

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 027**

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: **26.10.2007 PCT/DE2007/001928**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2008 WO08049422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2007 E 07846265 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2084543**

54 Título: **Estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo por medio de fragmentos / péptidos parciales de la provasopresina, en particular copeptina o neurofisina II**

30 Prioridad:

**26.10.2006 DE 102006050497**

**04.12.2006 DE 102006057409**

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

**31.01.2018**

73 Titular/es:

**B.R.A.H.M.S. GMBH (100.0%)**

**NEUENDORFSTRASSE 25**

**16761 HENNIGSDORF, DE**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS;**

**MORGENTHALER, NILS;**

**PAPASSOTIRIOU, JANA;**

**STRUCK, JOACHIM y**

**LEONG, L., NG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 652 027 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

Estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo por medio de fragmentos / péptidos parciales de la provasopresina, en particular coceptina o neurofisisina II

5 La invención se refiere a un procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo (SCA), en particular del infarto de miocardio agudo (IMA), en el que se realiza una determinación de coceptina o neurofisisina II por medio de un diagnóstico *in vitro*. Además se refiere la invención a combinaciones de biomarcadores adecuadas para ello para el diagnóstico *in vitro*.

10 La estratificación de riesgo tiene una importancia creciente en el sector de las cardiopatías, ya sea en pacientes sintomáticos o asintomáticos. En particular en el campo del síndrome coronario agudo existe una alta necesidad de una estratificación de riesgo adecuada.

15 La estratificación de riesgo sirve para la detección de pacientes con el peor pronóstico, con el fin de permitir un diagnóstico y una terapia/tratamiento más intenso con el objetivo de un desarrollo a ser posible favorable. Una estratificación de riesgo adecuada debía acarrear según esto procedimientos de tratamiento eficaces, que se proporcionan en el caso del síndrome coronario agudo con las intervenciones coronarias percutáneas y los fármacos más novedosos.

20 Para una terapia adecuada es necesario encontrar un diagnóstico precoz y una diferenciación del síndrome coronario agudo ya en la unidad de urgencias en unión con la necesidad de decisiones médicas. Debido a los síntomas inespecíficos (dolor de pecho) en el caso del síndrome coronario agudo es esencial tanto la diferenciación y delimitación de otras enfermedades como también el reconocimiento del síndrome coronario agudo.

25 En el estado de la técnica se han presentado marcadores bioquímicos - en particular los clásicos tales como troponinas cardíacas, mioglobina y masa de CK-MB - para el pronóstico de un infarto de miocardio (Katus, H. A.; Remppis, A.; Scheffold, T.; Diederich, K. W. y Kuebler, W. (1991): Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction, Am J Cardiol 67 (16): 1360-1367). Como otro marcador bioquímico eficaz ha resultado en el diagnóstico de miocardio el péptido natriurético tipo B (BNP) junto con Pro-BNP (NT-ProBNP) (documentos EP1363128B1, EP1666881A2).

30 La coceptina (también: proAVP C-terminal) se ha descrito en el documento WO 2006/018315 (BRAHMS AG) como biomarcador para el diagnóstico *in vitro* de IMA. Un correspondiente ensayo de coceptina se divulga en Morgenthaler *et al.* (Nils G. Morgenthaler, Joachim Struck, Christine Alonso and Andreas Bergmann, Assay for the Measurement of Copeptin, a Stable Peptide Derived from the Precursor of Vasopressin Clinical Chemistry 52: 112-119, 2006).

35 El documento EP 1 628 136 A1 describe la idoneidad y el uso potenciales de coceptina para el diagnóstico *in vitro* de enfermedades cardiovasculares y cardiopatías.

El documento EP 1 363 128 A1 divulga una combinación de marcadores para el diagnóstico del síndrome coronario agudo, que sin embargo no contiene coceptina.

40 Morgenthaler N. G. *et al.* "Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin", CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, tomo 52, n.º 1, 1 de enero de 2006, páginas 112-119, describen la determinación de coceptina como "marcador sustituto" para arginina-vasopresina.

45 Stoiser B. *et al.* "Copeptin, a fragment of the vasopressin precursor, as a novel predictor of outcome in heart failure", EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, WILEYBLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, tomo 36, n.º 11, 1 de noviembre de 2006, páginas 771-778, describen la idoneidad y el uso potenciales de coceptina para el diagnóstico *in vitro* de insuficiencia cardíaca, sin embargo con publicación tras la fecha de prioridad.

50 Neurofisisina se ha descrito hasta ahora como marcador para la absorción de nicotina (Robinson AG. Isolation, assay, and secretion of individual human neurophysins. J Clin Invest 1975;55:360-7), SIADH (*Syndrome of inappropriate ADH secretion*, síndrome de la secreción inadecuada de ADH) asociado a cáncer y no asociado a cáncer y diabetes insípida nefrogénica (Pullan PT, Clappison BH, Johnston CI. Plasma vasopressin and human neurophysins in physiological and pathological states associated with changes in vasopressin secretion. J Clin Endocrinol Metab 1979;49:580-7; North WG, LaRoche FT, Jr., Melton J, Mills RC. Isolation and partial characterization of two human neurophysins: their use in the development of specific radioimmunoassays. J Clin Endocrinol Metab 1980; 51:884-91).

55 Sin embargo es desventajoso en los procedimientos de diagnóstico conocidos usando los marcadores conocidos hasta ahora que no se llegue a un registro precoz y completo de pacientes de riesgo y por tanto se realice una estratificación de riesgo sólo de manera insuficiente. Por tanto, un objetivo en el que se basa la invención consiste

en desarrollar un procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo, que permita un registro mejorado de pacientes de riesgo.

5 Además es desventajoso que en el estado de la técnica en la mayoría de los casos no se consiga ninguna sensibilidad y/o especificidad suficiente de los marcadores.

