes de la cirugía, una cantidad de NT-proBNP por debajo de aproximadamente 160,3 pg/mL o aproximadamente 488,2 pg/mL, preferiblemente, descarta el riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de NT-proBNP superior a aproximadamente 1.118,7 pg/mL o aproximadamente 1.385,5 pg/mL indica, preferiblemente, un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de NT-proBNP superior a aproximadamente 2.227,1 pg/mL indica, preferiblemente, un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Los citados valores umbral pueden ser adoptados para decisión con base a los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25
25 mencionados en la Tabla 1c, más adelante.

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

35 Ventajosamente, el método de la presente invención permite la identificación de pacientes con un mayor riesgo de AKI antes del procedimiento quirúrgico. Esto se basa en el hallazgo sorprendente de que las cantidades de los marcadores de la presente invención determinadas en un paciente antes del procedimiento quirúrgico predicen el riesgo de que el paciente sufra de AKI después del procedimiento quirúrgico. A partir de la determinación de un mayor riesgo de AKI en un paciente, se pueden extraer consecuencias prácticas inmediatas: los factores de riesgo conocidos que precipitan la AKI deben controlarse en un paciente que tenga un mayor riesgo de sufrir AKI después de un procedimiento quirúrgico. El control de estos factores de riesgo incluye un cuidadoso equilibrio de líquidos durante y después de la cirugía. Si se usa una derivación cardiopulmonar durante la cirugía, se deben evitar las bajas temperaturas de perfusión (Kourliouros, citado anteriormente). También se deben evitar los fármacos nefrotóxicos (por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y sulfonamidas). Además, puede estar indicada la administración de eritropoyetina (Song et al., 2009, American Journal of Nephrology, 253-260). La posibilidad de predecir el riesgo de lesión renal aguda después de un procedimiento quirúrgico en un paciente antes de dicha intervención obviamente tiene consecuencias para decidir si el paciente en cuestión es elegible para el
40 procedimiento quirúrgico en cuestión.

45 Se entenderá que en otro aspecto del método de la presente invención, dicho método es un método para predecir en un paciente de riesgo que será sometido a un procedimiento quirúrgico, el riesgo de sufrir una lesión renal aguda que comprende la etapa de comparar la cantidad de GDF-15 (y opcionalmente troponina) determinada en una muestra del paciente con una cantidad de referencia adecuada como se describe en otra parte de este documento para predecir el riesgo de que el paciente sufra una lesión renal aguda.
50

En una realización preferida de la presente invención, se determina la cantidad de un péptido natriurético y/o troponina además de la cantidad de GDF-15.

55 El término "péptido natriurético" comprende péptidos del tipo del péptido natriurético atrial (ANP) y del péptido natriurético cerebral (BNP) y variantes de los mismos que tienen el mismo potencial predictivo. Los péptidos natriuréticos de acuerdo con la presente invención comprenden péptidos de tipo ANP y de tipo BNP y variantes de los mismos (véase, por ejemplo, Bonow, R. O. (1996). New insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation 93: 1946-1950). Los péptidos de tipo ANP comprenden pre-proANP, proANP, NT-proANP y ANP. Los péptidos de tipo BNP comprenden pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP y BNP. El péptido pre-pro (134 aminoácidos en el caso del pre-proBNP) comprende un péptido señal corto, que se escinde enzimáticamente para liberar el propéptido (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El propéptido se escinde adicionalmente en un propéptido del extremo terminal N (propéptido NT, 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de BNP, 28 aminoácidos en el caso de ANP). Los péptidos natriuréticos preferidos de acuerdo con la presente
60 invención son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP y variantes de los mismos. ANP y BNP son las hormonas activas
65

y tienen una vida media más corta que sus respectivas contrapartes inactivas, NT-proANP y NT-proBNP. El BNP se metaboliza en la sangre, mientras que NT-proBNP circula en la sangre como una molécula intacta y, como tal, se elimina por vía renal. La semivida in vivo de NT-proBNP es 120 min más larga que la de BNP, que es de 20 min (Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. El metabolismo retardado del péptido natriurético cerebral humano refleja resistencia a la endopeptidasa neutra. *J Endocrinol.* 2000; 167: 239-46). Los preanalíticos son más robustos con NT-proBNP permitiendo el transporte fácil de la muestra a un laboratorio central (Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Estabilidad a largo plazo del péptido natriurético de tipo B endógeno (BNP) y proBNP del extremo terminal amino (NT-proBNP) en muestras de plasma congelado. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 942-4). Las muestras de sangre pueden almacenarse a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o enviarse sin pérdida en la recuperación. En contraste, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C conduce a una pérdida de concentración de al menos 20% (Mueller T, Gegenhuber A, et al., *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 942-4, citado más arriba; Wu AH, Packer M, Smith A, Bijou R, Fink D, Mair J, Wallentin L, Johnston N, Feldcamp CS, Haverstick DM, Ahnadi CE, Grant A, Despres N, Bluestein B, Ghani F. Evaluación analítica y clínica del ensayo del péptido natriurético tipo B automatizado de Bayer ADVIA Centaur en pacientes con insuficiencia cardíaca: un estudio en múltiples sitios. *Clin Chem* 2004; 50: 867-73).

