

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 201**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2014** E 14152777 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018** EP 2899544

54 Título: **Biomarcadores para la evaluación de riesgos y la monitorización del tratamiento en pacientes de insuficiencia cardíaca que han recibido terapia guiada por el péptido natriurético de tipo B**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.05.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BLOCK, DIRK;  
BRUNNER, HANSPETER;  
WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE;  
ZAUGG, CHRISTIAN;  
DIETERLE, THOMAS;  
MITCHELL, CHERYL;  
UBBY, JOHAN y  
SANDERS-VAN WIJK, SANDRA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 712 201 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Biomarcadores para la evaluación de riesgos y la monitorización del tratamiento en pacientes de insuficiencia cardíaca que han recibido terapia guiada por el péptido natriurético de tipo B

5 La insuficiencia cardíaca (IC) es de entre las causas principales de morbilidad y mortalidad en muchos países en todo el mundo. Aunque las opciones de tratamiento disponibles pueden reducir la morbilidad y mortalidad en pacientes con IC, el número relativo de pacientes elegibles que reciben estos tratamientos sigue siendo insatisfactoriamente baja (O'Donoghue M. y Braunwald E., Nat. Rev. Cardiol. 2010; 7: 13-20). Además, en pacientes elegibles para el  
10 tratamiento, la terapia se ha guiado y ajustado según los signos y síntomas de IC a la máxima tolerancia a los fármacos (p.ej., según los estadios NY-HA, los estadios ACC/AHA, o puntuaciones de congestión).

15 La medición de los marcadores de péptido natriurético, tales como el péptido natriurético de tipo B (PNC), o su fragmento aminoterminal proPNC N-terminal (NT-proPNC), se ha convertido en una importante herramienta para el diagnóstico y la estratificación de riesgos de los pacientes que presentan IC. Además, existe nueva evidencia de que NT-proPNC resulta útil como guía de la terapia médica en la insuficiencia cardíaca (Januzzi J, Journal of Cardiac Failure, 2011; 17: 622-625).

20 Sin embargo, la terapia de la IC guiada por NT-proPNC no identifica todos los pacientes en riesgo de descompensación de IC y de sucesos adversos. En consecuencia, algunos pacientes siguen en riesgo, aunque muestran una respuesta favorable a la terapia con respecto a sus niveles de NT-proPNC. Y de esta manera, no todos los pacientes se benefician de la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.

25 El documento nº WO 2009/141374 da a conocer un método para identificar un sujeto susceptible de terapia cardíaca, en el que dicho sujeto sufre de insuficiencia cardíaca y necesita una terapia cardíaca basada en la determinación de la cantidad de proteína de unión a ácidos grasos hepáticos.

30 El documento nº WO 2010/125165 da a conocer un método para diagnosticar el daño renal en un sujeto con insuficiencia cardíaca o que se sospecha que sufre de insuficiencia cardíaca, que comprende las etapas de: a) determinar las cantidades de proteína de unión a ácidos grasos de tipo hepático (L-FABP, por sus siglas en inglés) o una variante de la misma y molécula 1 de daño renal (KIM-I, por sus siglas en inglés).

35 Kistorp da a conocer que los niveles de NT-proPNC, CRP y albúmina urinaria son predictivos de mortalidad (JAMA 6 de abril, 2005;293(13):1609-16).

40 Shah informa de un ensayo piloto multicentro aleatorizado. En el ensayo, se sometió a ensayo si la gestión ambulatoria diurética guiada por el péptido natriurético de tipo B (PNC) y la evaluación clínica resultó en un mayor número de días de supervivencia y no hospitalización durante 90 días en comparación con la evaluación clínica por sí sola (J. Card. Fail. agosto de 2011;17(8):613-2).

45 El documento nº WO2008/015254 da a conocer un método de predicción del riesgo de mortalidad o de un suceso cardiovascular adicional en un paciente de insuficiencia cardíaca basada en la medición de NTproPNC y GDF-15.

El documento nº WO 2010/0070411 da a conocer un método basado en la detección de GDF-15, NT-proPNA, NT-proPNC y troponina cardíaca, de monitorización de un sujeto aparentemente estable que sufre de insuficiencia cardíaca. Además, da a conocer un método de diagnóstico y/o decisión de qué terapia/medicación debe aplicarse en un paciente aparentemente estable que sufre de insuficiencia cardíaca y que experimenta un cambio en su estado fisiológico.

50 Böhm et al. 2011 (Clin. Res. Cardiol., 100:973-981) proporciona una revisión de métodos basados en la detección de NTproPNC para la guía de terapia y monitorización de un paciente de insuficiencia cardíaca. También menciona la posibilidad de combinar PNC y troponina para la guía de la terapia de la insuficiencia cardíaca.

55 Miyata et al. (J. of Cardiology 2012, 59, 352-358) examinaron el efecto de una terapia intensificada en un grupo de pacientes de CHF sobre diferentes marcadores y parámetros clínicos a los 3 meses vs la línea base. La mitad del grupo se pasó al diurético de acción prolongada azosemida, mientras que la otra mitad se mantuvo con diuréticos de acción corta (furosemida). Los autores encontraron una reducción significativa tras 3 meses de los niveles plasmáticos de PNC y PNA en el grupo de azosemida. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en los cambios de creatinina, NUS (=nitrógeno de urea sanguínea), sodio, potasio y hematócrito.

60 Ventajosamente, se ha encontrado en los estudios subyacentes a la presente invención que la combinación de NT-proPNC o PNC con otros marcadores y parámetros clínicos pueden utilizarse con fines de monitorización y como guía para la terapia además del estándar de cuidado actual de ajuste y titulación de la terapia en pacientes de IC (IC crónica o aguda después de la estabilización). Estos marcadores y parámetros son creatinina, NUS (urea), glucosa, HbA1c, sodio, hemoglobina y hematócrito. Específicamente, la adición de estas mediciones a NT-proPNC o PNC, junto con el  
65 estándar de cuidado actual pueden estratificar adicionalmente según riesgos los pacientes de IC ya guiados por NT-

proPNC pero que pueden requerir una terapia más intensificada y una observación más minuciosa. De esta manera, la presente invención optimiza la guía a la terapia de la insuficiencia cardíaca más allá de NT-proPNC mediante la consideración de combinaciones de péptidos natriuréticos con otros marcadores y/o parámetros clínicos.

5 En particular, se ha encontrado en los estudios de la presente invención que la determinación adicional de los marcadores de parámetros a los que se hace referencia anteriormente permite la identificación de un subgrupo de pacientes que muestran un nivel de péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC indicativo de intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca pero que, sin embargo, son elegibles para una intensificación del tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Gracias a la presente invención, pueden  
10 identificarse pacientes que requieren una intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca que basándose en la medición del nivel de un tipo PNC por sí sola no habrían recibido una terapia intensificada de la insuficiencia cardíaca.

15 De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a un método para identificar un paciente que es elegible para una intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) medir el nivel de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematocrito en una muestra de un paciente que presenta  
20 insuficiencia cardíaca y que recibe terapia de la insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC, en particular terapia de la insuficiencia cardíaca guiada por NT-proPNC o terapia de la insuficiencia cardíaca guiada por PNC.

(b) comparar el nivel (o niveles) del marcador (o marcadores) medidos en (a) con un nivel de referencia (o niveles de referencia) y

(c) identificar un paciente que es elegible para una intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.  
25

En una realización, el método comprende además la etapa (c) de identificación o selección de un paciente que es elegible para una intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, es decir, de terapia guiada por el péptido de tipo PNC.

30 Además, el método puede comprender la etapa (b) de intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca o de recomendación de la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca (en el caso de que el paciente haya sido identificado como elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca). De acuerdo con lo anterior, la presente invención contempla además un método de identificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas (a) a (d) tal como se ha indicado anteriormente.

35 El método de la presente invención, preferentemente es un método *ex vivo* o *in vitro*. Además, puede comprender etapas además de las anteriormente indicadas explícitamente. Por ejemplo, algunas etapas adicionales pueden estar relacionadas con pretratamientos de las muestras o la evaluación de los resultados obtenidos mediante el método. El método puede llevarse a cabo manualmente o asistido por automatización. Preferentemente, la etapa (a) y/o (b) pueden estar asistidas completa o parcialmente por automatización, p.ej. por equipos robóticos y sensoriales adecuados para la medición en la etapa (a) o en una identificación implementada por ordenador en la etapa (c).  
40

45 El "paciente" tal como se indica en la presente memoria es, preferentemente, un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el paciente es un paciente humano. Los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan intercambiamente en la presente memoria.

50 La expresión "selección de un paciente" o "identificación de un paciente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a utilizar la información o datos generados relacionados con el nivel de por lo menos un marcador tal como se utiliza en el contexto de la presente invención en una muestra de un paciente con el fin de identificar o seleccionar el paciente como más probablemente beneficiado o menos probablemente beneficiado de una intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca. Preferentemente, un sujeto que es elegible para dicha intensificación requiere dicha intensificación, mientras que un sujeto que no es elegible para dicha intensificación no requiere dicha  
55 intensificación.

60 Se entiende que un sujeto que es elegible para la intensificación de la terapia de insuficiencia cardíaca se beneficiará de la intensificación, mientras que un sujeto que no es elegible para dicha intensificación puede no beneficiarse de dicha intensificación, p.ej., puede experimentar efectos secundarios adversos o perjudiciales derivados de la intensificación. En particular, un sujeto se beneficia de la intensificación, en el caso de que la intensificación reduzca el riesgo de mortalidad de dicho sujeto y/o reduzca el riesgo de hospitalización y/o de descompensación cardíaca de dicho sujeto, en particular dentro de una ventana temporal de 18 meses o 3 años después de la obtención de la muestra. Preferentemente, el riesgo (o riesgos) anteriormente mencionados se reducen en 5%, más preferentemente en 10%, todavía más preferentemente en 15% y, lo más preferentemente, en 20%. Preferentemente, la hospitalización y mortalidad a las que se hace referencia en la presente memoria se deberán a insuficiencia cardíaca.  
65

En contraste, un sujeto que no es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca no se beneficiará (en particular, no se beneficiará significativamente) de la intensificación. En particular, un sujeto no se beneficia de la intensificación, en el caso de que la intensificación no reduzca (en particular, que no reduzca significativamente) el riesgo de mortalidad de dicho sujeto y/o que no reduzca (en particular, que no reduzca significativamente) el riesgo de hospitalización y/o de descompensación cardíaca de dicho sujeto y/o que incrementa el riesgo de efectos secundarios no deseados, en particular dentro de una ventana temporal de 18 meses o 3 años después de la obtención de la muestra. En este caso, pueden evitarse costes innecesarios de atención sanitaria, en el caso de que no se intensifique la terapia. Además, pueden evitarse efectos secundarios adversos que resultan de la intensificación.

De esta manera, mediante la identificación de un sujeto que es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, puede evaluarse si dicho sujeto se beneficiará de la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, o no. De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere además a un método de identificación de un sujeto que se beneficiará de la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, basándose en las etapas explicadas en otros sitios de la presente memoria.

Tal como se indica posteriormente en la presente memoria en mayor detalle, un sujeto que es elegible para la intensificación del tratamiento de la insuficiencia cardíaca también será monitorizado a intervalos cortos, mientras que un sujeto que no es elegible para la intensificación del tratamiento de la insuficiencia cardíaca (es decir, que no requiera la intensificación del tratamiento de la insuficiencia cardíaca) se monitorizará a intervalos largos. Por lo tanto, además de la decisión de si el tratamiento de la insuficiencia cardíaca debe intensificarse o no, puede evaluarse si el sujeto debe monitorizarse a intervalos cortos o a intervalos largos.

Tal como entenderá el experto en la materia, la evaluación realizada mediante el método de la presente invención habitualmente no está destinada a ser correcta para el 100% de los sujetos que deben diagnosticarse. Sin embargo, el término requiere que la evaluación sea correcta para una porción estadísticamente significativa de los pacientes (p.ej. una cohorte en un estudio de cohorte). Si una parte es estadísticamente significativa o no puede ser determinado sin más por el experto en la materia utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidos, por ejemplo la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentra más información en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes son por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99%. Los valores de p preferentemente son 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

Se encuentra contemplado en el contexto de la presente invención que el sujeto sufre de insuficiencia cardíaca (IC), en particular de insuficiencia cardíaca crónica. Además, el sujeto puede sufrir de insuficiencia cardíaca aguda estabilizada.

La expresión “insuficiencia cardíaca” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una disfunción diastólica o, en particular, de una disfunción sistólica del corazón que está acompañada de signos manifiestos de insuficiencia cardíaca tal como conocerá el experto en la materia. Preferentemente, la insuficiencia cardíaca a la que se hace referencia en la presente memoria es la insuficiencia cardíaca crónica (que preferentemente está causada por disfunción sistólica). La insuficiencia cardíaca según la presente invención incluye la insuficiencia cardíaca evidente y/o avanzada. En la insuficiencia cardíaca evidente, el paciente muestra síntomas de insuficiencia cardíaca tal como es conocida por el experto en la materia.