Otro objetivo consiste por tanto en facilitar un procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo, en el que al menos un marcador o una combinación de marcadores presente una suficiente sensibilidad y especificidad en un diagnóstico *in vitro*.

10 Por tanto, el objetivo de la presente invención es facilitar un procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo. El objetivo se soluciona mediante un procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo, en el que se realiza una determinación de copeptina o neurofina II por medio de un diagnóstico *in vitro* (a continuación procedimiento de acuerdo con la invención).

15 De manera sorprendente presentan copeptina o neurofina II una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico del síndrome coronario agudo (véanse los ejemplos y figuras).

20 El término "síndrome coronario agudo" comprende distintas fases de la cardiopatía coronaria, que son directamente amenazantes para la vida. Esto se refiere en particular a la medicina de urgencias, y concretamente a un infarto de miocardio agudo y / o angina de pecho así como una muerte cardíaca repentina. Además del infarto de miocardio agudo, que se define según los criterios de la OMS (WHO (1979): Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature, Circulation 59 (3): 607-609) como acontecimiento de dolor de pecho agudo, que dura más de 20 minutos, unido con elevaciones del segmento ST y/o un aumento de las enzimas miocárdicas, se caracterizó el término de la angina de pecho inestable (AP), que pueden leerse de acuerdo con la invención por "síndrome coronario agudo" (Hamm CW: Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS) - parte 1: ACS ohne persistierende ST-Hebung. Z Kardiol (2004) 93:72-90; véase también: Pschyrembel, De Gruyter, Berlín 2004).

30 El término "estratificación de riesgo" comprende de acuerdo con la invención la detección de pacientes, en particular pacientes de urgencias y pacientes de riesgo, con el peor pronóstico, para permitir un diagnóstico y terapia/tratamiento más intensos del síndrome coronario agudo, en particular infarto de miocardio, con el objetivo de un desarrollo a ser posible favorable. Una estratificación de riesgo de acuerdo con la invención permite en consecuencia un procedimiento de tratamiento eficaz, que se proporciona en el caso de síndrome coronario agudo con las intervenciones coronarias percutáneas y los fármacos más novedosos.

35 Por tanto se refiere la invención igualmente a la identificación de pacientes con elevado riesgo o/y un pronóstico desfavorable de un síndrome coronario agudo, en particular infarto de miocardio, y concretamente en pacientes sintomáticos y / o asintomáticos, en particular pacientes de urgencia.

40 De manera especialmente ventajosa puede realizarse en particular en casos de medicina de urgencias y/o cuidados intensivos por medio del procedimiento de acuerdo con la invención una estratificación segura. El procedimiento de acuerdo con la invención permite por tanto decisiones médicas que conducen a un éxito de la terapia rápido y a la evitación de casos de muerte. Tales decisiones médicas comprenden igualmente tratamiento continuado por medio de fármacos para el tratamiento o la terapia del síndrome coronario agudo, en particular infarto de miocardio (IMA) y de la angina de pecho (AP).

45 Por tanto se refiere la invención igualmente a un procedimiento para la estratificación de riesgo de pacientes con un síndrome coronario agudo para la realización de decisiones médicas, tal como tratamiento y terapia continuados por medio de fármacos, preferentemente en los cuidados intensivos o medicina de urgencias temporalmente críticos.

50 En otra forma de realización preferente se refiere el procedimiento de acuerdo con la invención por tanto al control de terapia del síndrome coronario agudo, en particular infarto de miocardio (IMA).

55 En otra forma de realización preferente del procedimiento de acuerdo con la invención se realiza la estratificación de riesgo para el pronóstico, para el reconocimiento precoz y reconocimiento diagnóstico diferencial, para la evaluación del grado de gravedad y para la evaluación de desarrollo concomitante de terapia.

60 En otra forma de realización preferente se refiere la invención a un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* para el diagnóstico precoz o diagnóstico diferencial o pronóstico de infarto de miocardio o angina de pecho, en el que se realiza una determinación de copeptina o neurofina II en un paciente que va a someterse a estudio.

65 Además se refiere la invención a un procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo o a un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* para el diagnóstico precoz o diagnóstico diferencial o pronóstico de infarto de miocardio según una de las formas de realización anteriores, en el que tras la aparición de los síntomas es

un intervalo de valor de corte (valor umbral) de 6-20 pmol/l de coceptina o neurofina II significativo (específico) para el diagnóstico y / o la estratificación de riesgo. Además se prefiere un valor de corte (valor umbral) de 6-10 pmol/l, en particular 7,5 pmol/l, preferentemente hasta 2 horas tras la aparición de los síntomas.

5 Además se refiere la invención a un procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo o a un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* para el diagnóstico precoz o diagnóstico diferencial o pronóstico de infarto de miocardio según una de las formas de realización anteriores, en el que tras la aparición de los síntomas es un intervalo de valor de corte (valor umbral) de 10-30 pmol/l de los marcadores coceptina o neurofina II significativo (específico) para el pronóstico y / o la estratificación de riesgo. Además se prefiere un valor de corte (valor umbral) de 10-20 pmol/l. A partir de esta base son ventajosamente sensibles estos procedimientos de acuerdo con la invención.

15 En una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención se extrae del paciente que va a someterse a estudio líquido corporal, en particular sangre, opcionalmente sangre completa o suero o plasma que puede obtenerse y el diagnóstico se realiza *in vitro/ex vivo*, es decir fuera del cuerpo humano o animal. Debido a la determinación del marcador provasopresina (proAVP) o fragmentos y péptidos parciales de la misma, en particular coceptina o neurofina II se consigue una alta sensibilidad y especificidad para el síndrome coronario agudo, infarto de miocardio y angina de pecho y por medio de la cantidad presente en al menos una muestra del paciente puede realizarse el diagnóstico o la estratificación de riesgo. Sin embargo de manera muy especialmente preferente el marcador es coceptina (fragmento estable de proAVP o bien preprovasopresina). Igualmente de manera especialmente preferente, el marcador es neurofina II (fragmento estable de proAVP o bien preprovasopresina).