Por lo tanto, dependiendo del curso temporal o de las propiedades de interés, puede ser ventajosa la medición de las formas activa o inactiva del péptido natriurético. Los péptidos natriuréticos más preferidos de acuerdo con la presente invención son NT-proBNP o variantes de los mismos. Como se discutió brevemente anteriormente, el NT-proBNP humano al que se hace referencia de acuerdo con la presente invención es un polipéptido que comprende, preferiblemente, 76 aminoácidos de longitud correspondiente a la porción del extremo terminal N de la molécula de NT-proBNP humano. La estructura del BNP humano y NT-proBNP ya ha sido descrita en detalle en la técnica anterior, por ejemplo, WO 02/089657, WO 02/083913, Bonow 1996, *New Insights into the cardiac natriuretic peptides.* *Circulation* 93: 1946-1950. Preferiblemente, NT-proBNP humano como se usa en este documento es NT-proBNP humano como se describe en el documento EP 0 648 228 B1.

Además, se ha encontrado de acuerdo con la presente invención que la cantidad de GDF-15 después del procedimiento quirúrgico es también indicativa de un mayor riesgo de sufrir una lesión renal aguda.

Por lo tanto, la presente invención contempla también un método para predecir en un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes y que ha sido sometido a un procedimiento quirúrgico, el riesgo de padecer una lesión renal aguda que comprende las etapas de:

- a) determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra de sangre, suero o plasma del paciente; y
- b) comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia, por lo que se predice el riesgo de que el paciente sufra una lesión renal aguda,

donde la muestra se ha obtenido dentro de un intervalo de tiempo de no más de 1 día después del procedimiento quirúrgico.

Las explicaciones y definiciones de los términos anteriores se aplican haciendo los cambios necesarios. La muestra se ha tomado dentro de una ventana de tiempo de no más tarde de 1 día después de la cirugía. Es más preferido que la muestra se tome inmediatamente o no más tarde de 1 día después de la finalización de la intervención. Lo más preferido es que la muestra se tome inmediatamente después de la cirugía. El término "inmediatamente después de la cirugía", preferiblemente, se refiere a tomar la muestra a más tardar aproximadamente 0,5, no más tarde de aproximadamente 1, no más tarde de aproximadamente 2, a más tardar aproximadamente 3 o no más tarde de aproximadamente 6 horas después de la cirugía, lo más preferiblemente a más tardar 0,5 horas después de la cirugía. El método de la presente invención se puede practicar después de la cirugía para diagnosticar tan pronto como sea posible, si un paciente que se ha sometido a un procedimiento quirúrgico tiene un mayor riesgo de padecer una lesión renal aguda. Para contrarrestar eficazmente este riesgo, se deben tomar medidas terapéuticas lo antes posible.

En una muestra tomada inmediatamente después de la cirugía, una cantidad de GDF-15 por debajo de aproximadamente 1.807 pg/mL, preferiblemente, excluye el riesgo de AKI. Una cantidad de GDF-15 superior a aproximadamente 3.389 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de GDF-15 por encima de aproximadamente 6.393 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis.

En una muestra tomada 1 día después de la cirugía, una cantidad de GDF-15 por debajo de 6.375 pg/mL, preferiblemente, excluye el riesgo de AKI. Una cantidad de GDF-15 superior a aproximadamente 11.988 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de GDF-15 superior a aproximadamente 14.507 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Los citados valores umbral pueden ser adoptados para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2a, más adelante.

En una muestra tomada 2 días después de la cirugía, una cantidad de GDF-15 por debajo de aproximadamente 2.352 pg/mL, preferiblemente, descarta el riesgo de AKI. Una cantidad de GDF-15 por encima de aproximadamente 8.034 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de GDF-15 por encima de 8.929 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis.

5 Los citados valores umbral pueden ser adoptados para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2a, más adelante.

10 En una muestra tomada 3 días después de la cirugía, una cantidad de GDF-15 por debajo de aproximadamente 1.903 pg/mL, preferiblemente, excluye el riesgo de AKI. Una cantidad de GDF-15 por encima de aproximadamente 4.675 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de GDF-15 superior a aproximadamente 5.938 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Los citados valores umbral pueden ser adoptados para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2a, más adelante.

15 En una muestra tomada inmediatamente después de la cirugía, una cantidad de troponina por debajo de aproximadamente 176,6 pg/mL o aproximadamente 312,4, preferiblemente, excluye el riesgo de AKI. Una cantidad de troponina superior a aproximadamente 503,6 pg/mL o aproximadamente 593,1 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de troponina superior a aproximadamente 640,3 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Los citados valores umbral pueden ser adoptados para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2b, más adelante.