La IC puede clasificarse en diversos grados de severidad.

Según la clasificación de la NYHA (New York Heart Association), los pacientes de insuficiencia cardíaca se clasifican como pertenecientes a las clases I, II, III y IV de la NYHA. Un paciente que presenta insuficiencia cardíaca ya ha experimentado cambios estructurales y funcionales en su pericardio, miocardio, circulación coronaria o válvulas cardíacas. No podrá restaurar por completo su salud y requiere un tratamiento terapéutico. Los pacientes de NYHA clase I no presentan síntomas evidentes de enfermedad cardiovascular pero ya presentan evidencia objetiva de alteración funcional. Los pacientes de NYHA de clase II presentan una ligera limitación de la actividad física. Los pacientes de NYHA de clase III presentan una marcada limitación de la actividad física. Los pacientes de NYHA de clase IV no puede llevar a cabo ninguna actividad física sin molestias. Muestran síntomas de insuficiencia cardíaca en reposo.

Esta clasificación funcional se complementa con la clasificación más reciente de la American College of Cardiology and the American Heart Association (ver *J. Am. Coll. Cardiol.* 38:2101-2113, 2001, actualizada en 2005, ver *J. Am. Coll. Cardiol.* 46:e1-e82, 2005). Se han definido 4 estadios: A, B, C y D. Los estadios A y B no son de IC, sino que se considera que ayudan a identificar los pacientes precozmente, antes de desarrollar “verdaderamente” IC. Los pacientes de estadios A y B se definen mejor como aquellos pacientes con factores de riesgo de desarrollo de IC. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad arterial coronaria, hipertensión o diabetes mellitus que no muestran función ventricular izquierda (VI) deteriorada, hipertrofia o una distorsión geométrica de la cámara se considerarían de estadio A, mientras que los pacientes que son asintomáticos pero muestran hipertrofia del VI y/o una función del VI deteriorada

se denominarían de estadio B. El estadio C se refiere entonces a pacientes con síntomas actuales o pasados de IC asociados a enfermedad cardíaca estructural subyacente (la mayor parte de los pacientes con IC) y el estadio D se refiere a pacientes con IC verdaderamente refractaria.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "insuficiencia cardíaca" preferentemente se refiere a los estadios B y C de la clasificación ACC/AHA a la que se ha hecho referencia anteriormente. En estos estadios, el sujeto muestra síntomas típicos de insuficiencia cardíaca. De acuerdo con lo anterior, el paciente preferentemente presenta insuficiencia cardíaca clasificada como de estadio B o C según la clasificación de ACC/AHA. También preferentemente, el paciente presenta insuficiencia cardíaca según la clase II o III de la clasificación de NYHA.

10 Preferentemente, la insuficiencia cardíaca se debe a una función sistólica deteriorada. De acuerdo con lo anterior, en particular se encuentra contemplado que el paciente sufre de insuficiencia cardíaca sistólica. Preferentemente, el paciente presenta una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) inferior a 50%, más preferentemente inferior a 45%, y lo más preferentemente, inferior a 40%.

15 El paciente que debe someterse a ensayo según el método de la presente invención recibirá terapia guiada por el péptido de tipo PNC, es decir, terapia de la insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC. Las expresiones "terapia guiada por péptido de tipo PNC" y "terapia de la insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC" son bien conocidos en la técnica. De acuerdo con lo anterior, el paciente que debe someterse a ensayo recibirá terapia para la insuficiencia cardíaca (para ser más exactos, en el momento en que se obtiene la muestra) que es guiada por un péptido de tipo PNC. De esta manera, se encuentra contemplado que por lo menos se haya tomado una decisión con respecto a la terapia de insuficiencia cardíaca para dicho paciente en el pasado (y de esta manera, antes de obtener la muestra que debe someterse a ensayo) basada en el nivel de un péptido de tipo PNC en dicho paciente, en particular basada en el nivel sanguíneo, sérico o plasmático de un péptido de tipo PNC en dicho paciente. De acuerdo con lo anterior, el nivel en el paciente de un péptido de tipo PNC puede haberse considerado para decisiones anteriores sobre el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Además, se encuentra contemplado que la presente decisión con respecto a la terapia de la insuficiencia cardíaca sea la primera decisión que implique la consideración del nivel de un péptido de tipo PNC. De acuerdo con lo anterior, el paciente que recibe terapia para insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC puede ser un paciente en el que se inicia la terapia de insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC (en particular, inmediatamente después de obtener la muestra que debe someterse a ensayo). Sin embargo, dicho paciente puede haber recibido terapia para insuficiencia cardíaca anteriormente que no ha sido guiada por un péptido de tipo PNC.

30 Los péptidos de tipo PNC preferentes se dan a conocer en otros sitios de la presente memoria. La terapia guiada por péptido de tipo PNC preferentemente puede ser una terapia guiada por PNC (péptido natriurético cerebral) o, en particular terapia guiada por NT-proPNC (péptido natriurético procerebral N-terminal) (para una explicación de estos marcadores, ver en otros sitios).

35 En la terapia guiada por el péptido de tipo PNC, se utiliza el nivel de un péptido de tipo PNC para el control del tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Basándose en el nivel, se realizan decisiones sobre el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. En principio, un paciente con un nivel incrementado de un péptido de tipo PNC recibe una terapia más intensificada que un paciente con un nivel reducido de este marcador. La terapia guiada por el péptido de tipo PNC es bien conocida en la técnica y se describe, p.ej., en Sanders-van Wijk et al. Eur. J. Heart Fail (2013) 15 (8): 910-918. Además, las terapias guiadas por péptido de tipo PNC se revisan en Januzzi, ver Archives of Cardiovascular Disease (2012), 105, 40 a 50.

40 En una realización preferente, el paciente muestra un nivel (en particular un nivel sanguíneo, sérico o plasmático) de un péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC, siendo indicativa de la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca. De acuerdo con lo anterior, el paciente es un paciente con un nivel de un péptido de tipo PNC que, administrado solo (es decir, no en combinación con por lo menos un marcador adicional tal como se indica en la etapa (a) del método anteriormente mencionado), puede ser indicativo de un paciente que no es elegible de una intensificación de la terapia de insuficiencia cardíaca. Los niveles de referencia preferentes de dicho péptido de tipo PNC son indicativos de la intensificación de la terapia de insuficiencia cardíaca que debe aplicarse en el contexto de la presente invención son los indicados en los Ejemplos. Los niveles de referencia preferentes se encuentran comprendidos en un intervalo de aproximadamente 80 a 400 pg/ml, o en particular, de aproximadamente 80 a 200 pg/ml para PNC, o dentro de un intervalo de aproximadamente 450 a 2.200 pg/ml, o en particular de aproximadamente 800 pg/ml a 1.200 pg/ml para NT-proPNC. Son niveles de referencia preferentes adicionales: aproximadamente 100 pg/ml o 400 pg/ml para PNC, y aproximadamente 1.000 pg/ml o 1.200 pg/ml para NT-proPNC. De esta manera, el paciente según la presente invención puede mostrar un nivel de NT-proPNC, en particular un nivel sanguíneo, sérico o plasmático de NT-proPNC inferior a 1.000 pg/ml o 1.200 pg/ml.

45 Además, se encuentra contemplado que el paciente que muestra un nivel de un péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia de dicho péptido de tipo PNC que es indicativo de intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca presente un nivel (en particular un nivel sanguíneo, sérico o plasmático) de PNC comprendido dentro del intervalo de aproximadamente 80 a aproximadamente 400 pg/ml, en particular dentro del intervalo de aproximadamente 80 a aproximadamente 200 pg/ml. Además, el paciente que muestra un nivel de un péptido de tipo

PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC que es indicativo de intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca puede presentar un nivel (en particular un nivel sanguíneo, sérico o plasmático) de NT-proPNC comprendido dentro del intervalo de 450 a 2.200 pg/ml, en particular dentro del intervalo de 800 a 1.200 pg/ml.

5 Preferentemente, el término “aproximadamente” tal como se utiliza en la presente memoria comprende un intervalo de + y -20%, más preferentemente un intervalo de + y -10%, todavía más preferentemente un intervalo de + y -5%, y lo más preferentemente, un intervalo de + y -2% respecto a la cantidad específica, p.ej. la indicación de una cantidad de “aproximadamente 100” pretende comprender una cantidad en un intervalo de 80 a 120. Además, el término  
10 “aproximadamente” se refiere a la cantidad exacta. Preferentemente, los niveles se miden tal como se indica en los Ejemplos.

15 La expresión “terapia de la insuficiencia cardíaca” (en la presente memoria también denominada “tratamiento de la insuficiencia cardíaca”) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier tratamiento que permita el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Preferentemente, la expresión comprende cambios en el estilo de vida, régimen de alimentación, intervenciones en el cuerpo, así como la administración de medicamentos apropiados, uso de dispositivos y/o trasplante de órganos para el tratamiento de un paciente que sufre de insuficiencia cardíaca.

20 Entre los cambios del estilo de vida se incluyen el cese del tabaquismo, la moderación del consumo de alcohol, el incremento de la actividad física, la pérdida de peso, la restricción de sodio (sal), el control del peso y la alimentación saludable (tal como aceite de pescado diario).

Son dispositivos preferentes para la aplicación, marcapasos y dispositivos de resincronización, desfibrilador, bombas de balón intraaórtico y dispositivos de asistencia ventricular izquierda.

25 En una realización preferente, la terapia de la insuficiencia cardíaca es terapia de la insuficiencia cardíaca medicinal. De acuerdo con lo anterior, la terapia de la insuficiencia cardíaca comprende la administración de uno o más medicamentos. El término “administrar” tal como se utiliza en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y comprende, entre otras, la administración oral, entérica, tópica y la “administración parenteral”. Las expresiones  
30 “administración parenteral” y “administrado parenteralmente” tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, las inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural, e intraesternal, y la infusión. En una realización, la  
35 medicación se administra por vía oral.

Los medicamentos adecuados para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca son bien conocidos en la técnica; ver, p.ej., Heart Disease, 8a edición, eds. Braunwald, Elsevier Saunders, capítulo 24 o ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure (European Heart Journal (2008) 29, 2388-2442). Preferentemente, el  
40 tratamiento de la insuficiencia cardíaca incluye la administración de por lo menos un medicamento seleccionado del grupo que consiste en inhibidores del enzima conversor de la angiotensina (inhibidores de la ACE), bloqueantes de receptores de la angiotensina II (frecuentemente también denominados antagonistas de receptores de la angiotensina II), bloqueantes beta-adrenérgicos (en la presente memoria también denominados beta-bloqueantes), diuréticos, antagonistas de aldosterona, agonistas adrenérgicos, agentes inotrópicos positivos, antagonistas del calcio, hidralazina, nitratos y aspirina. Resulta particularmente preferente que el medicamento sea un inhibidor del enzima  
45 conversor de angiotensina, un bloqueante de receptores de la angiotensina II, un beta-bloqueante y/o un agente bloqueante de aldosterona.

50 Entre los inhibidores de ACE preferentes se incluyen benazepril, captopril, cilazaprilenalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril y trandolapril. Un inhibidor particularmente preferente es enalapril.

Entre los beta-bloqueantes preferentes se incluyen ebutolol, alprenolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, bupranolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, metipranolol, metoprolol, nadolol, nebivolol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propanolol, sotalol, tanilolol y timolol. Un beta-bloqueante particularmente preferente es atenolol, bisoprolol, carvedilol  
55 o metoprolol.

Son antagonistas de receptor de la angiotensina II preferentes, losartán, valsartán, irbesartán, candesartán, telmisartán y eprosartán. Un antagonista particularmente preferente es losartán o valsartán.

60 Los diuréticos preferentes son diuréticos del asa, tiazida y diuréticos de tipo tiazida, diuréticos ahorradores de K, antagonistas de receptor de mineralocorticoide y antagonistas de vasopresina.

Son antagonistas de aldosterona preferentes, eplerona, espironolactona, canrenona, mexrenona, prorenona y estatinas, en particular atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina. Un  
65 antagonista particularmente preferente es la espironolactona.

Los agentes inotrópicos positivos preferentes son la digoxina y la digitoxina.

Los antagonistas del calcio preferentes son las dihidropiridinas, verapamilo y diltiazem.