25 En el contexto de esta invención se entiende por "provasopresina" una proteína o un polipéptido humanos, que puede obtenerse a partir de la preprovasopresina y en el contexto de la preprovasopresina que comprende los aminoácidos 29-164 (véase igualmente el documento WO2006/018315 y la figura 3) y fragmentos que pueden obtenerse a partir de esto, concretamente coceptina (fragmento: AA 126-164 (39AA: SEQ: ASDRSNATQL DGPAGALLLR LVQLAGAPEP FEPAQPDAY) o neurofina II (fragmento: AA 32-124 de la preprovasopresina (93AA: SEQ: AMSDLELRQC LPCGPGGKGR CFGPSICCAD ELGCFVGTAE ALRCQEENYL PSPCQSGQKA CGSGGRCAAF GVCCNDESCV TEPECREGFH RRA). Además pueden presentar estos polipéptidos de acuerdo con la invención modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación, lip(o)idización o derivatizaciones.

35 En otra forma de realización preferente se refiere la invención al diagnóstico y / o a la estratificación de riesgo y / o al diagnóstico precoz o diagnóstico diferencial y / o pronóstico del síndrome coronario agudo, en particular infarto de miocardio (IMA), en el que se realiza una determinación de neurofina II en un paciente que va a someterse a estudio.

En otra forma de realización puede realizarse la determinación de coceptina o neurofina II adicionalmente con otros marcadores y concretamente de manera preferente aquéllos que indican ya un síndrome coronario agudo, en particular infarto de miocardio.

40 Por tanto se refiere la invención a una forma de realización tal del procedimiento de acuerdo con la invención, en el que la determinación se realiza adicionalmente con al menos otro marcador seleccionado del grupo de marcadores inflamatorios, marcadores cardiovasculares, marcadores neurohormonales o marcadores isquémicos en un paciente que va a someterse a estudio.

45 De acuerdo con la invención puede seleccionarse el marcador inflamatorio de al menos un marcador del grupo de proteína C reactiva (PCR), citocinas, tal como por ejemplo TNF-alfa, interleucinas, tal como por ejemplo IL-6, procalcitonina (1-116, 3-116) y moléculas de adhesión, tal como VCAM o ICAM así como puede seleccionarse el marcador cardiovascular, en particular un marcador que indica necrosis de tejido de músculo cardíaco y marcador que influye en la tensión arterial, de al menos un marcador del grupo de creatina cinasa, mioglobina, mieloperoxidasa, proteína natriurética, en particular ANP (o bien ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o en cada caso una secuencia parcial de las mismas, troponina cardíaca, PCR. Además se entiende por esto igualmente (pro)hormonas que regulan la circulación, en particular tales como péptido de liberación de progastrina (proGRP), pro-endotelina-1, pro-leptina, pro-neuropéptido-Y, pro-somatostatina, pro-neuropéptido-YY, pro-opiomelanocortina o pro-adrenomedulina (proADM) o en cada caso una secuencia parcial de los mismos. El marcador isquémico puede seleccionarse de al menos un marcador del grupo troponina I y T, CK-MB. Además puede ser el marcador neurohormonal al menos una proteína natriurética, en particular ANP (o bien ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o en cada caso una secuencia parcial de las mismas.

60 En una forma de realización especialmente preferente se refiere la invención a una combinación especialmente ventajosa de biomarcadores coceptina o neurofina II con proteínas natriuréticas, en particular ANP (o bien ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP.

65 Por tanto se refiere la invención a un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* del síndrome coronario agudo o infarto de miocardio, en el que se realiza una determinación de coceptina o neurofina II en combinación con proteínas natriuréticas, en particular ANP (o bien ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o en cada caso una secuencia parcial de las mismas, en un paciente que va a someterse a estudio. Se prefiere especialmente

a su vez una combinación de neurofisiina II, coceptina y BNP, proBNP, NT-proBNP, en particular coceptina y proBNP.

5 De manera especialmente ventajosa, estas combinaciones de biomarcadores mencionadas presentan sinergias, que conducen a una especificidad y sensibilidad mejorada para el diagnóstico (véanse ejemplos).

10 En otra forma de realización de la invención puede realizarse el procedimiento de acuerdo con la invención en el contexto de un diagnóstico *in vitro* por medio de determinaciones paralelas o simultáneas de los marcadores (por ejemplo placas de titulación múltiple con 96 y más cavidades), en el que se realizan las determinaciones en al menos una muestra del paciente.

15 Además puede realizarse el procedimiento de acuerdo con la invención y sus determinaciones en un dispositivo diagnóstico por medio de un dispositivo automático de análisis, en particular por medio de un Kryptor (<http://www.kryptor.net/>).

20 En otra forma de realización puede realizarse el procedimiento de acuerdo con la invención y sus determinaciones por medio de un ensayo rápido (por ejemplo ensayo de flujo lateral), ya sea en determinación de un parámetro individual o de múltiples parámetros. En una forma de realización especialmente preferente se trata de un auto-ensayo o de un dispositivo que es adecuado en el diagnóstico de urgencias.

25 Además se refiere la invención al uso de coceptina o neurofisiina II para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo o infarto de miocardio y/o para el diagnóstico *in vitro* para el diagnóstico precoz o diagnóstico diferencial o pronóstico de infarto de miocardio.

30 En una forma de realización especial se refiere la invención al uso de coceptina o neurofisiina II en combinación con proteínas natriuréticas, en particular ANP (o bien ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NTproBNP o en cada caso una secuencia parcial de las mismas, para el diagnóstico y / o la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo, infarto de miocardio o angina de pecho.

35 Otro objetivo es la facilitación de un correspondiente dispositivo diagnóstico para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención.