20 En una muestra tomada 1 día después de la cirugía, una cantidad de troponina inferior a aproximadamente 364,5 pg/mL o aproximadamente 863,9 pg/mL, preferiblemente, excluye el riesgo de AKI. Una cantidad de troponina superior a aproximadamente 1.108,1 pg/mL o aproximadamente 1.217,3 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de troponina superior a aproximadamente 1.280,9 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Dichos valores umbral pueden adoptarse adicionalmente para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2b, más adelante.

25 En una muestra tomada 2 días después de la cirugía, una cantidad de troponina inferior a aproximadamente 279,5 pg/mL o aproximadamente 537,6 pg/mL, preferiblemente, descarta el riesgo de AKI. Una cantidad de troponina superior a aproximadamente 739,1 pg/mL o aproximadamente 856,0 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de troponina superior a aproximadamente 981,3 pg/mL o aproximadamente 2.006,1 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Dichos valores umbral pueden adoptarse adicionalmente para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2b, más adelante.

35 En una muestra tomada 3 días después de la cirugía, una cantidad de troponina inferior a aproximadamente 182,7 pg/mL o aproximadamente 370,9 pg/mL, preferiblemente, descarta el riesgo de AKI. Una cantidad de troponina superior a aproximadamente 492,6 pg/mL o aproximadamente 812,5 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de troponina superior a aproximadamente 575,0 pg/mL o aproximadamente 1424,2 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Los citados valores umbral pueden ser adoptados para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2b, más adelante.

40 En una muestra tomada inmediatamente después de la cirugía, una cantidad de NT-proBNP por debajo de aproximadamente 139,2 pg/mL o aproximadamente 368,6, preferiblemente, descarta el riesgo de AKI. Una cantidad de NT-proBNP superior a aproximadamente 924,6 pg/mL o aproximadamente 940,3 pg/mL, preferiblemente, indica un aumento del riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de NT-proBNP superior a aproximadamente 1.933,3 pg/mL, preferiblemente, indica un aumento del riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis.

50 Dichos valores umbral pueden adoptarse adicionalmente para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2c, más adelante.

55 En una muestra tomada 1 día después de la cirugía, una cantidad de NT-proBNP por debajo de aproximadamente 914,1 pg/mL o aproximadamente 1.560,7 pg/mL, preferiblemente, descarta el riesgo de AKI. Una cantidad de NT-proBNP superior a aproximadamente 1.972, 2 pg/mL o aproximadamente 2.565, 1 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de NT-proBNP por encima de aproximadamente 3.296,2 pg/mL o aproximadamente 4.876,7 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Dichos valores umbral pueden adoptarse adicionalmente para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2c, más adelante.

60

5 En una muestra tomada 2 días después de la cirugía, una cantidad de NT-proBNP por debajo de aproximadamente 1.667,0 pg/mL o aproximadamente 2.717,2 pg/mL, preferiblemente, descarta el riesgo de AKI. Una cantidad de NT-proBNP superior a aproximadamente 4.618,5 pg/mL o aproximadamente 4.953,2 pg/mL, preferiblemente, indica un aumento del riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de NT-proBNP superior a aproximadamente 6.597,7 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Dichos valores umbral pueden adoptarse adicionalmente para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2c, más adelante.

10 En una muestra tomada 3 días después de la cirugía, una cantidad de NT-proBNP por debajo de aproximadamente 1.812,3 pg/mL o aproximadamente 2.825,0 pg/mL, preferiblemente, descarta el riesgo de AKI. Una cantidad de NT-proBNP por encima de aproximadamente 4.983,7 pg/mL o aproximadamente 5.393,4 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía. Una cantidad de NT-proBNP por encima de aproximadamente 5.291,9 pg/mL, preferiblemente, indica un mayor riesgo de lesión renal aguda que requiere hemodiálisis. Dichos valores umbral pueden adoptarse adicionalmente para decidir según los percentiles 75 o para descartar según los percentiles 25 mencionados en la Tabla 2c, más adelante.

15 A la luz de lo anterior, los métodos de la divulgación también pueden aplicarse para predecir si un sujeto necesita una terapia de reemplazo renal que incluye hemodiálisis o para predecir el riesgo de mortalidad y, preferiblemente, un mayor riesgo de mortalidad.

20 Se entenderá que, en otro aspecto del método, dicho método es un método para predecir en un paciente de riesgo que ha sido sometido a un procedimiento quirúrgico, el riesgo de sufrir una lesión renal aguda que comprende la etapa de comparar la cantidad de GDF-15 determinada en una muestra del paciente con una cantidad de referencia adecuada como se describe en otra parte del presente documento para predecir el riesgo de que el paciente sufra una lesión renal aguda.

25 En una realización preferida de la presente invención, se determina la cantidad de un péptido natriurético y/o troponina además de la cantidad de GDF-15.