5 Son agonistas adrenérgicos preferentes, dobutamina, dopamina, epinefrina, isoprotenerol, norepinefrina y fenilefrina.

La terapia de la insuficiencia cardíaca que debe intensificarse, o no, puede ser cualquier tratamiento tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria. Sin embargo, en una realización preferente, la terapia de la insuficiencia cardíaca comprende la administración de por lo menos un medicamento tal como se ha indicado  
10 anteriormente. En una realización todavía más preferente, la terapia de la insuficiencia cardíaca comprende la administración de por lo menos un medicamento seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor del enzima conversor de la angiotensina, un bloqueante de receptor de la angiotensina II, un beta-bloqueante, un diurético y un antagonista de aldosterona. Más preferentemente, el tratamiento de la insuficiencia cardíaca que debe intensificarse comprende la administración combinada de un beta-bloqueante y un inhibidor de la ACE.

15 Según el método de la presente invención, debe evaluarse si el tratamiento de la insuficiencia cardíaca del paciente que debe someterse a ensayo debe intensificarse o no. Preferentemente, la intensificación del tratamiento de la insuficiencia cardíaca comprende por lo menos uno de los siguientes:

- 20
- incrementar la dosis de un medicamento administrado anteriormente o de medicamentos administrados anteriormente;
  - la administración de un medicamento adicional o de otro medicamento (o medicamentos), en particular la administración de un medicamento (o medicamentos) adicional con un modo de acción diferente al del medicamento o medicamentos administrados anteriormente;
  - 25 • terapia de dispositivo, en particular, utilización de dispositivos marcapasos, terapia de resincronización cardíaca (TRC), dispositivos desfibriladores implantables (DDI) o dispositivos de asistencia ventricular izquierda (DAVI) y
  - combinaciones de los mismos.

30 Preferentemente, la intensificación comprende incrementar la dosis de un medicamento administrado anteriormente o de medicamentos administrados anteriormente, en particular incrementar la dosis de un medicamento seleccionado del grupo que consiste en un diurético, un inhibidor del enzima conversor de la angiotensina, un bloqueante de receptor de la angiotensina II, un antagonista de aldosterona y un beta-bloqueante. Cómo incrementar la dosis es bien conocido de la técnica y, p. ej., puede derivarse a partir de las directrices. Preferentemente, las dosis de estos medicamentos pueden incrementarse hasta la dosis terapéutica máxima recomendada o hasta la dosis máxima tolerada, sea cual  
35 sea la que se alcance primero. También preferentemente, la dosis puede incrementarse en por lo menos 20% o en por lo menos 50%.

También preferentemente, la intensificación comprende la administración de un medicamento (o medicamentos) adicional, en particular la administración de un medicamento (o medicamentos) adicional con un modo de acción diferente que los medicamentos administrados anteriormente, o la aplicación de dispositivos adicionales (es decir, de medicamentos/dispositivos que no han sido administrados/utilizados antes de llevar a cabo el método de la presente invención). Entre los medicamentos adicionales preferentes se incluyen hidralazina, nitratos, agentes inotrópicos y agentes adrenérgicos. Entre los dispositivos preferentes se incluyen dispositivos marcapasos, terapia de resincronización cardíaca (TRC) y dispositivos desfibriladores implantables (DDI).

45 Además, la intensificación del tratamiento de la insuficiencia cardíaca puede comprender además la monitorización del paciente a intervalos cortos. De acuerdo con lo anterior, llevando a cabo el método de la presente invención puede identificarse un paciente que requiera una monitorización estrecha, en particular con respecto a la terapia de la insuficiencia cardíaca (y, de esta manera, una observación más estrecha). Por "monitorización más estrecha"  
50 preferentemente se hace referencia a que los niveles de los marcadores a los que se hace referencia en la presente memoria en relación al método de la presente invención se miden en por lo menos una muestra adicional obtenida del paciente después de transcurrir un intervalo corto desde la muestra a la que se hace referencia en la etapa a) del método de la presente invención. Los intervalos cortos preferentes se mencionan posteriormente en la presente memoria.

55 Un paciente que no requiere la intensificación del tratamiento de la insuficiencia cardíaca preferentemente puede continuar con el tratamiento de la insuficiencia cardíaca sin modificar el régimen de tratamiento. De esta manera, no resulta necesario adaptar la dosis del medicamento o medicamentos administrados y/o cambiar los medicamentos.

60 El término "muestra" se refiere a una muestra de un líquido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o de un órgano. Las muestras de líquidos corporales pueden obtenerse mediante técnicas bien conocidas y entre ellas se incluyen muestras de sangre, plasma, suero, orina, líquido linfático, esputo, ascites, lavado bronquial o cualquier otra secreción corporal o derivado de la misma. Las muestras de tejidos u órganos pueden obtenerse de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. Las células separadas pueden obtenerse de  
65 líquidos corporales o de los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como la centrifugación o la

separación celular. P.ej., las muestras de células, tejidos u órganos pueden obtenerse de aquellas células, tejidos u órganos que expresan o producen el biomarcador. La muestra puede estar congelada, ser fresca, fijada (p.ej. fijada con formalina), centrifugada y/o incluida (p.ej. incluida en parafina), etc. La muestra celular puede, evidentemente, someterse a una diversidad de técnicas post-recolección bien conocidas de preparación y almacenamiento (p.ej. la extracción de ácidos nucleicos y/o proteínas, la fijación, el almacenamiento, la congelación, la ultrafiltración, la concentración, la evaporación, la centrifugación, etc.) antes de evaluar el nivel del marcador en la muestra. De manera similar, también pueden someterse biopsias a técnicas post-recolección de preparación y almacenamiento, p.ej. la fijación.

En una realización, la muestra es una muestra de sangre, suero o, en particular, una muestra de plasma.

La muestra puede obtenerse del paciente en orden creciente de preferencia por lo menos un mes, por lo menos seis meses o por lo menos 12 meses después del inicio de la terapia de la insuficiencia cardíaca, en particular la terapia guiada por péptido de tipo PNC. Preferentemente, dicha terapia es terapia de la insuficiencia cardíaca medicinal.

El nivel de los biomarcadores a los que se hace referencia en la presente memoria puede determinarse en la misma muestra o en muestras diferentes (es decir, en dos o tres muestras diferentes) del paciente.

El término “medir” el nivel de un marcador tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la cuantificación del biomarcador, p.ej. para determinar el nivel del biomarcador en la muestra, utilizando métodos apropiados de detección descritos en otros sitios en la presente memoria. En una realización, el nivel de por lo menos un biomarcador se mide mediante la puesta en contacto de la muestra con un agente de detección que se une específicamente al marcador respectivo, formando de esta manera un complejo entre el agente y dicho marcador, la detección del nivel de complejo formado y, de esta manera, la medición del nivel de dicho marcador. En el caso de que el marcador sea ácido úrico, el nivel de dicho biomarcador puede medirse poniendo en contacto la muestra con agente de detección, en particular un enzima o compuesto, que permita la conversión de dicho biomarcador, p.ej. que permite la oxidación del ácido úrico. El enzima puede ser una uricasa (EC 1.7.3.3) que cataliza la oxidación del ácido úrico en 5-hidroxiisourato. Además, el enzima puede ser una peroxidasa. El compuesto puede ser ácido fosfotúngstico. En el caso de que el marcador sea urea, el agente de detección puede ser ureasa. En el caso de que el marcador sea glucosas, el agente de detección puede ser hexoquinasa. En el caso de que el marcador sea creatinina, el agente de detección puede ser ácido pícrico (que forma un complejo con la creatinina). El nivel del complejo de ácido pícrico y creatinina puede medirse.

El marcador “creatinina” es bien conocido de la técnica. En el metabolismo muscular, la creatinina se sintetiza endógenamente a partir de creatina y creatina fosfato. Bajo condiciones de función renal normal, la creatinina se excreta mediante filtración glomerular. Las determinaciones de creatinina se llevan a cabo para el diagnóstico y monitorización de la enfermedad renal aguda y crónica, así como para la monitorización de la diálisis renal. Las concentraciones de creatinina en la orina pueden utilizarse como valores de referencia para la excreción de determinados analitos (albúmina,  $\alpha$ -amilasa). La creatinina puede determinarse tal como indican Popper et al. (Popper H. et al. *Biochem Z* 1937;291:354), Seelig y Wüst (Seelig HP, Wüst H. *Ärztl Labor* 1969; 15:34) o Bartels (Bartels H. et al., *Clin. Chim. Acta* 1972;37:193). Por ejemplo, se añade hidróxido sódico y ácido pícrico a la muestra para iniciar la formación de complejo de creatinina-ácido pícrico. En solución alcalina, la creatinina forma un complejo amarillo-naranja con picrato. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de creatinina y puede medirse fotométricamente.

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en un organismo sujeto. El nombre de IUPAC es 7,9-dihidro-3H-purin-2,6,8-triona. El compuesto frecuentemente también se denomina urato, ácido lítico, 2,6,8-trioxipurina, 2,6,8-trihidroxipurina, 2,6,8-trioxopurina, 1H-purina-2,6,8-triol (compuesto de fórmula  $C_5H_4N_4O_3$ , PubChem CID 1175, número CAS 69-93-2).

Las mediciones del ácido úrico se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de numerosos trastornos renales y metabólico, incluyendo la insuficiencia renal, la gota, la leucemia, la soriasis, la inanición u otras condiciones de caquexia, y de pacientes que reciben fármacos citotóxicos. La oxidación del ácido úrico proporciona la base para dos enfoques a la determinación cuantitativa de este metabolito purina. Un enfoque es la reducción del ácido fosfotúngstico en una solución alcalina en azul de tungsteno, que se mide fotométricamente. Un segundo enfoque, descrito por Praetorius y Poulson, utiliza el enzima uricasa para oxidar el ácido úrico; este método elimina las interferencias intrínsecas a la oxidación química (Praetorius E., Poulson H., *Enzymatic Determination of Uric Acid with Detailed Directions*, *Scandinav. J. Clin. Lab. Investigation* 3:273-280, 1953). La uricasa puede utilizarse en métodos que implican la medición de UV del consumo de ácido úrico o, en combinación con otros enzimas, para proporcionar un ensayo colorimétrico. Otro método es el método colorimétrico desarrollado por Town et al. (Town MH, Gehm S, Hammer B, Ziegenhorn J. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985;23:591). La muestra se incuba inicialmente con una mezcla de reactivos que contiene ascorbato oxidasa y un sistema de aclarado. En dicho sistema de ensayo es importante que el ácido ascórbico presente en la muestra resulte eliminado en la reacción preliminar; lo anterior bloquear cualquier interferencia del ácido ascórbico con la reacción posterior del indicador POD. Tras la adición del reactivo iniciador, se inicia la oxidación del ácido úrico por la uricasa.

En el contexto de la presente invención, el ácido úrico puede determinarse mediante cualquier método que se considere apropiado. Preferentemente, el biomarcador se determina mediante los métodos anteriormente indicados. Más preferentemente, el ácido úrico se determina mediante la aplicación de una ligera modificación del método colorimétrico indicado anteriormente. En la presente reacción, el peróxido reacciona en presencia de peroxidasa (POD), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina (TOOS) y 4-aminofenazona para formar un pigmento quinona-diimina. La intensidad del color rojo formado es proporcional a la concentración del ácido úrico y se determina fotométricamente.

La urea es el producto final principal del metabolismo del nitrógeno de las proteínas. Presenta la fórmula química  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  y se sintetiza mediante el ciclo de la urea en el hígado a partir de amonio que se produce mediante desaminación de aminoácidos. La urea es excretada principalmente por los riñones, aunque también se excretan cantidades mínimas en el sudor y es degradada en los intestinos por la acción bacteriana. La determinación del nitrógeno de urea en sangre es el ensayo de cribado más ampliamente utilizado para la función renal. La urea puede medirse mediante un ensayo *in vitro* para la determinación cuantitativa de la urea/nitrógeno de la urea en suero, plasma y orina humanas en sistemas Roche/Hitachi cobas c. El ensayo puede llevarse a cabo automáticamente utilizando diferentes analizadores, incluyendo cobas c 311 y cobas c 501/502. El ensayo es un ensayo cinético con ureasa y glutamato deshidrogenasa. La urea es hidrolizada por la ureasa para formar amonio y carbonato. En la segunda reacción, el 2-oxoglutarato reacciona con el amonio en presencia de glutamato deshidrogenasa (GLDH) y el coenzima NADH para producir L-glutamato. En esta reacción, se oxidan 2 moles de NADH en  $\text{NAD}^+$  por cada mol de urea hidrolizada. La tasa de reducción de la concentración de NADH es directamente proporcional a la concentración de la urea en el espécimen y se mide fotométricamente.