40 En el contexto de esta invención se entiende por un dispositivo diagnóstico de este tipo, en particular una matriz o ensayo (por ejemplo inmunoensayo, ELISA etc.), en el sentido más amplio un dispositivo para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención.

45 La invención se refiere además a un kit para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo, y/o infarto de miocardio, que contiene reactivos de detección para la determinación de coceptina o neurofisiina II, eventualmente los otros marcadores mencionados anteriormente. Tales reactivos de detección comprenden por ejemplo anticuerpos, etc.

50 En una forma de realización especial se refiere la invención a un kit para el diagnóstico y / o la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo y/o infarto de miocardio, que contiene reactivos de detección para la determinación de coceptina o neurofisiina II en combinación con proteínas natriuréticas, en particular ANP (o bien ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o en cada caso una secuencia parcial de las mismas, eventualmente los otros marcadores mencionados anteriormente. Tales reactivos de detección comprenden por ejemplo anticuerpos, etc.

55 Los siguientes ejemplos y figuras sirven para la explicación en más detalle de la invención, sin embargo sin limitar la invención a estos ejemplos y figuras. La invención está definida por las reivindicaciones.

#### **Ejemplos y figuras:**

60 A pacientes que se han personado con el síntoma guía del dolor de pecho en las urgencias de un hospital, se les extrajo una muestra de sangre durante la exploración inicial.

131 pacientes con infarto de miocardio (IM) (media de edad: 64,0 años) se observaron en un espacio de tiempo de en total 180 días tras producirse los síntomas de IM agudo:

65 En el intervalo de las primeras 6 horas tras la aparición de síntomas (dolor de pecho) y el ingreso en el hospital se realizaron 3 extracciones de sangre en cada caso en el intervalo de los espacios de tiempo 0-2 horas, 2-4 horas, y 4-6 horas tras producirse la sintomatología de IM. Se realizó en cada caso la determinación de coceptina y NT-ProBNP.

Tras la hospitalización se realizó en el intervalo de los primeros 4 días tras intervenciones terapéuticas (patrón, véase Braunwald *et al*, 2002) (día 2-5) en cada caso 1 extracción de sangre con determinación posterior de coceptina).

- 5 Tras el alta (media de la estancia en el hospital: 7,2 días) se realizó la observación de los pacientes en un espacio de tiempo de 180 días. Como acontecimientos (events) se registraron el desarrollo de una insuficiencia cardíaca grave y/o muerte del paciente. De los pacientes observados estaban 115 sin acontecimientos (o.E.) y 16 con acontecimientos (+E.). Las medias de edad de los grupos ascendían a 63,8 y 64,5 años.
- 10 Para la evaluación de la capacidad de rendimiento diagnóstica de los biomarcadores para el diagnóstico precoz del IM así como para la estratificación de riesgo se realizó la comparación de los resultados de las extracciones de sangre individuales en pacientes con aquéllos de 200 personas (media de edad: 65,2 años), que no mostraban indicios de un IM (controles). Los resultados están representados en la tabla 1 y en las figuras 1 y 2.
- 15 En la tabla 1 están indicadas las sensibilidades (valores > valor de corte (valor umbral)) en pacientes con IM frente a las correspondientes especificidades (valores < valor de corte (valor umbral)) en los controles con respecto a los tiempos indicados tras producirse los síntomas.

20 Ya en el intervalo del espacio de tiempo de observación mas temprano (0-2 horas) en comparación con controles aumenta mucho la coceptina. Por ejemplo mostraba sólo el 4,5 % de todos los controles un valor de coceptina, que se encuentra más alto que 7,5 pmol/l (valor de corte ejemplar (valor umbral)) (especificidad= 95,5 %), mientras que el 78,3 % de los pacientes sin acontecimientos posteriores e incluso el 87,5 % de los pacientes con acontecimientos presentaban concentraciones de coceptina por encima de 7,5 pmol/l (sensibilidad). En comparación con los marcadores usados hasta ahora en el diagnóstico rutinario (troponinas, mioglobina, CK-MB) resultan aumentos sorprendentes de las sensibilidades en momentos, que permiten ahora el uso de estos biomarcadores para el diagnóstico precoz o bien el diagnóstico diferencial del IM así como para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo. (Troponinas; CK-MB aparecen por regla general no antes de las 6 horas post-acontecimiento, mioglobina si bien aparece con baja sensibilidad de manera temprana, sin embargo disminuye de nuevo tras aprox. 2 horas, es decir resulta un intervalo diagnóstico incierto.) Ventajosamente es de importancia subordinada el aumento de coceptina, es decir el momento de la extracción de sangre para el diagnóstico precoz (en el valor de corte 7,5 pmol/l por ejemplo el 78,3/ 80,0/ 73 % de sensibilidad en 0-2/2-4/4-6 horas, respectivamente.

35 Combinación con proBNP o NT-ProBNP. Sorprendentemente se muestra que la combinación de la coceptina con proBNP (NT-ProBNP) permite un claro aumento de la sensibilidad del diagnóstico precoz del IM (véase la tabla 1). Si bien es la proBNP (NT-ProBNP) inferior a la capacidad de rendimiento diagnóstica de la coceptina, sin embargo por ejemplo en la evaluación de coceptina > 7,5 pmol/l y/o proBNP (NT-ProBNP) > 200 pmol/ml con una especificidad comparable a los marcadores individuales correspondientes de aprox. el 95 % permite un aumento de las sensibilidades en todos los momentos en el grupo de no acontecimiento del 3-6 % y en el grupo de acontecimiento del 6-9,5 % en comparación con las sensibilidades de la coceptina como marcadores individuales.