30 Además, la presente invención se refiere a un método para decidir si un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes es elegible para un procedimiento quirúrgico que comprende las etapas de:

- 35 a) determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra del paciente que se ha obtenido antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico;
- b) comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia, por medio de lo cual se decide si el paciente es elegible para el procedimiento quirúrgico.

40 Para cada paciente individual, los beneficios potenciales de un procedimiento quirúrgico deben sopesarse frente a sus posibles efectos secundarios. Uno de estos posibles efectos secundarios es la lesión renal aguda. Debido a que el método de la presente invención permite una predicción del riesgo de forma individual, la decisión sobre un procedimiento quirúrgico puede tomarse en función de las necesidades y riesgos específicos del paciente. En consecuencia, al "decidir si un paciente de riesgo es elegible para un procedimiento quirúrgico" se pretende realizar una estratificación de riesgo como se describió anteriormente, para sopesar dicho riesgo y el beneficio de la intervención y para proporcionar una recomendación para llevar a cabo la intervención, o no.

45 En una realización preferida de la presente invención, el procedimiento quirúrgico es cirugía de revascularización coronaria. Aunque la CABG mejora la calidad de vida de los pacientes, no conduce a una supervivencia prolongada (Eagle et al., 1999, J. Am Coll Cardiol 34: 1262). Por lo tanto, en el caso de una CABG planificada, las consecuencias potencialmente letales de AKI deben sopesarse con la calidad de vida potencialmente mejorada después de CABG.

50 La decisión acerca de realizar el procedimiento quirúrgico en un paciente de riesgo se basa, preferiblemente, en las cantidades de referencia de GDF-15 dadas anteriormente en esta solicitud.

55 Se entenderá que, en otro aspecto del método de la presente invención, dicho método es un método para decidir si un paciente de riesgo es elegible para un procedimiento quirúrgico que comprende la etapa de comparar la cantidad de GDF-15 determinada en una muestra del paciente con una cantidad de referencia adecuada como se describe en otra parte del presente documento, para decidir si el paciente es elegible para un procedimiento quirúrgico.

60 En una realización preferida de la presente invención, se determina la cantidad de un péptido natriurético y/o troponina además de la cantidad de GDF-15.

Además, la presente invención se refiere al uso de un dispositivo para predecir en un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes y que será sometido a un procedimiento quirúrgico el riesgo de padecer una lesión renal aguda durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, dicho dispositivo comprende:

- 5 a) una unidad de análisis para determinar la cantidad de GDF-15 y opcionalmente troponina en una muestra del paciente obtenida antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico; y
 b) una unidad de evaluación para comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia adecuada.

10 El término "dispositivo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un sistema de medios que comprende al menos los medios mencionados anteriormente unidos operativamente entre sí para practicar el método de la presente invención. Los medios preferidos para determinar las cantidades de los marcadores de la presente invención, y los medios para llevar a cabo la comparación se describen más arriba en relación con el método de la invención. Cómo vincular los medios de una manera operativa dependerá del tipo de medio incluido en el dispositivo.

15 Por ejemplo, cuando se aplica una unidad de análisis para determinar automáticamente la cantidad de los productos génicos de la presente invención, los datos obtenidos por dicha unidad de análisis que opera automáticamente pueden procesarse, por ejemplo, mediante un ordenador como unidad de evaluación para obtener el resultado deseado. Preferiblemente, los medios están comprendidos por un único dispositivo en tal caso.

20 Dicho dispositivo, preferiblemente, incluye una unidad de análisis para la medición de la cantidad de GDF-15 y opcionalmente de troponina en una muestra aplicada y una unidad de evaluación para procesar los datos resultantes. Preferiblemente, la unidad de evaluación comprende una base de datos con las cantidades de referencia almacenadas y un código de programa informático que cuando se integra tangiblemente en un ordenador lleva a cabo la comparación de las cantidades determinadas y las cantidades de referencia almacenadas en la base
 25 de datos. Más preferiblemente, la unidad de evaluación comprende un código de programa informático adicional que asigna el resultado de la comparación a una predicción de riesgo. En tal caso, también se prevé, preferiblemente, que la unidad de evaluación comprenda una base de datos adicional en la que las cantidades de referencia se asignan a los riesgos.