El marcador glucosa también es bien conocido de la técnica. Tal como se utiliza en la presente memoria, el marcador preferentemente se refiere a D-glucosa. El nivel del marcador puede determinarse mediante métodos bien conocidos. Por ejemplo, el marcador puede fosforilarse a D-glucosa-6-fosfato en presencia del enzima hexoquinasa (HK) y adenosín-5'-trifosfato (ATP) con formación simultánea de adenosín-5'-difosfato (ADP). En presencia del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la D-glucosa-6-fosfato es oxidada por NADP a D-gluconato fosfato con formación de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). La cantidad de NADPH formada en dicha reacción es estequiométrica respecto a la cantidad de D-glucosa. NADPH puede medirse a partir de la absorbancia de la luz.

El marcador sodio es bien conocido de la técnica. El sodio es el catión extracelular principal y funciona para mantener la distribución de líquidos y la presión osmótica. Algunas causas de los niveles reducidos de sodio incluyen el vómito o diarrea prolongado, una reabsorción reducida en los riñones y una retención excesiva de líquidos. Entre las causas comunes de sodio incrementado se incluyen la pérdida excesiva de líquidos, una ingesta elevada de sales y una reabsorción renal incrementada. El nivel del marcador puede determinarse mediante la aplicación de un electrodo selectivo de iones (ESI) que utiliza las propiedades únicas de determinados materiales membranales para desarrollar un potencial eléctrico (fuerza electromotriz, FEM) para las mediciones de iones en solución. El electrodo presenta una membrana selectiva en contacto con tanto la solución de ensayo como una solución de relleno interna. La solución de relleno interna contiene el ion de ensayo a una concentración fija. Debido a la naturaleza particular de la membrana, los iones de ensayo se asocian estrechamente con la membrana en cada cara. Se determina la FEM de la membrana como la diferencia de concentraciones de ion de ensayo en la solución de ensayo y en la solución de relleno interna. La FEM se desarrolla según la ecuación de Nernst para un ion específico en solución.

El marcador hemoglobina (Hb) es bien conocido de la técnica. La hemoglobina comprende cuatro subunidades proteicas, conteniendo cada una fracción heme y es la proteína de pigmentación roja que se localiza en los eritrocitos. Su función principal es transportar oxígeno y dióxido de carbono en la sangre. Cada molécula de Hb es capaz de unirse a cuatro moléculas de oxígeno. La Hb consiste en una diversidad de subfracciones y derivados. El término "hemoglobina" tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente se refiere a hemoglobina total. El nivel de hemoglobina puede medirse mediante métodos bien conocidos, p.ej. mediante la oxidación de la hemoglobina a metemoglobina por el hexacianoferrato de potasio (III) ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ). El nivel de hemoglobina es proporcional a la intensidad de color y, p.ej., puede medirse a una longitud de onda de 567 nm a 37°C. El nivel de hemoglobina también puede medirse mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une específicamente a la hemoglobina.

El marcador HbA1c (hemoglobina glicada, glicohemoglobina) también es bien conocida en la técnica. HbA1c es una de las hemoglobinas glicadas, una subfracción formada mediante la unión de diversos azúcares a la molécula de Hb. HbA1c se forma en dos etapas mediante la reacción no enzimática de la glucosa con el grupo amino N-terminal de la cadena  $\beta$  de la Hb adulta normal (HbA). La primera etapa es reversible y rinde HbA1c lábil. Ésta se reorganiza para formar HbA1c estable en una segunda etapa de reacción. En los eritrocitos, la cantidad relativa de HbA convertida en HbA1c estable se incrementa con la concentración media de glucosa en la sangre. La conversión en HbA1c estable está limitada por el tiempo de vida de los eritrocitos, de aproximadamente 100 a 120 días. El nivel de la hemoglobina puede medirse mediante métodos bien conocidos. Preferentemente, la medición del nivel de HbA1c comprende la medición del nivel de todas las variantes de hemoglobina que están glicadas en el extremo N-terminal de la cadena  $\beta$  de la HbA (hemoglobina adulta). En una realización, el nivel de dicho marcador se mide mediante la puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo que se une específicamente a este marcador. En este caso, la glicohemoglobina (HbA1c) en la muestra reacciona con el anticuerpo anti-HbA1c para formar complejos de antígeno-anticuerpo solubles.

El hematócrito (Ht o HCT) también conocido como volumen concentrado celular (VCC) o fracción de volumen eritrocitario (FVE), es el porcentaje en volumen (%) de glóbulos rojos en la sangre. Tal como se utiliza, el término "hematócrito" preferentemente se refiere al porcentaje de glóbulos rojos concentrados en un volumen de sangre completa. El hematócrito puede determinarse mediante la centrifugación de sangre heparinizada en un tubo capilar (también conocido como tubo microhematócrito) a 10.000 rpm durante cinco minutos. Esta operación separa la sangre en capas. El volumen de glóbulos rojos concentrados dividido por el volumen total de muestra de sangre proporciona VCC. Debido a que se utiliza un tubo, puede calcularse mediante medición de las longitudes de las capas. Con los equipos de laboratorio modernos, el hematócrito se calcula en un analizador automatizado y no se mide directamente. Se determina mediante multiplicación del recuento de glóbulos rojos por el volumen celular medio. El hematócrito es ligeramente más preciso, ya que el VCC incluye pequeñas cantidades de plasma sanguíneo atrapado entre los glóbulos rojos. Puede obtenerse un hematócrito estimado como porcentaje multiplicando por tres la concentración de hemoglobina en g/dl y excluyendo las unidades.

Los biomarcadores a los que se hace referencia en la presente memoria pueden detectarse utilizando métodos generalmente conocidos de la técnica. Los métodos de detección generalmente comprenden métodos para cuantificar el nivel de un biomarcador en la muestra (método cuantitativo). Es generalmente conocido por el experto en la materia cuáles de los métodos siguientes resultan adecuados para la detección cualitativa y/o cuantitativa de un biomarcador. Las muestras pueden someterse a ensayo convenientemente para, p.ej., proteínas utilizando transferencias western e inmunoensayos, tales como ELISA, RIA, inmunoensayos basados en fluorescencia, que se encuentran disponibles comercialmente. Entre los métodos adecuados adicionales para detectar el biomarcador se incluyen medir una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido, tal como su masa molecular precisa o el espectro de RMN. Dichos métodos comprenden, p.ej., biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos, tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos cromatográficos. Además, entre los métodos se incluyen los métodos basados en ELISA de microplacas, inmunoensayos totalmente automatizados o robotizados (disponibles, por ejemplo, de analizadores Elecsys™), CBA (un ensayo enzimático de unión del cobalto, disponible en, por ejemplo, los analizadores Roche-Hitachi™) y ensayos de aglutinación de látex (disponibles en, por ejemplo, los analizadores Roche-Hitachi™).

Para la detección de proteínas biomarcadoras a las que se hace referencia en la presente memoria, se encuentra disponible un amplio abanico de técnicas de inmunoensayo que utilizan dicho formato de ensayo; ver, p.ej., las patentes US nº 4.016.043, nº 4.424.279 y nº 4.018.653. Entre ellas se incluyen los ensayos de tipo 'sandwich' tanto de un solo sitio como de dos sitios de los tipos no competitivos, así como en los ensayos de unión competitiva tradicionales. Entre dichos ensayos se incluyen además la unión directa de un anticuerpo marcado a un marcador diana.

Los ensayos de tipo sándwich son de entre los inmunoensayos más útiles y más comúnmente utilizados.

Los métodos para medir los fenómenos de electroquimioluminiscencia son bien conocidos. Dichos métodos utilizan la capacidad de algunos complejos metálicos especiales de alcanzar, mediante oxidación, un estado excitado del que se degradan al estado fundamental emitiendo electroquimioluminiscencia. Para una revisión, ver Richter M.M., Chem. Rev. 104:3003-3036, 2004.

Los biomarcadores también pueden detectarse mediante métodos generalmente conocidos, entre ellos la espectroscopía de resonancia magnética (espectroscopía de RMN), la cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), la cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM), la cromatografía líquida de alto y ultra-alto rendimiento, HPLC tales como la HPLC de fase inversa, por ejemplo la HPLC de apareamiento de iones con detección dual de longitudes de onda de UV, la electroforesis capilar con detección de la fluorescencia inducida por láser, la cromatografía de intercambio aniónico y detección de fluorescencia y la cromatografía de capa fina.

Preferentemente, medir el nivel de un biomarcador tal como se indica en la presente memoria comprende las etapas de: (a) poner en contacto una célula capaz de inducir una respuesta celular, la intensidad de la cual es indicativa del nivel del péptido o polipéptido con dicho péptido o polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular. Para medir respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade, preferentemente, a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión medible de un gen informador o la secreción de una sustancia, por ejemplo un péptido, polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia genera una señal de intensidad que se correlaciona con el nivel del péptido o polipéptido.

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

La medición del nivel de un péptido o polipéptido puede, preferentemente, comprender las etapas de: (a) poner en contacto el péptido con un agente de unión específico, (b) (opcionalmente) eliminar el agente de unión no unido, (c) medir el nivel de agente de unión unido, es decir, el complejo del agente de unión formado en la etapa (a). Según una realización preferente, dichas etapas de puesta en contacto, eliminación y medición pueden llevarse a cabo con una

unidad analizadora del sistema dado a conocer en la presente memoria. Según algunas realizaciones, dichas etapas pueden llevarse a cabo con una única unidad analizadora de dicho sistema o con más de una unidad analizadora en comunicación operable entre sí. Por ejemplo, según una realización específica, dicho sistema dado a conocer en la presente memoria puede incluir una primera unidad analizadora para llevar a cabo dichas etapas de puesta en contacto y eliminación y una segunda unidad analizadora, operablemente conectada con dicha primera unidad analizadora mediante una unidad transportadora (por ejemplo, un brazo robótico), que lleva a cabo dicha etapa de medición.

El agente de unión unido, es decir, el agente de unión o el complejo de agente de unión/péptido, generará una señal con una intensidad. La unión según la presente invención incluye la unión tanto covalente como no covalente. Un agente de unión según la presente invención puede ser cualquier compuesto, p.ej. un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña que se une al péptido o polipéptido indicado en la presente memoria. Entre los agentes de unión eferentes se incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos, tales como receptores o parejas de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos del mismo que comprenden los dominios de unión para los péptidos, y aptámeros, por ejemplo ácidos nucleicos o aptámeros peptídicos. Los métodos para preparar dichos agentes de unión son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también es ofrecida por proveedores comerciales. Al experto en la materia le resultarán familiares los métodos para desarrollar derivados de dichos agentes de unión de afinidad o especificidad más elevada. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. A continuación, dichos derivados pueden someterse a ensayo para la unión según los procedimientos de cribado conocidos de la técnica, por ejemplo la expresión fágica. Entre los anticuerpos a los que se hace referencia en la presente memoria se incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como los fragmentos Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub> que son capaces de unirse a antígenos o haptenos. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos híbridos humanizados, en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que muestre una especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donantes habitualmente incluyen por lo menos los residuos aminoácidos de unión a antígeno del donante, aunque también pueden comprender otros residuos aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos pueden prepararse mediante varios métodos bien conocidos de la técnica. Preferentemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido. La unión específica según la presente invención se refiere a que el ligando o agente no debe unirse sustancialmente ("reaccionar cruzadamente") con otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra que debe analizarse. Preferentemente, el péptido o polipéptido unido específicamente debe unirse con una afinidad por lo menos 3 veces más alta, más preferentemente por lo menos 10 veces más alta y todavía más preferentemente por lo menos 50 veces más alta, que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, en caso de que todavía pueda distinguirse y medirse inequívocamente, por ejemplo según su tamaño en una transferencia western, o por su abundancia relativamente más alta en la muestra. La unión del agente de unión puede medirse mediante cualquier método conocido de la técnica. Preferentemente, dicho método es semicuantitativo o cuantitativo. A continuación, se describen técnicas adecuadas adicionales para la determinación de un polipéptido o péptido.

En una realización del método de la presente invención, los niveles de los biomarcadores a los que se hace referencia en la presente memoria se miden mediante la utilización de los ensayos descritos en la sección de Ejemplos.

En otra realización del método de la presente invención, la medición en la etapa a) puede llevarse a cabo mediante una unidad analizadora, en particular mediante una unidad analizadora tal como se define en otros sitios de la presente memoria.

La expresión "agente de unión" o "agente de detección" se refiere a una molécula que comprende una fracción de unión que se une específicamente al biomarcador respectivo correspondiente. Son ejemplos de "agente de unión", un aptámero, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido péptido-nucleico (APN) o un compuesto químico.