40

Tabla 1:

	0-2 h o.E.	0-2 h +E.	2-4 h o.E.	2-4 h +E.	4-6 h o.E.	4-6 h +E.	Controles (especificidad)
Copeptina (pmol/l)							
Sens./espec. para valor de corte 6	88,7 %	93,8 %	89,6 %	93,8 %	80,0 %	87,5 %	93,0 %
Sens./espec. para valor de corte 7,5	78,3 %	87,5 %	80,0 %	87,5 %	73,0 %	75,0 %	95,5 %
Sens./espec. para valor de corte 10	67,0 %	68,8 %	68,7 %	68,8 %	56,5 %	68,8 %	97,5 %
Sens./espec. para valor de corte 20	44,3 %	68,8 %	43,5 %	68,8 %	40,0 %	62,5 %	100,0 %
NT-ProBNP (pmol/ml), valor de corte 200	58,5 %	62,0 %	61,5 %	65,0 %	66,5 %	70,0 %	94,5 %
Combinación: coceptina > 7,5 pmol/l y/o NT-ProBNP >200 pmol/ml	81,2 %	93,5 %	83,5 %	96,0 %	79,5 %	84,5 %	93,8 %

Obtención de muestras, análisis de biomarcadores:

- 45 Las extracciones de sangre se realizaron por medio de Monovette de suero estándar. Tras un tiempo de coagulación de 20-40 min se realizó una centrifugación durante 15 min a 2000 g, la separación del suero posterior se realizó mediante decantación. Hasta el uso posterior se almacenaron las muestras de suero a -20 grados C.

NT-ProBNP se determinó según Omland *et al* (Omland T, Persson A, Ng L, *et al*. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002; 106: 2913-2918) con un inmunoensayo de luminiscencia.

5 Copeptina se determinó por medio del inmunoensayo de luminiscencia de copeptina de la empresa Brahms AG. El procedimiento de determinación de copeptina se ha descrito en detalle en Morgenthaler NG *et al* *Clin. Chem.* enero de 2006, 52(1),112-9. En resumen: 50 microlitros de muestra se pipetea en un tubo revestido con anticuerpo de copeptina (AK1) y se mezclan con en cada caso 200 microlitros de una solución de anticuerpo anti-copeptina (AK2) marcado con éster de acridinio y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras la separación de anticuerpo marcado no unido (libre) por medio de lavado de cuatro veces con solución de lavado (Lumitest Waschlösung, Brahms AG) se realizó la determinación de anticuerpos marcados con éster de acridinio unidos en un luminómetro de la empresa Berthold.

15 Pronóstico (predicción del comienzo del acontecimiento):

Se mostró sorprendentemente que pacientes con IM con acontecimientos en el intervalo de los siguientes 180 días post-hospitalización presentaban aún concentraciones de copeptina más altas que aquéllos sin acontecimientos. Ya en el intervalo de 6 horas tras el comienzo de los síntomas de IM muestra la copeptina en el valor de corte a modo de ejemplo (valor umbral) de 30 pmol/l un riesgo relativo de aprox. 1:2 (pacientes con una copeptina > 30 tienen un riesgo dos veces más alto de acontecimientos posteriores, que los pacientes < 30 pmol/l.

De acuerdo con lo esperado disminuyen las concentraciones tras las intervenciones terapéuticas (día 2 y siguientes, tabla 2b). En este caso se muestra sorprendentemente que pacientes con acontecimiento posterior presentan una reducción claramente más baja del biomarcador. Esto desemboca en un fuerte aumento del riesgo hasta valores de hasta 1:7,14 en pacientes con un valor de copeptina más alto que 30 pmol/l.

Tabla 2a

	0-2 h +E.	0-2 h o.E.	2-4 h +E.	2-4 h o.E.	4-6 h +E.	4-6 h o.E.
Copeptina						
Pacientes > 30 pmol/l	62,5 %	36,5 %	62,5 %	35,7 %	62,5 %	27,8 %
Riesgo relativo de insuficiencia cardíaca o muerte hasta 180 días tras el alta del hospital	<b>1,7</b>		<b>1,75</b>		<b>2,25</b>	

Tabla 2b

	Día 2 +E.	Día 2 o.E.	Día 3 +E.	Día 3 o.E.	Día 4 +E.	Día 4 o.E.	Día 5 +E.	Día 5 o.E.
Copeptina								
Pacientes > 30 pmol/l	50,0 %	7,0 %	43,8 %	7,0 %	39,2 %	6,1 %	31,3 %	6,1 %
Riesgo relativo de insuficiencia cardíaca o muerte hasta 180 días tras el alta del hospital	<b>7,14</b>		<b>6,26</b>		<b>6,42</b>		<b>5,13</b>	

30 Leyendas en las tablas y figuras: surv.= supervivencia, E. = Event (acontecimiento): muerte, desarrollo de una insuficiencia cardíaca grave, valor de corte = valor umbral en pmol/l, Sens.= sensibilidad, Espec.= especificidad, o. = sin.

35 Neurofisisina:

De acuerdo con las descripciones previas (Pullan (anteriormente)) se creó un radioinmunoensayo para neurofisisina: se aisló neurofisisina neurohipofisaria y se cuantificó. Con ello se inmunizaron conejos y así se obtuvieron anti-sueros anti-neurofisisina de alta titulación. Para el inmunoensayo se usó el antisuero de más alta titulación en una concentración de 1:100.000. La neurofisisina purificada se radiodó con el procedimiento de Cloramina T y se uso como indicador en el ensayo. Como patrones sirvieron diluciones de neurofisisina purificada en suero de caballo normal. El ensayo se realizó tal como sigue: 50 µl de muestra o bien patrón se mezclaron con 100 µl de indicador (12.000 dpm por determinación) y 100 µl de antisuero anti-neurofisisina diluido y se incubaron durante 24 horas a 4 °C. Como tampón se usó: fosfato de sodio 100 mM, pH 7,5, BSA al 0,1 %. Un indicador unido a anticuerpo se separó de indicador libre, añadiéndose un 60 % de etanol y centrifugándose entonces durante 15 minutos a 4 °C y 5.000 g. El sobrenadante se descartó y se determinó la radiactividad que quedaba en el sedimento. La evaluación se realizó con ayuda del software Multicalc. El ensayo tenía un límite de detección analítica de 22 pg/ml. El ensayo tenía un intervalo de medición de hasta 400 pg/ml. Con el ensayo se midieron muestras de plasma de distintos pacientes, tal

como se explica a continuación. Muestras con valores de medición >400 pg/ml se midieron en diluciones adecuadas, de modo que se consiguieron valores de medición dentro del intervalo de medición.