30 Alternativamente, cuando se usan medios tales como tiras de prueba para determinar la cantidad de GDF-15 y opcionalmente de troponina, la unidad de evaluación puede comprender tiras de control o tablas que asignan la cantidad determinada a una cantidad de referencia. Las tiras de prueba están, preferiblemente, acopladas a ligandos que se unen específicamente a GDF-15. La tira o dispositivo, preferiblemente, comprende medios para la detección de la unión de dicho GDF-15 a dichos ligandos. Los medios preferidos para la detección se describen en relación
 35 con realizaciones relacionadas con el método de la invención anterior. En tal caso, la unidad de análisis y la unidad de evaluación están operativamente unidas porque el usuario del sistema reúne el resultado de la determinación de la cantidad y el valor de diagnóstico o pronóstico del mismo debido a las instrucciones e interpretaciones dadas en un manual. La unidad de análisis y la unidad de evaluación pueden aparecer como dispositivos separados en dicha realización y, preferiblemente, se empaquetan juntas como un kit. La persona experta en la materia se dará cuenta de cómo vincular los medios sin más preámbulos. Los dispositivos preferidos son aquellos que pueden aplicarse sin el conocimiento particular de un médico especializado, por ejemplo, tiras de prueba o dispositivos electrónicos que simplemente requieren ser cargados con una muestra. Los resultados se pueden dar como resultado de datos en bruto que necesitan interpretación por parte del médico. Preferiblemente, la salida del dispositivo es, sin embargo, procesada, es decir, evaluada, datos sin procesar cuya interpretación no requiere de un médico. Otros dispositivos
 45 preferidos comprenden las unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo, biosensores, matrices, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen específicamente el producto génico, dispositivos de resonancia de superficie de plasmón, espectrómetros de RMN, espectrómetros de masas, etc.) o unidades/dispositivos de evaluación mencionados anteriormente de acuerdo con el método de la invención.

50 Además, la presente invención se refiere al uso de un kit para predecir en un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes y que será sometido a un procedimiento quirúrgico, el riesgo de padecer una lesión renal aguda durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, comprendiendo dicho kit:

- 55 a) un agente de análisis para determinar la cantidad de GDF-15 y, opcionalmente, de troponina en una muestra del paciente obtenida antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico; y
 b) una unidad de evaluación para comparar las cantidades determinadas por el agente de análisis con una cantidad de referencia adecuada.

60 El término "kit" tal como se usa en el presente documento se refiere a una colección de los componentes mencionados anteriormente que pueden estar empaquetados o no conjuntamente. Los componentes del kit pueden incluir viales separados (es decir, como un kit de partes separadas) o proporcionados en un único vial. Además, debe entenderse que el kit de la presente invención se debe usar para practicar los métodos mencionados anteriormente en la presente memoria. Preferentemente, se prevé que todos los componentes se proporcionen de una manera lista para su uso para practicar los métodos mencionados anteriormente. Además, el kit preferiblemente
 65 contiene instrucciones para llevar a cabo dichos métodos. Las instrucciones pueden ser provistas por un manual de

usuario en papel o en forma electrónica. Por ejemplo, el manual puede comprender instrucciones para interpretar los resultados obtenidos cuando se llevan a cabo los métodos mencionados usando el kit de la presente invención. El kit debe comprender un agente de análisis. Este agente es capaz de reconocer específicamente GDF-15 en una muestra del sujeto. Además, dicho o dichos agente o agentes, al unirse al GDF-15, preferiblemente, serán capaces de generar una señal detectable, cuya intensidad se correlaciona con la cantidad de GDF-15 presente en la muestra.

Dependiendo del tipo de señal que se genere, se pueden aplicar métodos para la detección de la señal que son bien conocidos en la técnica. Los agentes analizadores que se usan preferiblemente para el kit de la presente invención incluyen anticuerpos o aptámeros. El agente de análisis puede estar presente en una tira de prueba como se describe en otra parte de este documento. Las cantidades de GDF-15 así detectadas pueden evaluarse adicionalmente en la unidad de evaluación. Las unidades de evaluación preferidas para ser usadas para el kit de la presente invención incluyen aquellas a las que se hace referencia en otra parte del presente documento.

El uso de GDF-15, o de un anticuerpo que se une específicamente a él, en una muestra de un paciente que será sometido a un procedimiento quirúrgico y que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes para predecir el riesgo de sufrir una lesión renal aguda durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, en donde la muestra se ha obtenido antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico.

Además, la presente invención se refiere al uso de GDF-15, o de un anticuerpo que se une específicamente al mismo, en una muestra de un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes para decidir si dicho paciente de riesgo es elegible para un procedimiento quirúrgico, en donde la muestra se ha obtenido antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico.

Además, la presente invención se refiere al uso de GDF-15, o de un anticuerpo que se une específicamente al mismo, en una muestra de sangre, suero o plasma de un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes, dicho paciente habiéndose sometido a un procedimiento quirúrgico para predecir el riesgo de que dicho paciente sufra una lesión renal aguda, en donde la muestra se ha obtenido dentro de un intervalo de tiempo de no más de 1 día después del procedimiento quirúrgico.