La expresión "unión específica" o "de unión específica" se refiere a una reacción de unión en la que moléculas de la pareja de unión muestran unión entre sí bajo condiciones en las que no se unen significativamente a otras moléculas. La expresión "unión específica" o "se une específicamente", en referencia a una proteína o péptido como biomarcador, se refiere a una reacción de unión en la que un agente de unión se une a la molécula diana correspondiente con una afinidad de por lo menos 10<sup>-7</sup> M. La expresión "unión específica" o "se une específicamente" preferentemente se refiere a una afinidad de por lo menos 10<sup>-8</sup> M o incluso más preferentemente de por lo menos 10<sup>-9</sup> M para su molécula diana. El término "específico" o "específicamente" se utiliza para indicar que otras moléculas presentes en las muestras no se unen significativamente al agente de unión específico para la molécula diana. Preferentemente, el nivel de unión a una molécula diferente de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que es sólo 10% o inferior, más preferentemente sólo 5% o inferior de la afinidad para la molécula diana.

Son ejemplos de "agentes de unión", una sonda de ácidos nucleicos, un cebador de ácidos nucleicos, una molécula de ADN, una molécula de ARN, un aptámero, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido, un ácido péptido-nucleico (APN) o un compuesto químico. Un agente de unión preferente es un anticuerpo que se une específicamente al biomarcador que debe medirse. El término "anticuerpo" en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales,

anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, con la condición de que muestren la actividad de unión a antígeno deseada. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5 Otro agente de unión que puede aplicarse, en un aspecto, puede ser un aptámero que se une específicamente a por lo menos un marcador en la muestra. La expresión “unión específica” o “se une específicamente”, en referencia a un aptámero de ácidos nucleicos como agente de unión, se refiere a una reacción de unión en la que un aptámero de ácidos nucleicos se une a la molécula diana correspondiente con una afinidad en el intervalo de pocos nM a pM.

10 En todavía otro aspecto, la muestra se extrae del complejo formado entre el agente de unión y por lo menos un marcador antes de la medición del nivel de complejo formado. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, el agente de unión puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. En todavía otro aspecto, la muestra puede extraerse del complejo formado sobre el soporte sólido mediante la aplicación de una solución de lavado. El complejo formado será proporcional al nivel de por lo menos un marcador presente en la muestra. Se entenderá que la especificidad y/o  
 15 sensibilidad del agente de unión que debe aplicarse define el grado de proporción de por lo menos un marcador comprendido en la muestra que es capaz de unirse específicamente. También se encuentran en otros sitios de la presente invención información adicional sobre cómo puede llevarse a cabo la determinación. El nivel de complejo formado se transforma en un nivel de por lo menos un marcador que refleja el nivel presente efectivamente en la muestra. Dicha cantidad, en un aspecto, puede ser esencialmente la cantidad presente en la muestra o puede ser, en otro aspecto, una cantidad que es una determinada proporción de la misma debido a la relación entre el complejo formado y la cantidad presente en la muestra original.

El término “nivel” tal como se utiliza en la presente memoria comprende la cantidad absoluta de un biomarcador al que se hace referencia en la presente memoria, la cantidad o concentración relativa de dicho biomarcador, así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona con los mismos o que puede derivarse de los mismos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de señal de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas a partir de dichos péptidos mediante mediciones directas, p.ej. valores de intensidad en los espectros de masas o espectros de RMN. Además, se encuentran comprendidos todos los valores o parámetros que se obtienen mediante mediciones indirectas especificadas en otros sitios de la presente descripción, por ejemplo niveles de respuesta determinados en sistemas biológicos de lectura en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidos de ligandos unidos específicamente. Debe entenderse que los valores correlacionados con las cantidades o parámetros anteriormente indicados también pueden obtenerse mediante todas las operaciones matemáticas estándares.

35 El término “comparar” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a comparar el nivel de los biomarcadores en la muestra del individuo o paciente con el nivel de referencia de los biomarcadores especificados en otros sitios en la presente descripción. Debe entenderse que comparar tal como se utiliza en la presente memoria habitualmente se refiere a una comparación de los parámetros o valores correspondientes, p.ej., con una cantidad absoluta con una cantidad de referencia absoluta, mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia o se compara una señal de intensidad obtenida del biomarcador en una muestra con el mismo tipo de señal de una intensidad obtenida de una muestra de referencia. La comparación puede llevarse a cabo manualmente o asistida por ordenador. De esta manera, la comparación puede llevarse a cabo con un dispositivo informático (p.ej. de un sistema dado a conocer en la presente memoria). El valor del nivel medido o detectado del biomarcador en la muestra del individuo o paciente y el nivel de referencia pueden, p.ej., compararse entre sí y dicha comparación puede llevarse a cabo automáticamente con un programa informático que ejecuta un algoritmo para la comparación. El programa informático que lleva a cabo dicha evaluación proporcionará la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos utilizando 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. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos utilizando 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.

55 En determinadas realizaciones, la expresión “nivel de referencia” se refiere en la presente memoria a un valor predeterminado para el biomarcador respectivo. En este contexto, “nivel” comprende la cantidad absoluta, la cantidad relativa o concentración, así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona con la misma o puede derivarse a partir de la misma. Preferentemente, el nivel de referencia es un nivel que permite asignar el paciente a un grupo de pacientes elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, o a un grupo de pacientes no elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca. De esta manera, el nivel de referencia permite diferenciar entre un paciente que es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca y un paciente que no es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.

65 Tal como apreciará el experto en la materia, el nivel de referencia está predeterminado y se ha fijado para satisfacer requisitos rutinarios en términos de, p.ej. especificidad y/o sensibilidad. Estos requisitos pueden variar, p.ej. según el

organismo regulador. Puede ocurrir, por ejemplo, que la sensibilidad o la especificidad del ensayo, respectivamente, deban fijarse en determinados límites, p.ej. 80%, 90%, 95% o 98%, respectivamente. Dichos requisitos también pueden definirse en términos de valores predictivos positivos o negativos. Sin embargo, basándose en las enseñanzas proporcionadas en la presente invención, en todo caso será posible para el experto en la materia alcanzar un nivel de referencia que satisfaga dichos requisitos. En una realización, el nivel de referencia se determina en una muestra o muestras de referencia de un paciente (o grupo de pacientes) que presenta insuficiencia cardíaca y que es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca o en una muestra o muestras de referencia de un paciente (o grupo de pacientes) que presenta insuficiencia cardíaca y que no es elegible para intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca. El nivel de referencia en una realización ha sido predeterminado en muestras de referencia procedentes de la entidad de enfermedad a la que pertenece el paciente. En determinadas realizaciones, el nivel de referencia puede, p.ej., fijarse en cualquier porcentaje entre 25% y 75% de la distribución global de los valores en una entidad de enfermedad investigada. En otras realizaciones, el nivel de referencia puede, p.ej., fijarse en la mediana, terciles o cuartiles determinados de la distribución global de los valores en muestras de referencia procedentes de una entidad de enfermedad investigada. En una realización, el nivel de referencia se fija en el valor de la mediana según se determina a partir de la distribución global de los valores en una entidad de enfermedad investigada. El nivel de referencia puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos, tales como la edad, el género o la subpoblación, así como de los medios utilizados para la determinación de los biomarcadores a los que se hace referencia en la presente memoria. En una realización, la muestra de referencia es de esencialmente el mismo tipo de fuente de células, tejidos, órganos o líquido corporal que la muestra del individuo o paciente sometido al método de la invención, p.ej. en el caso de que según la invención se utilice sangre como muestra para determinar el nivel de biomarcadores en el individuo, también se determina el nivel de referencia en sangre o una parte de la misma.

En determinadas realizaciones, la expresión “mayor que el nivel de referencia” o “superior al nivel de referencia” se refiere a un nivel del biomarcador en la muestra del individuo o paciente superior al nivel de referencia o a un incremento global de 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o superior, determinado mediante los métodos descritos en la presente memoria, en comparación con el nivel de referencia. En determinadas realizaciones, el término incremento se refiere al incremento del nivel de biomarcador en la muestra del individuo o paciente, en el que el incremento es por lo menos aproximadamente 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 o 100 veces superior al nivel de referencia, p.ej. predeterminado a partir de una muestra de referencia.

En determinadas realizaciones, la expresión “inferior al nivel de referencia” o “inferior” en la presente memoria se refiere a un nivel del biomarcador en la muestra del individuo o paciente inferior al nivel de referencia o a una reducción global de 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior, determinado mediante los métodos descritos en la presente memoria, en comparación con el nivel de referencia. En determinadas realizaciones, el término reducción del nivel de biomarcador en la muestra del individuo o paciente, en el que el nivel reducido es como máximo aproximadamente 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 o 0,01 veces el nivel de referencia, p.ej. predeterminado a partir de una muestra de referencia, o inferior.

Lo siguiente se aplica a un algoritmo diagnóstico en el caso de que el marcador o marcadores se seleccionan del grupo que consiste en creatinina, urea, glucosa y HbA1c (hemoglobina glicada). preferentemente, un nivel (niveles) de por lo menos un marcador en la muestra procedente del paciente que es superior al nivel de referencia (niveles de referencia) de dicho marcador (marcadores) indica que el paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca y/o un nivel (niveles) de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia (niveles de referencia) para dicho marcador (marcadores) indica que el paciente no es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.

Lo siguiente se aplica como algoritmo diagnóstico en el caso de que por lo menos un marcador se seleccione del grupo que consiste en sodio, hemoglobina y hematócrito: preferentemente, un nivel (niveles) de por lo menos un marcador en la muestra procedente del paciente que es inferior al nivel de referencia (niveles de referencia) de dicho marcador (marcadores) indica que el paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca y/o un nivel (niveles) de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia (niveles de referencia) para dicho marcador (marcadores) indica que el paciente no es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.

La Tabla A, a continuación, proporciona intervalos preferentes para niveles de referencia (tercera columna) para los diversos marcadores, así como niveles de referencia específicos preferentes (cuarta columna). El experto en la materia puede determinar niveles de referencia adicionales sin operaciones adicionales.

Tabla A

Marcador/Parámetro	Unidades	nivel de referencia dentro del intervalo de entre	nivel de referencia
creatinina	mg/dl	aproximadamente 1,2 a 1,8	aproximadamente 1,5
NUS (urea)	mmoles/l	aproximadamente 10 a 12	aproximadamente 11,1
Glucosa	mmoles/l	aproximadamente 10 a 13	aproximadamente 11,6

HbA1c	%	aproximadamente 0,05 a 0,07	aproximadamente 0,06
hemoglobina	g/dl	aproximadamente 7,5 a 8,5	aproximadamente 8,04
hematócrito	%	aproximadamente 0,37 a 0,43	aproximadamente 0,40
sodio	mmoles/l	aproximadamente 130 a 142	aproximadamente 141

Con respecto a la duración de QRS, la referencia puede encontrarse en el intervalo de aproximadamente 140 a aproximadamente 180 ms. En una realización, la referencia es aproximadamente 160 ms.

5 En el contexto de la presente invención, se encuentra contemplado medir el nivel de un único marcador o de una combinación de marcadores. De esta manera, se encuentra contemplado medir el nivel de dos, tres, cuatro o incluso más marcadores. Las combinaciones preferentes son las siguientes:  
por ejemplo, se encuentran contempladas las combinaciones de marcadores siguientes:

- 10
- creatinina y sodio;
  - urea y HbA1c;
  - hematócrito y creatinina.

15 Según la presente invención, puede medirse el nivel de un determinado marcador con el fin de identificar un paciente que es elegible para la intensificación de una determinada terapia de la insuficiencia cardíaca, en particular el tratamiento intensificado con un determinado medicamento. Por ejemplo, puede utilizarse un marcador con el fin de evaluar si el tratamiento con el medicamento debe intensificarse o no (p.ej., si la dosis del medicamento administrado debe incrementarse o no). Por ejemplo, en el caso de que el marcador que debe medirse es la creatinina, la terapia de la insuficiencia cardíaca que debe intensificarse preferentemente es el tratamiento con un beta-bloqueante.

20 Las definiciones proporcionadas anteriormente en la presente memoria se aplican por analogía a lo siguiente. Además, las etapas llevadas a cabo en relación al método descrito anteriormente en la presente memoria, pueden llevarse a cabo según el método siguiente.

25 La presente invención se refiere además a un método, en particular a un método *in vitro*, para identificar un paciente que es elegible para una intensificación de terapia de la insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 30
- (a) medir el nivel de un péptido de tipo PNC en una muestra procedente de un paciente que presenta insuficiencia cardíaca y que rece terapia para la insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC;
  - (b) medir el nivel de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematócrito en una muestra del paciente;
  - (c) comparar el nivel del péptido de tipo PNC medido en (a) con un nivel de referencia (o niveles de referencia), y
  - (d) comparar el nivel (o niveles) de por lo menos un marcador medido en (b) con un nivel de referencia (o niveles de referencia).
- 35

Llevando a cabo la etapa (c) o (d), se identifica un paciente que es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca. En una realización, el método comprende además la etapa (e) de identificación o selección de un paciente que es elegible para una intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca. Además, el método puede comprender la etapa (f) de intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca o de recomendación de la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca (en el caso de que el paciente haya sido identificado como elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca). De acuerdo con lo anterior, la presente invención contempla además un método de intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas (a) a (f) tal como se ha explicado anteriormente.