Infarto de miocardio / diagnóstico

5 De 66 pacientes con infarto de miocardio agudo se obtuvieron muestras a más tardar 6 horas tras el comienzo del infarto de miocardio y se midió neurofisiina. Para la comparación se determinó neurofisiina en 200 controles sanos. El análisis de características de operador-receptor para el diagnóstico del infarto de miocardio dio como resultado una AUC de 0,95. En caso de un valor de corte de 213 pg/ml se obtuvo como resultado una sensibilidad del 62,6 % con una especificidad del 98 %. En caso de un valor de corte de 136,1 pg/ml se obtuvo como resultado una sensibilidad del 84 % con una especificidad del 95 %.

Infarto de miocardio / pronóstico

15 De 66 pacientes con infarto de miocardio agudo se obtuvieron muestras a más tardar 6 horas tras el comienzo del infarto de miocardio o bien en el segundo día tras el infarto y se midió neurofisiina. Los pacientes se observaron durante un espacio de tiempo de 360 días. En este espacio de tiempo no tuvieron los 58 pacientes ningún acontecimiento adverso, 8 fallecieron o volvieron a hospitalizarse debido a insuficiencia cardíaca.

20 Pronóstico para el día 1 (<6 horas tras el comienzo del infarto):

Mediante el análisis de características de operador-receptor se determinó el mejor valor de corte (definido como el mayor producto de sensibilidad y especificidad) para el pronóstico de la mortalidad o bien rehospitalización debido a insuficiencia cardíaca: 777 pg/ml. Con este valor de corte ascendía la sensibilidad del pronóstico al 62,5 %, la especificidad ascendía al 73 %. La razón de probabilidad de un acontecimiento adverso ascendía con un valor de corte de 777 pg/ml a : 2,3.

Pronóstico para el día 2:

30 Mediante el análisis de características de operador-receptor se determinó el mejor valor de corte (definido como el mayor producto de sensibilidad y especificidad) para el pronóstico de la mortalidad o bien rehospitalización debido a insuficiencia cardíaca: 261 pg/ml. Con este valor de corte ascendía la sensibilidad del pronóstico al 68,8 %, la especificidad ascendía al 73 %. La razón de probabilidad de un acontecimiento adverso ascendía con un valor de corte de 261 pg/ml a : 2,6.

Figuras:

Figura 1:

40 Valores de copeptina de pacientes tras infarto de miocardio. Las muestras de plasma se obtuvieron de 131 pacientes, tal como se ha indicado, en distintos momentos tras infarto de miocardio. Adicionalmente están representados valores de copeptina de personas sanas ("controls"; 200 valores). Los valores de copeptina de los grupos están representados como diagramas de cajas y bigotes.

Figura 2:

50 Valores de copeptina de pacientes tras infarto de miocardio. Las muestras de plasma se obtuvieron, tal como se ha indicado, en distintos momentos tras infarto de miocardio. Los pacientes se agruparon dependiendo de si posteriormente se producía la muerte o bien la rehospitalización debido a insuficiencia cardíaca ("event"; 16 pacientes) o no ("surv"; 115 pacientes). Adicionalmente están representados valores de copeptina de personas sanas ("controls"; 200 valores). Los valores de copeptina de los grupos están representados como diagramas de cajas y bigotes.

Figura 3:

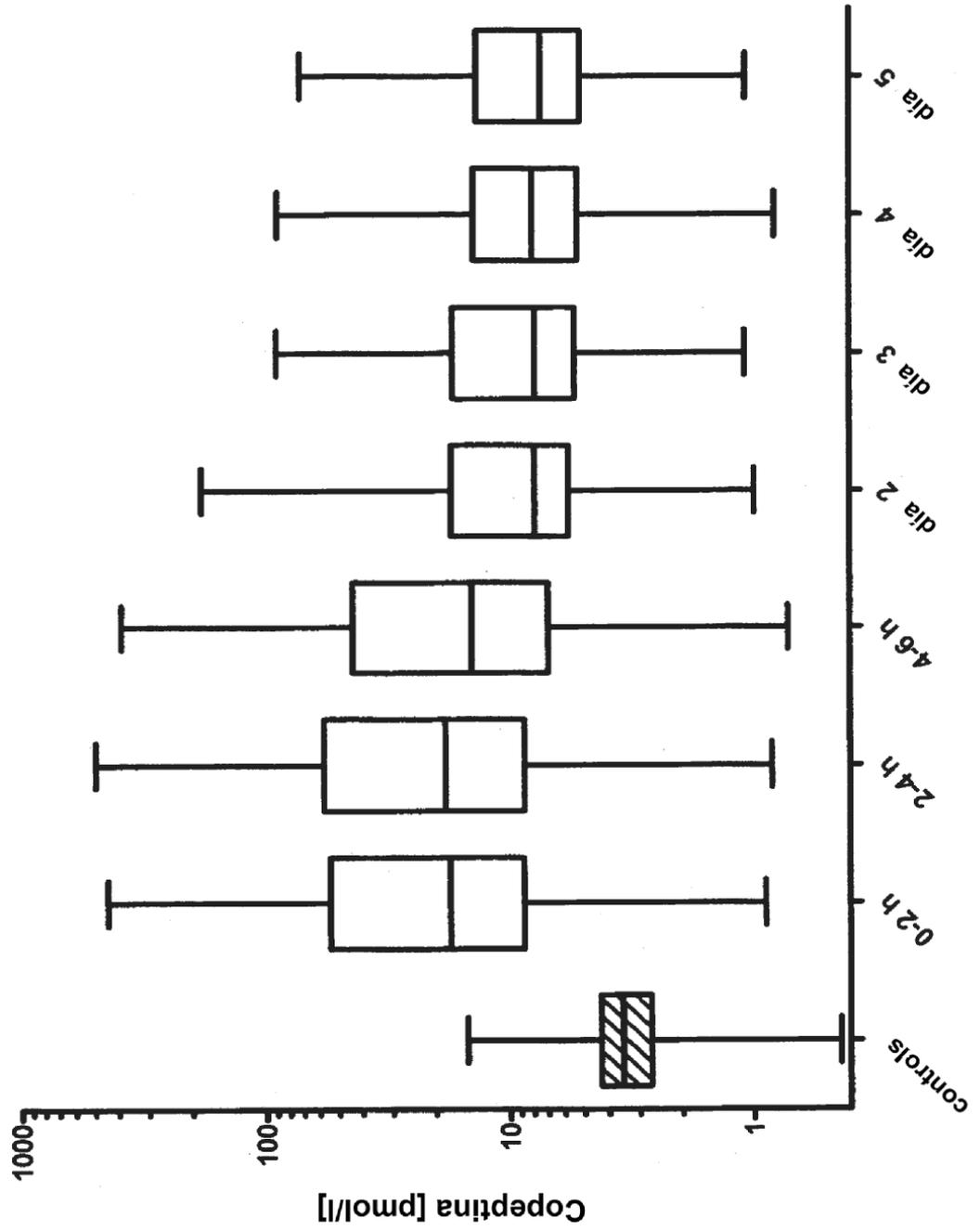
55 Representación de la secuencia de aminoácidos de preprovasopresina (164 AS) y los péptidos parciales y fragmentos de proAVP (AS: 29-164), neurofisiina II (AS: 32-124) y copeptina (AS: 126-164).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo, en el que se realiza una determinación de copeptina o neurofisiina II por medio de un diagnóstico *in vitro*.
2. Procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo según la reivindicación 1, para permitir una identificación de pacientes con elevado riesgo o/y un pronóstico desfavorable de un síndrome coronario agudo, en particular infarto de miocardio.
- 10 3. Procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo según la reivindicación 1 o 2, en el que el paciente es un paciente sintomático o asintomático, en particular un paciente de urgencias.
- 15 4. Procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo según una de las reivindicaciones 1 a 3 para permitir un control de terapia del síndrome coronario agudo, en particular infarto de miocardio, en particular en cuidados intensivos o medicina de urgencias.
- 20 5. Procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo según una de las reivindicaciones 1 a 4 para permitir una realización de decisiones médicas, en particular tratamiento y terapia continuados por medio de fármacos, en particular en cuidados intensivos o medicina de urgencias.
- 25 6. Procedimiento para el diagnóstico *in vitro* para permitir un diagnóstico precoz en el intervalo de 6 horas tras la aparición de síntomas o diagnóstico diferencial o pronóstico de infarto de miocardio, en el que se realiza una determinación de copeptina o neurofisiina II de un paciente que va a someterse a estudio.
- 30 7. Procedimiento para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo según la reivindicación 1 o procedimiento para el diagnóstico *in vitro* para permitir un diagnóstico precoz en el intervalo de 6 horas tras la aparición de síntomas o diagnóstico diferencial o pronóstico de un infarto de miocardio según la reivindicación 6, en el que se realiza una determinación de copeptina o neurofisiina II en combinación con proteínas natriuréticas, en particular ANP (o bien ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP de un paciente que va a someterse a estudio.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que se realiza el diagnóstico para la profilaxis, para el pronóstico, para el reconocimiento precoz y reconocimiento diagnóstico diferencial, para la evaluación del grado de gravedad y para la evaluación de desarrollo concomitante de terapia.
- 40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el valor de corte (valor umbral) para el diagnóstico de 6-20 pmol/l, en particular 6-10 pmol/l o el valor de corte (valor umbral) para el pronóstico de 10-30 pmol/l, en particular 10-20 pmol/l de los marcadores copeptina o neurofisiina II es significativo (específico).
- 45 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que adicionalmente se realiza una determinación al menos de otro marcador seleccionado del grupo de marcadores inflamatorios, marcadores cardiovasculares, marcadores neurohormonales o marcadores isquémicos en un diagnóstico *in vitro*.
- 50 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que el marcador inflamatorio se selecciona de al menos un marcador del grupo de proteína C reactiva (PCR), citocinas, tal como por ejemplo TNF-alfa, interleucinas, tal como por ejemplo IL-6, procalcitonina (1-116, 3-116) y moléculas de adhesión, tal como VCAM o ICAM.
- 55 12. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que el marcador cardiovascular se selecciona de al menos un marcador del grupo de creatina cinasa, mioglobina, mieloperoxidasa, proteína natriurética, en particular ANP (o bien ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP o en cada caso una secuencia parcial de las mismas, troponina cardíaca, PCR así como (pro)hormonas que regulan la circulación, tal como péptido de liberación de pro-gastrina (proGRP), pro-endotelina-1, pro-leptina, pro-neuropéptido-Y, pro-somatostatina, pro-neuropéptido-YY, pro-opiomelanocortina o pro-adrenomedulina (proADM).
- 60 13. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que el marcador isquémico se selecciona de al menos un marcador del grupo de troponina I y T, CK-MB.
14. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que el marcador neurohormonal es al menos una proteína natriurética, en particular es ANP (o bien ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las determinaciones se realizan por medio de un ensayo rápido, en particular en determinaciones de un parámetro individual o de múltiples parámetros.

16. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la estratificación de riesgo se realiza para el pronóstico, para el reconocimiento precoz y reconocimiento diagnóstico diferencial, para la evaluación del grado de gravedad y para la evaluación de desarrollo concomitante de terapia del síndrome coronario agudo.
- 5 17. Uso de copeptina o neurofisiina II para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo y/o para el diagnóstico *in vitro* para permitir un diagnóstico precoz en el intervalo de 6 horas tras la aparición de síntomas o diagnóstico diferencial o pronóstico de infarto de miocardio.
- 10 18. Uso de un kit para la estratificación de riesgo del síndrome coronario agudo o para el diagnóstico precoz en el intervalo de 6 horas tras la aparición de síntomas o diagnóstico diferencial o pronóstico de infarto de miocardio que contiene reactivos de detección para la determinación de copeptina o neurofisiina II y eventualmente otros marcadores según una de las reivindicaciones 10 a 14 y agentes auxiliares.
- 15 19. Kit para el diagnóstico del síndrome coronario agudo, infarto de miocardio que contiene reactivos de detección para la determinación de copeptina o neurofisiina II en combinación con proteínas natriuréticas, en particular ANP (o bien ANF), proANP, NT-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP y eventualmente otros marcadores según una de las reivindicaciones 10 a 14 y agentes auxiliares.

Figura 1



Valores de copeptina representados por separado para pacientes con IMA sin acontecimiento posterior ("surv") o bien con acontecimiento posterior (muerte o insuficiencia cardíaca; "event")

Figura 2

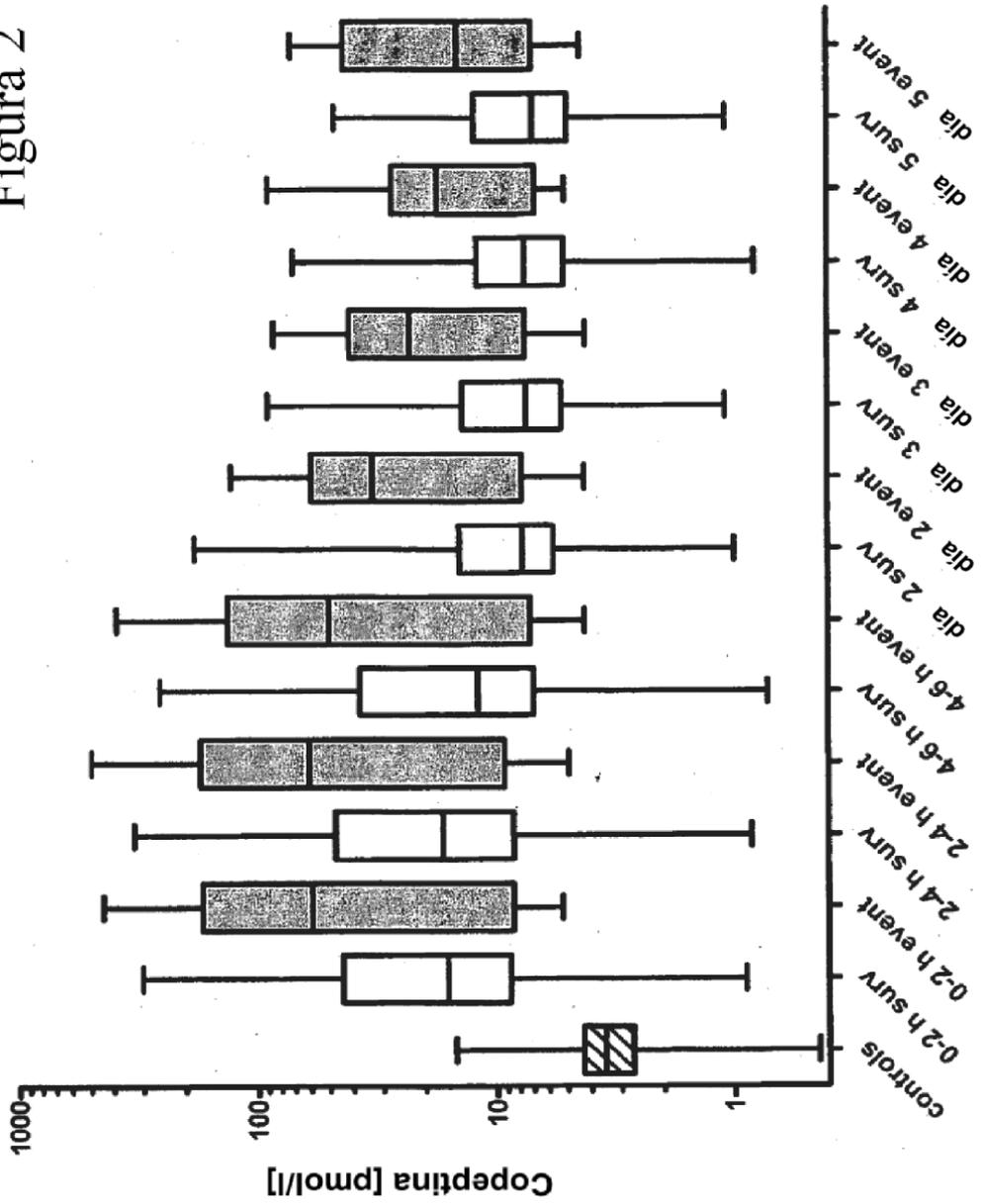


Figura 3

Sec. de aminoácidos de PreProvasopresina

MPDTMLPACF	LGLLAFSSAC	YFQNCPRGGK	PAMSDLELRQ	CLPCGPGGKG	RCFGPSICCA	60
DELGCFVGTA	EALRCQEENY	LPSPCQSGQK	ACGSGGRCAA	FGVCCNDESC	VTEPECREGF	120
HRRARASDRS	NATQLDGPAG	ALLLRLVQLA	GAPEPFEPAQ	PDAY		164

1-19	Secuencia Señal
20-28	ARG-VASOPRESINA
32-124	NEUROFISINA 2
126-164	COPEPTINA