Los siguientes ejemplos están destinados únicamente a ilustrar la presente invención. No deben limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

Pacientes, materiales y métodos

Se incluyeron en el estudio un total de 126 pacientes consecutivos sometidos a cirugía de revascularización coronaria (CABG). Había 68 hombres y 58 mujeres, con una edad media de 68 (52-81) años. Los niveles séricos de creatinina eran normales en todos los pacientes. Todos los pacientes tenían dos o más enfermedades vasculares, como lo indicaba al menos una estenosis que excedía el 50% del canal central. Se hizo seguimiento a los pacientes durante 30 días con respecto a la mortalidad y el desarrollo de lesión renal aguda. Los puntos finales del estudio fueron: lesión renal aguda (AKI, aumento de creatinina de al menos 0,3 mg/dl dentro de los 3 días posteriores a la cirugía), nuevo requerimiento de hemodiálisis o mortalidad (dentro de los 30 días posteriores a la cirugía). Se tomó sangre antes de la cirugía e inmediatamente después, así como 1, 2 y 3 días después de la cirugía. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos y se almacenaron a -20°C hasta que se analizaron.

Se determinaron GDF-15, troponina T y NT-proBNP con inmunoensayos tipo sándwich usando analizadores COBAS de Roche/Hitachi. Los ensayos comprenden dos anticuerpos monoclonales específicos para el polipéptido respectivo. El primero de ellos está biotinilado y el segundo está marcado con un complejo de tris(2,2'-bipiridil)rutenio (II). En una primera etapa de incubación ambos anticuerpos se incuban con la muestra. Se forma un complejo tipo sándwich que comprende el péptido a determinar y los dos anticuerpos diferentes. En una siguiente etapa de incubación, se añaden perlas recubiertas de estreptavidina a este complejo. Las perlas se unen a los complejos tipo sándwich. La mezcla de reacción se aspira después en una celda de medición donde las perlas se capturan magnéticamente en 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 emitida depende de la cantidad de complejos tipo sándwich en el electrodo. El rango de medición del ensayo de troponina T fue de 3 pg/mL a 10.000 pg/mL y para GDF-15 fue de 300 pg/mL a 20.000 pg/mL. Se pudieron medir cantidades de NT-proBNP entre 5 pg/mL y 35.000 pg/mL.

Se determinó la creatinina usando una modificación del método de Jaffe (Foster-Swanson A et al., 1994, Clinical Chemistry, Abstract # 361; Seelig HP y Wüst H, 1969, Arztlisches Labor, 15: 34-39; Bartels H et al., 1972, Clinical Chimica Acta, 37: 193-197). Brevemente, el ácido picrónico reacciona con la creatinina en solución alcalina para formar un complejo amarillo-naranja. Dicho complejo se detectó fotométricamente con analizadores Roche/Hitachi.

Tabla 1a: Niveles de GDF-15 antes de la cirugía

Resultado	No AKI	AKI	Diálisis	Mortalidad
N	89	37	12	9
Mediana de GDF-15 [pg/mL]	1078	1717	2573	2442
Percentil 25 [pg/mL]	781	1101	1250	1626
Percentil 75 [pg/mL]	1401	2448	4508	3273

5

Tabla 1b: Niveles de troponina antes de la cirugía

Resultado	No AKI	AKI	Diálisis
N	89	37	12
Mediana de TnT [pg/mL]	13,34	25,52	60,89
Percentil 25 [pg/mL]	7,67	16,54	23,20
Percentil 75 [pg/mL]	33,11	62,01	495,97

Tabla 1c: Niveles de NT-proBNP antes de la cirugía

Resultado	No AKI	AKI	Diálisis
N	89	37	12
Mediana de NT-proBNP [pg/mL]	488,18	1385,49	2227,06
Percentil 25 [pg/mL]	160,26	481,45	794,08
Percentil 75 [pg/mL]	1118,66	2485,66	3358,61

10 Las tablas 1a a 1c muestran que el grupo de pacientes que sufren una lesión renal aguda después de CABP tiene medianas incrementadas de GDF-15, troponina T y GDF-15. Además, las medianas de los biomarcadores antes mencionados antes de la cirugía fueron más altas en el grupo de pacientes que sufrían un caso grave de AKI (que requiere hemodiálisis) después de la cirugía. Por lo tanto, la predicción por los biomarcadores diferencia entre diferentes severidades de AKI.

15

Tabla 2a: niveles de GDF-15 [pg/mL] en diferentes momentos después de la cirugía

	Sin AKI*	AKI*	Diálisis*	Mortalidad*
Inmediatamente después de la cirugía	1807	3389	6393	5256
	1337-3467	2036-6584	3571-7653	3401-8099
1 día después de la cirugía	6375	11988	14507	9786
	4177-8603	8393-20600	9525-22230	8605-14260
2 días después de la cirugía	2352	8034	8929	8930
	1619-3201	3985-11748	5233-13038	5087-13774
3 días después de la cirugía	1903	4675	5938	5652
	1487-3033	3397-7731	4366-11022	4150-8408
*Valores de la mediana, percentiles 25 y 75				

20

Tabla 2b: Niveles de troponina T [pg/mL] en diferentes momentos después de la cirugía