45 Además, el marcador al que se hace referencia en la etapa a), o alternativamente, la duración de QRS, puede medirse o proporcionarse y compararse con una referencia (tal como se indica de manera general en otros sitios de la presente memoria).

50 Además, del método descrito anteriormente, el método comprende además la etapa de medir el nivel de un péptido de tipo PNC.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "péptidos de tipo PNC" comprende pre-proPNC, proPNC, NT-proPNC y PNC. El pre-propéptido (134 aminoácidos en el caso de preproPNC) comprende un péptido de señal corto que es escindido enzimáticamente para liberar el propéptido (108 aminoácidos en el caso de proPNC). El propéptido se corta adicionalmente en un propéptido N-terminal (NT-propéptido, 76 aminoácidos en el caso de NT-proPNC) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de PNC). Preferentemente, los péptidos de tipo PNC según la presente invención son NT-proPNC, PNC (péptido natriurético cerebral) y variantes de los mismos. PNC es la hormona activa y presenta una semivida más corta que la contrapartida inactiva respectiva, NT-proPNC. PNC es metabolizado en la sangre, mientras que NT-proPNC circula en la sangre en forma de una molécula intacta y sin modificación es eliminada renalmente. La semivida *in vivo* de NT-proPNC es 120 min. más larga que la de la PNC, que es de 20 min. (Smith, J.

55

60

Endocrinol. 167: 239-46). La preanalítica es más robusta con NT-proPNC, permitiendo un fácil transporte de la muestra a un laboratorio central (Mueller, Clin. Chem. Lab. Med. 42: 942-4, 2004). Pueden almacenarse las muestras de sangre a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse por correo o embarcarse sin pérdidas. En contraste, el almacenamiento de PNC durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4°C conduce a una pérdida de concentración de por lo menos 20% (Mueller *loc. cit.*; Wu, Clin. Chem. 50: 867-73, 2004). Por lo tanto, dependiendo del curso temporal o propiedades de interés, la medición de las formas activas o inactivas del péptido natriurético puede resultar ventajosa. Los péptidos de tipo PNC más preferentes según la presente invención son NT-proPNC y variantes del mismo. Tal como se ha comentado brevemente anteriormente, el NT-proPNC humano, al que se hace referencia según la presente invención, es un polipéptido que comprende, preferentemente, 76 aminoácidos de longitud correspondiente a la parte N-terminal de la molécula de NT-proPNC humana. La estructura de PNC y NT-proPNC humanas ya ha sido descrita en detalle en la técnica anterior, p.ej. en los documentos nº WO 02/089657 y nº WO 02/083913, o Bonow, *loc. cit.* Preferentemente, NT-proPNC humano tal como se utiliza en la presente memoria es NT-proPNC humano tal como se da a conocer en la patente nº EP 0 648 228 B1. El NT-proPNC al que se hace referencia según la presente invención comprende además variantes alélicas y otras variantes de dicha secuencia específica para el NT-proPNC humano comentado anteriormente. Específicamente, se encuentran contemplados polipéptidos variantes que al nivel de los aminoácidos preferentemente son 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticos a NT-proPNC humano, preferentemente a lo largo de la longitud completa de NT-proPNC humano. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos de la técnica. Preferentemente, el grado de identidad debe determinarse mediante comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la que el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (p.ej., huecos o extremos protuberantes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se observa el residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el número por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman, *Add. Appl. Math.* 2:482, 1981); mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para la comparación, preferentemente se utilizan GAP y BESTFIT para determinar la alineación óptima y, de esta manera, el grado de identidad. Preferentemente se utilizan los valores por defecto de 5,00 para el peso de hueco y de 0,30 para el peso de longitud de hueco. Las variantes a las que se ha hecho referencia anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualesquiera otros homólogos, parálogos u ortólogos específicos de especie. Son sustancialmente similares y también se encuentran contemplados los productos de degradación proteolítica que todavía se identifican por medios diagnósticos o mediante ligandos dirigidos contra el péptido de longitud completa respectivo. También se encuentran comprendidos polipéptidos variantes que presentan deleciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de NT-proPNC humano con la condición de que dichos polipéptidos presenten propiedades de NT-proPNC. Las propiedades de NT-proPNC a las que se hace referencia en la presente memoria son propiedades inmunológicas y/o biológicas. Preferentemente, las variantes de NT-proPNC presentan propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítomos) comparables a las de la NT-proPNC humana. De esta manera, las variantes pueden reconocerse mediante los medios o ligandos anteriormente mencionados utilizados para la determinación de la cantidad de péptidos natriuréticos. Las propiedades biológicas y/o inmunológicas de NT-proPNC pueden detectarse mediante el ensayo descrito en Karl et al. (*Karl, Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 230:177-181, 1999), Yeo et al. (*Yeo, Clinica Chimica Acta* 338:107-115, 2003). Además, se describe un ensayo para la determinación de NT-proPNC en Mueller T. et al., *Clinica Chimica Acta* 341 (2004) 41-48. En una realización, NT-proPNC se lleva a cabo tal como se indica en cualquiera de las referencias anteriormente mencionadas. Las variantes incluyen además péptidos modificados post-traduccionalmente, tales como péptidos glucosilados. Además, una variante según la presente invención también es un péptido o polipéptido que ha sido modificado tras la recolección de la muestra, por ejemplo mediante la unión covalente o no covalente de un marcaje, particularmente un marcaje radioactivo o fluorescente, al péptido.

La expresión "nivel de referencia" ha sido definida anteriormente. El nivel de referencia para el péptido de tipo PNC, preferentemente, debe ser un nivel que, considerado por sí solo (es decir, no en combinación con marcadores adicionales, tales como a los que se hace referencia en el contexto de la presente invención) es indicativo de un paciente que no es elegible para una intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca. Los niveles de referencia preferentes de dicho péptido de tipo PNC son indicativos de la intensificación de la terapia de insuficiencia cardíaca que debe aplicarse en el contexto de la presente invención son los indicados en los Ejemplos. Los niveles de referencia preferentes se encuentran comprendidos en un intervalo de aproximadamente 80 a 400 pg/ml, o en particular, de aproximadamente 80 a 200 pg/ml para PNC, o dentro de un intervalo de aproximadamente 450 a 2.200 pg/ml, o en particular de aproximadamente 800 pg/ml a 1.200 pg/ml para NT-proPNC. Son niveles de referencia preferentes adicionales: aproximadamente 100 pg/ml o 400 pg/ml para PNC, y aproximadamente 1.000 pg/ml o 1.200 pg/ml para NT-proPNC.

Los niveles o intervalos de referencia preferente para los niveles de referencia de los marcadores creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematocrito se muestran en la Tabla A, anteriormente.

5 Lo siguiente se aplica a un algoritmo diagnóstico en el caso de que por lo menos un marcador medido en la etapa (b) se selecciona del grupo que consiste en creatinina, urea, glucosa y HbA1c (hemoglobina glicada):

10 (a) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es superior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca;

(b) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca;

15 (c) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es superior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca; y/o

20 (d) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente no es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca;

25 Alternativamente o adicionalmente, se aplica lo siguiente como algoritmo diagnóstico en el caso de que por lo menos un marcador medido en la etapa (b) se selecciona del grupo que consiste en sodio, hemoglobina y hematocrito:

(a) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es superior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca;

30 (b) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca;

35 (c) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es superior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca; y/o

40 (d) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente no es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.

El paciente que debe someterse a ensayo de acuerdo con el método anteriormente mencionado puede mostrar cualquier nivel (en particular cualquier nivel en sangre, suero o plasma) de un péptido de tipo PNC.

45 Además, la presente invención se refiere a un método para optimizar la terapia de la insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC, comprendiendo dicho método las etapas de:

50 (a) medir el nivel de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematocrito en una muestra de un paciente que presenta insuficiencia cardíaca y que recibe terapia guiada por péptido de tipo PNC, y

(b) comparar el nivel (o niveles) del marcador (o marcadores) medidos en (a) con un nivel de referencia (o niveles de referencia) y

(c) optimizar la terapia guiada por péptido de tipo PNC.

55 El paciente según el método anteriormente mencionado preferentemente muestra un nivel (en particular un nivel en sangre, suero o plasma) de un péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC, siendo indicativo de intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.

60 La presente invención se refiere además a la utilización de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematocrito y/o a la utilización de por lo menos un agente de detección de un marcador seleccionado del grupo de marcadores que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematocrito en una muestra de un paciente que presenta insuficiencia cardíaca y que está recibiendo terapia para insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC, para la identificación de un paciente que es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca o para la optimización de la terapia de la insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC.

65

En el caso de que el marcador sea un polipéptido o péptido, en particular en el caso de que el marcador sea HbA1c (hemoglobina glicada), el agente de detección preferentemente se une específicamente a dicho marcador. En este caso, el agente de detección preferentemente es un anticuerpo monoclonal o policlonal (para una definición del término "anticuerpo", ver en otros sitios en la presente memoria). Para los marcadores restantes, el agente de detección puede ser un agente que forma un complejo con el marcador, permitiendo de esta manera la medición del nivel del marcador, o un enzima que permite la conversión del marcador tal como se indica en otros sitios en la presente memoria.

En el caso de que el marcador sea creatinina, el agente de detección puede ser ácido pícrico, que forma un complejo con la creatinina.

En el caso de que el marcador sea ácido úrico, el agente de detección puede ser uricasa o peroxidasa.

En el caso de que el marcador sea urea, el agente de detección puede ser ureasa.

En el caso de que el marcador sea glucosa, el agente de detección puede ser una hexoquinasa.

### Ejemplos

A continuación, se ilustra la invención mediante los Ejemplos siguientes, que no pretenden restringir o limitar el alcance de la presente invención.

#### Ejemplo 1: Pacientes

499 pacientes que sufrían de IC (IC sistólica de clase II-IV de NYHA (FEVI $\leq$ 45%) fueron controlados según la diana NT-proPNC o se sometieron a los cuidados habituales (Pfisterer M. et al. JAMA. 2009; 301:383-92). Globalmente, los pacientes con niveles de NT-proPNC <1.000 pg/ml, un valor de corte previamente identificado para un buen resultado clínico, presentaron un resultado significativamente mejor que aquellos con niveles de NT-proPNC que no pudieron reducirse a estos niveles. Sin embargo, algunos de los pacientes con niveles bajos de NT-proPNC, <1.000 pg/ml siguieron en riesgo. Además, algunos pacientes con niveles de NT-proPNC ligeramente superiores a 1.000 pg/ml presentaron un riesgo inesperadamente elevado. Este riesgo pudo identificarse con buena precisión mediante la medición adicional de los niveles de marcador y de parámetros clínicos, por ejemplo después de 6 meses de terapia. Además, estos marcadores y parámetros adicionales proporcionaron además importante información adicional para la potencial guía terapéutica en el grupo con riesgo más alto (es decir, niveles de NT-proPNC después de 6 meses >1.000 pg/ml).

Los niveles de PNC y/o de NT-proPNC junto con uno o varios marcadores y/o parámetros clínicos se midieron a intervalos regulares de entre pocas semanas y cada seis meses. En el caso de que la intensificación de la terapia médica fuese clínicamente necesaria y/o indicada para PNC/NT-proPNC y/o uno de estos marcadores y/o parámetros adicionales, estos sujetos realizaron visitas de seguimiento a la clínica cada pocas semanas hasta alcanzar una terapia médica óptima/máxima, hasta alcanzar el objetivo de diana PNC/NT-proPNC de  $\leq$ 100-200 pg/ml y  $\leq$ 1.000 pg/ml, respectivamente y los siguientes objetivos de diana o el sujeto requiriese hospitalización.

La Tabla 1 muestra los valores de corte para marcadores y parámetros clínicos adicionales (basados en valores de corte optimizados mediante ROC y puntos de inflexión de deciles de riesgo; ambos métodos proporcionan valores de corte similares para la identificación del riesgo residual; en el caso de que ambos se encuentren disponibles, debe aplicarse el valor de corte más bajo):

Tabla 1:

Marcador/ Parámetro	Unidades	Valor de corte optimizado según ROC	Valor de corte de decil de riesgo
creatinina	mg/dl	1,5	No aplicable (n.a.)
NUS (urea)	mmoles/l	12,1	11,1
Glucosa	mmoles/l	n.a.	11,6
HbA1c	%	0,06	n.a.
hsCRP	mg/ml	10,4	12,7
cistatina C	mg/l	1,9	n.a.
IL-6	pg/ml	9,3	9,9
prealbúmina	g/l	0,16	n.a.
sFLt-1	pg/ml	87,3	94,3
ácido úrico	mg/dl	9,1	9,4
GFD-15	pg/ml	4270	3210
sST2	ng/ml	41,5	45,0
galectina-3	ng/ml	29,0	25,1
endostatina	ng/ml	243	257

mimecán	ng/ml	45,3	46,7
IGFBP-7	ng/ml	75,3	71,4
osteopontina	ng/ml	113,5	114,5
hemoglobina	g/dl	8,04	n.a.
hematócrito	%	0,40	n.a.
duración de QRS	ms	159	160
sodio	mmoles/l	140,5	141

La Tabla 2 muestra las puntuaciones de Wald, valores de p y cocientes de riesgo (CR, con intervalos de confianza al 95%) de biomarcadores y parámetros clínicos en pacientes guiados según NT-proPNC. Las puntuaciones de Wald y los cocientes de riesgo indican el riesgo remanente de descompensación, hospitalización o muerte en pacientes guiados con péptidos de tipo PNC.

5

Variable	de Wald	Valor de p	CR	IC al 95%
Hb	2,0	0,16	0,82	0,62-1,08
creatinina	19,9	<0,001	3,76	2,10-6,73
NUS	24,1	<0,001	1,10	1,06-1,14
Hct	2,0	0,16	0,01	0,00-5,80
glucosa	3,5	0,06	1,11	1,00-1,23
HbA1c	3,3	0,07	n/a	n/a
hsCRP log	4,3	0,04	1,68	1,03-2,75
CysC	17,8	<0,001	2,71	1,71-4,31
IL6 log	7,7	0,006	2,64	1,33-5,24
PREABL	5,5	0,02	0,001	0,00-0,32
sFIT log	3,0	0,08	3,20	0,86-11,84
hsTnT log	15,0	<0,001	3,81	1,94-7,48
ácido úrico	5,0	0,03	1,19	1,02-1,39
GDF15 log	17,9	<0,001	26,10	5,77-118,07
ST2 log	8,7	0,003	4,24	1,62-11,09
Gal3 log	6,8	0,009	6,53	1,59-26,83
endostatina	8,2	0,004	88,43	4,11-1901,95
mimecán	7,0	<0,001	1,03	1,02-1,05
IGFBP7	6,4	0,01	0,98	0,97-1,00
OPN (osteopontina)	2,2	0,14	1,005	1,00-1,01
sodio	5,8	0,02	0,93	0,87±0,99

Todos los sujetos con una concentración de PNC/NT-proPNC >100-200 pg/ml y >1.000 pg/ml y niveles de marcador/parámetro superiores a los valores de corte en la tabla, anteriormente (o inferiores en el caso de hemoglobina, hematócrito, IGFBP-7 y sodio), respectivamente, se consideraron para la terapia farmacológica y/o la intensificación de la terapia con dispositivo, con independencia del estado de los síntomas, estabilidad percibida y con una reevaluación cuidadosa de la presencia de un programa médico "óptimo". Además, los sujetos con concentración de PNC/NT-proPNC <100-200 pg/ml y <1.000 pg/ml, respectivamente y niveles de marcador/parámetro superiores a los valores de corte, tal como se muestran anteriormente, se consideraron para la terapia farmacológica y/o la intensificación de la terapia con dispositivo. El control de los pacientes de IC según tal terapia de IC guiada por marcadores combinados es el mismo que con el estándar de cuidado y comprende todos los fármacos, dispositivos y opciones de tratamiento recomendados por las directrices de práctica. La intensificación de la terapia consiste en incrementar la dosis de fármacos anteriormente prescritos o la adición de fármacos con un modo de acción o terapia de dispositivo diferente, ejercicio, dieta o una combinación de los mismos en cumplimiento con las directrices de práctica y consistentemente con las mejores prácticas clínicas. No se utiliza ningún algoritmo particular de titulación de fármaco o de selección de fármaco. Aunque los diuréticos del asa pueden reducir las concentraciones de NT-proPNC, típicamente no se consideran terapia de "primera línea" para un paciente no congestionado con un nivel elevado de NT-proPNC, dada la falta de beneficio de mortalidad de tales agentes en el contexto de la IC crónica.

10

15

20

25

30

Una vez los ajustes de la medicación resultan en la consecución de un valor diana o el sujeto está sintomáticamente estable, el sujeto se considera que se encuentra en un "régimen médico óptimo dirigido con marcador combinado" y por lo tanto se retira del bucle de seguimiento de pocas semanas y se visita en la siguiente consulta clínica programada (intervalos de monitorización periódicos). Los niveles de marcador combinado durante las visitas posteriores o durante las mediciones de marcador combinado en la cabecera del paciente (utilizando ensayos de punto de cuidado) puede utilizarse para guiar adicionalmente la terapia de la IC, es decir, para incrementar o reducir adicionalmente la intensidad de la terapia en visitas y bucles de medición de PNC/NT-proPNC similares, tal como se ha indicado anteriormente.

En el caso de que el sujeto no alcance los objetivos de marcador/parámetro combinado diana pero sí alcance un límite terapéutico claro, el sujeto será retirado del bucle de seguimiento cada pocas semanas y se visitará en la siguiente

consulta clínica programada. Este sujeto es reevaluado en esa consulta clínica programada con respecto a los niveles de marcador combinado y a las oportunidades de titulación adicional de la medición y el ajuste de las opciones de tratamiento. La invención de estratificación adicional según marcadores y parámetros adicionales también proporciona un beneficio a los pacientes con dianas de NT-proPNC más elevada, p.ej. 3.000 pg/ml. Específicamente, debido a que no todos los pacientes pueden alcanzar dianas de NT-proPNC  $\leq 1.000$  pg/ml, pueden utilizarse valores de corte de la diana más altos y a estos niveles, marcadores y parámetros clínicos adicionales todavía pueden proporcionar una estratificación de riesgos, monitorización y beneficios de la guía terapéutica adicionales.

En comparación con la técnica anterior y los enfoques guiados por biomarcador de la IC anteriores, la invención proporciona niveles de marcador y parámetro diana adicionales más allá de los intervalos de la diana de PNC/NT-proPNC. La invención además mejora la identificación de los pacientes que no se benefician óptimamente de la terapia de la IC guiada por PNC/NT-proPNC.

Además, las asociaciones de niveles de marcador, modificaciones de la terapia y resultados, indican que el riesgo residual reflejado por los diferentes parámetros, anteriormente, pueden modificarse utilizando las terapias disponibles. Esta asociación indica que las diversas combinaciones de marcadores pueden aplicarse a la terapia guiada de la insuficiencia cardíaca más allá de NT-proPNC. Un ejemplo de estas asociaciones terapéuticas se muestra posteriormente:

combinación de NT-proPNC y creatinina para guiar los beta-bloqueantes: Los pacientes guiados con NT-proPNC y concentraciones elevadas de creatinina a los 6 meses presentan un buen resultado clínico con una dosis elevada de beta-bloqueante o dosis crecientes de beta-bloqueantes.

#### Ejemplo 2: Ensayos

Se determinó NT-proPNC utilizando el ensayo ELISA de electroquimioluminiscencia de Roche llamado Elecsys proBNP II STAT (por sus siglas en inglés, tiempo de ejecución corto). El ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos situados en la parte N-terminal (1-76) de proPNO (1-108).

Se midió la IL-6 (interleuquina 6) mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA, Roche Diagnostics). El ensayo se llevó a cabo utilizando un analizador Cobas E601 de Roche Diagnostics. El ensayo se basa en una primera incubación con un anticuerpo monoclonal biotinilado específico de IL-6 y una segunda incubación con un anticuerpo monoclonal específico de IL-6 marcado con un complejo de rutenio y micropartículas recubiertas de estreptavidina.

Se determinó CRP altamente sensible (hs, por sus siglas en inglés) utilizando un ensayo inmunoturbidimétrico con refuerzo de partículas de Roche Diagnostics (proteína C-reactiva cardíaca Tina-quant (latex) altamente sensible). En este ensayo, los anticuerpos anti-CRP acoplado con micropartículas de látex reaccionan con el antígeno en la muestra formando un complejo de antígeno/anticuerpo. Tras la aglutinación, se mide el complejo turbidimétricamente.

Con el fin de determinar la concentración de GDF-15 en muestras de suero y plasma, se utiliza un ensayo prototipo Elecsys, utilizando un anticuerpo IgG policlonal de cabra anti-GDF-15 humano purificado mediante cromatografía de afinidad a GDF-15 de R&D Systems (AF957). En cada experimento, se genera una curva estándar con GDF-15 humano recombinante de R&D Systems (957-GD/CF). Los resultados con nuevos lotes o proteína GDF-15 recombinante se sometieron a ensayo en muestras de plasma estándares y cualquier desviación superior a 10% se corrigió mediante la introducción de un factor de ajuste para este ensayo. Las mediciones de GDF-15 en muestras de suero y plasma del mismo paciente rindieron resultados virtualmente idénticos tras la corrección para eventuales factores de dilución. El límite de detección del ensayo era 200 pg/ml.

Para la detección de IGFBP7 en muestras de suero o plasma humano, se utilizó un ELISA de tipo sándwich. Para la captura y detección del antígeno, se conjugaron alícuotas de un anticuerpo policlonal anti-IGFBP7 de R&D Systems (número de catálogo AF 1334) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

Las placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina se incubaron con 100  $\mu$ l de anticuerpo policlonal anti-IGFBP7 biotinilado durante 60 min a razón de 1 pg/ml en solución 1x de PBS. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%, se bloquearon con PBS + BSA al 1% (albúmina de suero bovino) y después se lavaron nuevamente tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%. A continuación, los pocillos se incubaron durante 1,5 h con una dilución en serie de IGFBP7 recombinante como antígeno estándar, o con muestras de suero o plasma diluidas (1:50) procedentes de pacientes o individuos de control, respectivamente. Tras la unión del IGFBP7, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%. Para la detección específica del IGFBP7 unido, los pocillos se incubaron con 100  $\mu$ l de anticuerpo policlonal anti-IGFBP7 digoxigenilado durante 60 min a una concentración de 1  $\mu$ g/ml en 1x PBS + BSA al 1%. Después, las placas se lavaron tres veces para eliminar el anticuerpo no unido. En una etapa siguiente, los pocillos se incubaron con 75 mU/ml de conjugados de anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 1633716) durante 60 min en 1x PBS + BSA al 1%. Las placas se lavaron posteriormente seis veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos de antígeno-anticuerpo, los pocillos se incubaron con 100  $\mu$ l de solución de ABTS (Roche Diagnostics

GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11685767) y se midió la densidad óptica (DO) tras 15 minutos a 405 nm y 492 nm con un lector de ELISA.

Se determinó Gal-3 mediante la utilización de BGM galectina-3 (BG medicine, Waltham, MA, USA). Cuantitativamente mide la galectina-3 en suero o EDTA-plasma mediante ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) en una plataforma de placa de microtitulación. El ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales contra la galectina-3. Una superficie de los pocillos en una placa de microtitulación se recubre con un anticuerpo monoclonal de rata anti-galectina-3 de ratón y sirve como anticuerpo de captura para unir las moléculas de galectina-3 en la muestra, mientras que el otro anticuerpo monoclonal de ratón anti-galectina-3 humana se proporciona en solución y funciona como anticuerpo trazador para detectar las moléculas de galectina-3 unidas al anticuerpo de captura.

Para la detección de mimecán en suero o plasma humano, se utilizó un ELISA de tipo sándwich. Para la captura y detección del antígeno, se conjugaron alícuotas de un anticuerpo policlonal anti-mimecán de R&D Systems (número de catálogo AF 2660) con biotina y digoxigenina, respectivamente. Las placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina se incubaron con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-mimecán biotinilado durante 60 min a razón de 0,2 µg/ml en solución 1x de PBS. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%, se bloquearon con PBS + BSA al 2% (albúmina de suero bovino) durante 45 min y después se lavaron nuevamente tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%. A continuación, los pocillos se incubaron durante 1 h con 100 µl de una dilución en serie de mimecán recombinante como antígeno estándar o con muestras de suero o plasma diluido (1:5 en 1x PBS + BSA al 1%) procedentes de pacientes o individuos de control, respectivamente. Tras la unión del mimecán, las placas se lavaron tres veces con 1x PBS + Tween-20 al 0,02%. Para la detección específica del mimecán unido, los pocillos se incubaron con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-mimecán digoxigenilado durante 45 min a una concentración de 0,2 µg/ml en 1x PBS + BSA al 1%. Después, las placas se lavaron tres veces para eliminar el anticuerpo no unido. En una etapa siguiente, los pocillos se incubaron con 100 µl de 75 mU/ml de conjugados de anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 1633716) durante 30 min en 1x PBS + BSA al 1%. Las placas seguidamente se lavaron seis veces con el mismo tampón de lavado que anteriormente. Para la detección de los complejos de antígeno-anticuerpo, los pocillos se incubaron con 100 µl de solución de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11685767) y se midió la densidad óptica (DO) tras 15 minutos a 405 nm y 492 nm con un lector de ELISA.