	Sin AKI*	AKI*	Diálisis*
Inmediatamente después de la cirugía	312,39	593,14	640,34
	176,63-503,56	139,87-1908,04	549,87-1421,68
1 día después de la cirugía	863,85	1108,10	1280,91
	364,48-1217,33	448,83-3612,46	500,98-5439,78
2 días después de la cirugía	537,61	739,07	981,30
	279,53-855,98	387,11-2074,96	357,56-2006,06
3 días después de la cirugía	370,92	492,60	574,96
	182,70-812,45	310,91-1424,18	315,58-1724,62
*Valores de la mediana, percentiles 25 y 75			

5

Tabla 2c: Niveles de NT-proBNP [pg/mL] en diferentes momentos después de la cirugía

	No AKI*	AKI*	Diálisis*
Inmediatamente después de la cirugía	368,58	924,62	1933,30
	139,15-940,25	381,57-2124,55	914,53-5824,65
1 día después de la cirugía	1560,68	1972,22	4876,65
	914,09-2565,12	1086,06-4686,00	3296,20-6485,33
2 días después de la cirugía	2717,21	4953,24	6597,74
	1667,04-4618,54	2344,10-10839,93	2978,74-13846,26
3 días después de la cirugía	2825,03	4983,66	5291,93
	1812,31-5393,36	2661,26-9243,66	4092,11-12000,25
*Valores de la mediana, percentiles 25 y 75			

10 Como se puede observar a partir de la Tabla 2a a 2c, los pacientes que probablemente experimenten complicaciones también pueden identificarse después de la cirugía cardiovascular. Los marcadores no solo predicen la aparición de AKI sino también la gravedad. Los pacientes que padecían un caso grave de AKI que requirieron hemodiálisis tenían generalmente niveles más altos de GDF-15, troponina T y NT-proBNP que los pacientes que sufrían de AKI sin la necesidad de hemodiálisis.

15

Ejemplo 2

Casos de pacientes individuales

20 Caso 1:

Varón de 62 años, que padecía una enfermedad de 3 vasos con estenosis múltiples, se sometió a CABG. Tenía hipertensión arterial de larga duración, sin diabetes mellitus ni antecedentes de tabaquismo. Sus lípidos estaban en el rango normal. Tenía, sin embargo, una historia de obesidad. Antes y después de la cirugía se obtuvieron los siguientes resultados:

25

	Antes de la cirugía	Después de la cirugía	1 día después de la cirugía	2 días después de la cirugía	3 días después de la cirugía
Creatinina [mg/dl]	0,80	0,72	0,90	0,81	0,84
GDF-15 [pg/mL]	1.700	1.800	5.600	2.900	1.900
TnT [pg/mL]	12,9	316,0	582,0	416,0	352,0
NT-proBNP [pg/mL]	380	410	1420	1530	1380

El paciente se recuperó de la CABG sin más complicaciones. No se produjo AKI.

- 5 Antes de la cirugía, las cantidades de GDF-15 y NT-proBNP estaban por debajo de la cantidad de referencia que indica un mayor riesgo de AKI después de la cirugía (1.717 pg/mL y 1.119 pg/mL, respectivamente). La cantidad de troponina T incluso indicó que se podía descartar un mayor riesgo de AKI (TnT por debajo de 13,3 pg/mL).

Caso 2

- 10 Varón de 58 años, que padecía una enfermedad de 2 vasos con estenosis múltiples, se sometió a CABG. Era fumador anterior, tenía hipertensión arterial y no tenía diabetes mellitus. Sus lípidos estaban en el rango normal. Antes y después de la cirugía se obtuvieron los siguientes resultados:

	Antes de la cirugía	Después de la cirugía	1 día después de la cirugía	2 días después de la cirugía	3 días después de la cirugía
Creatinina[mg/dl]	1,15	1,08	1,40	2,1	1,6
GDF-15 [pg/mL]	3.200	3.300	10.000	13.000	4.100
TnT [pg/mL]	23,9	621,0	490,0	380,0	210,0
NT-proBNP [pg/mL]	1.480	2.010	3.860	3.540	3790

- 15 El paciente experimentó una lesión renal aguda, pero se recuperó espontáneamente sin necesidad de diálisis aguda.

La cantidad de GDF-15 determinada antes de la cirugía indicó un mayor riesgo de AKI que requería terapia de reemplazo renal. La cantidad de troponina T estaba justo por debajo del umbral, lo que indica un mayor riesgo de AKI (25,5 pg/mL). La cantidad de NT-proBNP indicó un aumento en el riesgo de AKI. Tomados en conjunto, 2 de 3 marcadores indicaron la presencia de un mayor riesgo de AKI. La necesidad de hemodiálisis también fue predicha por un marcador. Por lo tanto, la aparición de AKI se ajusta a la expectativa.

Caso 3:

- 25 Se sometió a CABG a un varón de 62 años que padecía una extensa enfermedad de 3 vasos. Tenía disnea antes de la cirugía e informó episodios de insuficiencia cardíaca sintomática en el pasado que fueron tratados con inhibidores de la ACE, bloqueadores beta y diuréticos. Su función renal era marginal y cambió con el uso de diuréticos del asa.

- 30 Su perfil de riesgo incluía ser fumador, hipertensión arterial y obesidad, pero últimamente perdió peso. Antes y después de la cirugía se obtuvieron los siguientes valores:

	Antes de la cirugía	Después de la cirugía	1 día después de la cirugía	2 días después de la cirugía	3 días después de la cirugía
Creatinina [mg/dl]	1,2	1,3	1,6	3,2	4,5
GDF-15 [pg/mL]	2.416	5.820	9.210	8.760	5.820
TnT [pg/mL]	62,3	657,0	1380,0	975,0	612,0
NT-proBNP [pg/mL]	2.480	1.980	4.920	6.370	5.910

El paciente sufrió una AKI después de la cirugía y requirió hemodiálisis.

35

La troponina T y el NT-proBNP indicaron un mayor riesgo de AKI que requería hemodiálisis. La cantidad de GDF-15 antes de la cirugía estuvo justo por debajo del valor de referencia que indica el riesgo de AKI que requiere hemodiálisis (2.573 pg/mL). Por lo tanto, los tres marcadores predijeron correctamente la aparición de AKI y dos marcadores también predijeron correctamente un caso grave de AKI que requiere hemodiálisis.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para predecir en un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes y que será sometido a un procedimiento quirúrgico, el riesgo de padecer una lesión renal aguda durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 a) determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra del paciente que se ha obtenido antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico; y
b) comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia, mediante lo cual se predice el riesgo de que el paciente sufra una lesión renal aguda durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico.
- 15 2. Un método para decidir si un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes es elegible para un procedimiento quirúrgico que comprende las etapas de:
- 15 a) determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra del paciente que se ha obtenido antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico;
b) comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia, mediante lo cual se decide si el paciente es elegible para el procedimiento quirúrgico.
- 20 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que adicionalmente se determina la cantidad de un péptido natriurético y/o de troponina y se compara con una cantidad de referencia (cantidades de referencia).
4. El método de la reivindicación 3, en el que el péptido natriurético es NT-proBNP.
- 25 5. Un método para predecir en un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes y que ha sido sometido a un procedimiento quirúrgico, el riesgo de padecer una lesión renal aguda que comprende las etapas de:
- 30 a) determinar la cantidad de GDF-15 en una muestra de sangre, suero o plasma del paciente; y
b) comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia, mediante lo cual se predice el riesgo de que el paciente sufra una lesión renal aguda,
- donde la muestra se ha obtenido dentro de un intervalo de tiempo de no más de 1 día después del procedimiento quirúrgico.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en el que adicionalmente se determina y se compara la cantidad de un péptido natriurético y/o troponina con una cantidad de referencia.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el péptido natriurético es NT-proBNP
- 40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la lesión renal aguda requiere hemodiálisis.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el procedimiento quirúrgico es cirugía cardíaca, en particular cirugía de revascularización coronaria.
- 45 10. El uso de un dispositivo para predecir en un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes y que será sometido a un procedimiento quirúrgico, el riesgo de padecer una lesión renal aguda durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, comprendiendo dicho dispositivo:
- 50 a) una unidad de análisis para determinar la cantidad de GDF-15 y, opcionalmente, troponina, en una muestra del paciente obtenida antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico; y
b) una unidad de evaluación para comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia adecuada.
- 55 11. El uso de un kit para predecir en un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes y que será sometido a un procedimiento quirúrgico, el riesgo de padecer una lesión renal aguda durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, comprendiendo dicho kit:
- 60 a) un agente de análisis para determinar la cantidad de GDF-15 y, opcionalmente, troponina en una muestra del paciente obtenida antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico; y
b) una unidad de evaluación para comparar las cantidades determinadas por el agente de análisis con una cantidad de referencia adecuada.
- 65 12. El uso de GDF-15, o de un anticuerpo que se une específicamente al mismo, en una muestra de un paciente que será sometido a un procedimiento quirúrgico y que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes para predecir el riesgo de padecer una lesión renal aguda durante o inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, en el que la muestra se ha obtenido antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico.

13. El uso de GDF-15, o de un anticuerpo que se une específicamente al mismo, en una muestra de un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes para decidir si dicho paciente de riesgo es elegible para un procedimiento quirúrgico, en donde la muestra ha sido obtenida antes de que el paciente se someta al procedimiento quirúrgico.

5

14. El uso de GDF-15, o de un anticuerpo que se une específicamente al mismo, en una muestra de sangre, suero o plasma de un paciente que padece una enfermedad cardiovascular y/o diabetes, habiendo sido sometido dicho paciente a un procedimiento quirúrgico para predecir el riesgo de que dicho paciente sufra una lesión renal aguda, en donde la muestra se ha obtenido dentro de un intervalo de tiempo no mayor de 1 día después del procedimiento quirúrgico.

10