Para la medición de la endostatina en suero o plasma humano, se utilizó un ELISA de tipo sándwich disponible comercialmente (inmunoensayo de endostatina humana Quantikine, número de catálogo DNSTO, R&D Systems). Las mediciones se realizaron siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Se determinó sST2 mediante la utilización del ensayo de ST2 Presage™ de Critical Diagnostics (San Diego, CA, USA). El ensayo es un ELISA monoclonal de tipo sándwich cuantitativo en un formato de placa de 96 pocillos para la medición de ST2 en suero o plasma. Se cargó plasma diluido en pocillos apropiados en la placa recubierta con anticuerpo anti-ST2 y se incubó durante el tiempo prescrito. Tras una serie de etapas en que se lavaron los reactivos de la placa y se añadieron reactivos adicionales y posteriormente se eliminaron mediante lavado, el análisis se detectó finalmente mediante la adición de un reactivo colorimétrico y se midió la señal resultante espectroscópicamente a 450 nm.

Se determinó el biomarcador mimecán tal como se indica en el documento nº WO2011/12268.

Se sometió a ensayo sFlt1 utilizando un inmunoensayo ELECSYS que utiliza dos anticuerpos que son específicos para sFlt1. El ensayo puede llevarse a cabo automáticamente utilizando diferentes analizadores Roche, incluyendo ELECSYS 2010 y cobra e411 y cobra e601.

Se determinó el ácido úrico mediante la aplicación de un método colorimétrico enzimático. En la presente reacción, el peróxido reacciona en presencia de peroxidasa (POD), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina (TOOS) y 4-aminofenazona para formar un pigmento quinona-diimina. La intensidad del color rojo formado es proporcional a la concentración del ácido úrico y se determina fotométricamente.

Se midió la urea mediante un ensayo *in vitro* para la determinación cuantitativa de la urea/nitrógeno de la urea en suero, plasma y orina humanas en sistemas Roche/Hitachi cobas c. El ensayo puede llevarse a cabo automáticamente utilizando diferentes analizadores, incluyendo cobas c 311 y cobas c 501/502. El ensayo es un ensayo cinético con ureasa y glutamato deshidrogenasa. La urea es hidrolizada por la ureasa para formar amonio y carbonato. En la segunda reacción, el 2-oxoglutarato reacciona con el amonio en presencia de glutamato deshidrogenasa (GLDH) y el coenzima NADH para producir L-glutamato. En esta reacción, se oxidan 2 moles de NADH en NAD<sup>+</sup> por cada mol de urea hidrolizada. La tasa de reducción de la concentración de NADH es directamente proporcional a la concentración de la urea en el espécimen y se mide fotométricamente.

Se midió la creatinina en muestras de plasma mediante un método de Jaffe con modificación cinética y compensado, adaptado para los autoanalizadores de Roche/Hitachi (ver también Foster-Swanson et al., Reference Interval Studies of the Rate-Blanked Creatinine/Jaffé Method on BM/Hitachi Systems in Six U. S. Laboratories, Clin Chem 1994; resumen nº 361). El ensayo se basa en un ensayo *in vitro* cinético utilizando una modificación cinética y compensación para la determinación cuantitativa de la creatinina en suero, plasma y orina humanas. Se añadió hidróxido sódico y

ácido pícrico a la muestra para iniciar la formación de complejo de creatinina-ácido pícrico. En solución alcalina, la creatinina forma un complejo amarillo-naranja con picrato. La intensidad del color, que es directamente proporcional a la concentración de creatinina, se midió fotométricamente.

5 Se midió la D-glucosa en muestras de plasma utilizando un ensayo enzimático de Roche/R-Biopharm (ver también Schmidt, Die enzymatische Bestimmung von Glucose and Fructose nebeneinander, Klinische Wochenschrift, 1961, 39, 1244-1247. El marcador se fosforiló a D-glucosa-6-fosfato en presencia del enzima hexoquinasa (HK) y adenosín-5'-trifosfato (ATP) con la formación simultánea de adenosín-5'-difosfato (ADP). En presencia del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la D-glucosa-6-fosfato es oxidada por NADP a D-gluconato fosfato con formación de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). La cantidad de NADPH formada en dicha reacción es estequiométrica respecto a la cantidad de D-glucosa. Se midió el NADPH a partir de la absorbancia de la luz.

15 Se midió el sodio plasmático mediante electrodos selectivos para iones utilizando especímenes de plasma mediante la aplicación de un electrodo selectivo de iones (ESI) que utiliza las propiedades únicas de determinados materiales de membrana para desarrollar un potencial eléctrico (fuerza electromotriz, FEM) para las mediciones de iones en solución (COBAS Integra 400; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, ensayo: "ISE indirect Na-K-Cl for Gen.2").

20 Se midió la hemoglobina (Hb) utilizando el ensayo de hemoglobina Reflotron®. El ensayo se basa en la oxidación de la hemoglobina a metemoglobina por hexacianoferrato (III) de potasio (Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>). El nivel de hemoglobina es proporcional a la intensidad del color y se midió a una longitud de onda de 567 nm a 37°C,

25 Se midió la HbA1c (hemoglobina glicada, glicohemoglobina) mediante la utilización de un ensayo *in vitro* Roche que permite la determinación cuantitativa de HbA1c en los sistemas Roche/Hitachi cobas c (ensayo: "Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.3", Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

30 Se midió la prealbúmina mediante la utilización de un ensayo *in vitro* de Roche que permite la determinación cuantitativa de la prealbúmina en muestras humanas en sistemas Roche/Hitachi cobas c (ACN 710, ACN 8710). El ensayo es un ensayo inmunoturbidimétrico. La prealbúmina humana forma un precipitado con un antisuero específico que se determina turbidimétricamente.

35 Se midió la cistatina C mediante la utilización de un ensayo inmunoturbidimétrico para la determinación *in vitro* cuantitativa de la cistatina C en suero y plasma humanos en analizadores de química clínica automatizados de Roche (Ensayo: Tina-quant Cystatin C, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). En este ensayo, la cistatina C humana se aglutina con partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-cistatina C. El agregado se determina turbidimétricamente a 546 nm.

Conclusiones:

40 La combinación de NT-proPNC o PNC con otros marcadores y parámetros clínicos puede utilizarse con fines de monitorización y como guía para la terapia además del estándar de cuidado actual para ajustar y titular la terapia en pacientes de IC (IC crónica o aguda después de la estabilización), preferentemente en aquellos pacientes en los que la IC se debe a una función sistólica deteriorada. Estos marcadores y parámetros preferentemente son creatinina, eGFR (calculada a partir de los niveles de creatinina), NUS, glucosa, HbA1c, hsCRP, cistatina C, IL-6, prealbúmina, sFLT-1, ácido úrico, GFD-15, sS2, galectina-3, endostatina, mímecán, IGFBP-7, osteopontina, sodio, hemoglobina y hematócrito, así como la tasa cardíaca y la duración de QRS. Específicamente, la adición de estas mediciones a NT-proPNC o PNC, junto con el estándar de cuidado actual pueden estratificar adicionalmente según riesgos los pacientes de IC ya guiados por NT-proPNC pero que pueden requerir una terapia más intensificada y una observación más minuciosa. De esta manera, la presente invención optimiza la guía a la terapia de la insuficiencia cardíaca más allá de NT-proPNC mediante la consideración de combinaciones de péptidos natriuréticos con otros marcadores y/o parámetros clínicos.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para identificar un paciente que es elegible para una intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5
- (a) medir el nivel de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematócrito en una muestra de un paciente que presenta insuficiencia cardíaca y que recibe terapia para insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC,
  - 10 (b) comparar el nivel (o niveles) del marcador (o marcadores) medidos en (a) con un nivel de referencia (o niveles de referencia) y
  - (c) identificar un paciente que es elegible para una intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca o no.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que el paciente muestra un nivel de un péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC, siendo indicativo de intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que:
- i) el marcador o marcadores se seleccionan del grupo que consiste en creatinina, urea, glucosa y HbA1c (hemoglobina glicada), y en el que un nivel (o niveles) de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia (niveles de referencia) para dicho marcador (marcadores) indica que el paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, y/o en el que un nivel (o niveles) de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia (niveles de referencia) para dicho marcador (marcadores) indica que el paciente no es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, y/o
  - 25 ii) el marcador o marcadores se seleccionan del grupo que consiste en sodio, hemoglobina y hematócrito, y en el que un nivel (o niveles) de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia (niveles de referencia) para dicho marcador (marcadores) indica que el paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, y/o en el que un nivel (niveles) de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia (niveles de referencia) para dicho marcador (marcadores) indica que el paciente no es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.
- 30
- 35 4. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de medir el nivel de un péptido de tipo PNC en una muestra del paciente y comparar el nivel del péptido de tipo PNC con un nivel de referencia (o niveles de referencia).
- 40 5. Método según la reivindicación 4, en el que:
- i) el marcador o marcadores se seleccionan del grupo que consiste en creatinina, urea, glucosa y HbA1c (hemoglobina glicada), y en el que:
  - 45 (a) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es superior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca;
  - 50 (b) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca;
  - (c) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es superior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca; y/o
  - 55 (d) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente no es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca, y/o
  - 60
  - ii) el marcador o marcadores se seleccionan de entre el grupo que consiste en sodio, hemoglobina y hematócrito, y en el que
  - 65 (a) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es superior al nivel de referencia para dicho

- péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca;
- (b) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es inferior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca;
- (c) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es superior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca; y/o
- (d) un nivel de por lo menos un marcador en la muestra del paciente que es superior al nivel de referencia para dicho marcador, y un nivel de péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC es indicativo de que un paciente no es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.
6. Método para optimizar la terapia de la insuficiencia cardiaca guiada por péptido de tipo PNC, comprendiendo dicho método las etapas de:
- (a) medir el nivel de por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematócrito en una muestra de un paciente que presenta insuficiencia cardíaca y que recibe terapia para insuficiencia cardiaca guiada por péptido de tipo PNC,
- (b) comparar el nivel (o niveles) del marcador (o marcadores) medidos en (a) con un nivel de referencia (o niveles de referencia) y
- (c) optimizar la terapia de la insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el paciente muestra un nivel de un péptido de tipo PNC que es inferior al nivel de referencia para dicho péptido de tipo PNC, siendo indicativo de intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el paciente presenta insuficiencia cardíaca clasificada como en estadio B o C según la clasificación de ACC/AHA, y/o en el que el paciente presenta insuficiencia cardíaca de clase II o III según la clasificación de NYHA.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra es una muestra de sangre, suero o plasma y/o en el que el paciente es un ser humano.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la terapia de la insuficiencia cardíaca es terapia de la insuficiencia cardíaca medicinal, en particular en el que la terapia de la insuficiencia cardíaca comprende la administración de por lo menos un medicamento seleccionado del grupo que consiste en diuréticos, inhibidores del enzima conversor de la angiotensina, bloqueantes de receptor de la angiotensina II, beta-bloqueantes y antagonistas de aldosterona.
11. Método según la reivindicación 10, en el que la terapia de la insuficiencia cardíaca comprende la administración combinada de un beta-bloqueante y un inhibidor de la ACE.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca comprende incrementar la dosis de medicamentos anteriormente administrados, la administración de un medicamento (o medicamentos) adicional, en particular la administración de un medicamento (o medicamentos) adicional con un modo de acción diferente de los medicamentos administrados anteriormente, terapia con dispositivos, cambios en el estilo de vida y combinaciones de los mismos.
13. Utilización de i) por lo menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematócrito y/o ii) utilización de por lo menos un agente de detección de un marcador seleccionado del grupo de marcadores que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematócrito en una muestra de un paciente que presenta insuficiencia cardíaca y que está recibiendo terapia para insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC, para la identificación de un paciente que es elegible para la intensificación de la terapia de la insuficiencia cardíaca o para la optimización de la terapia de la insuficiencia cardíaca guiada por péptido de tipo PNC.
14. Utilización según la reivindicación 13, en la que i) el marcador o marcadores seleccionados del grupo que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina glicada), hemoglobina y hematócrito se utiliza en combinación con un péptido de tipo PNC y/o ii) el agente o agentes de detección para un marcador seleccionado del grupo de marcadores que consiste en creatinina, urea, sodio, glucosa, HbA1c (hemoglobina

glicada), hemoglobina y hematócrito, se utiliza en combinación con un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo PNC.