

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 531**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2014 PCT/EP2014/070962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15049243**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2014 E 14777609 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3052941**

54 Título: **Método para predecir el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave**

30 Prioridad:

**01.10.2013 EP 13186938**

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

**15.11.2019**

73 Titular/es:

**SPHINGOTEC GMBH (100.0%)  
Neuendorfstrasse 15a  
16761 Hennigsdorf, DE**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS y  
NG, LEONG**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 731 531 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

Método para predecir el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave.

5 El objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o de muerte en un sujeto que ha sufrido un infarto de miocardio agudo, que comprende:

- determinar el nivel de protaquinina según SEC ID nº 1, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10, SEQ ID nº 11 o fragmentos de la misma o péptidos que comprenden protaquinina en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto, y

10 correlacionar dicho nivel de protaquinina o fragmentos de la misma o péptidos que comprenden protaquinina con el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o muerte, en el que un nivel elevado es predictivo de un riesgo incrementado de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o muerte,

15 en el que se seleccionan fragmentos de protaquinina de entre el grupo que comprende la SEC ID nº 2, SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13, y en el que dicho líquido corporal se selecciona de entre el grupo que comprende sangre, suero y plasma.

20 La expresión "nivel elevado" se refiere a un nivel superior a un nivel umbral determinado.

25 La sustancia P (SP) es un neuropéptido: un undecapéptido que funciona como neurotransmisor y como neuromodulador. Perteneciente a la familia del neuropéptido taquiquinina. La sustancia P y su neuropéptido estrechamente relacionado neuroquinina A (NKA) se producen a partir de un precursor poliproteína después del procesamiento diferencial del gen pre-protaquinina A. En el SNC, la sustancia P participa en el sistema de transmisión del dolor.

30 La SP desempeña un papel en la nocicepción, inflamación, extravasación plasmática, agregación de plaquetas y leucocitos en vénulas postcapilares y en la migración quimiotáctica de leucocitos a través de las paredes de los vasos (Otsuka M., Yoshioka K., Neurotransmitter functions in mammalian tachykinins, *Physiol Rev.* 73(2):229-308, abril de 1993).

35 Los receptores de neuroquinina (NK) se encuentran presentes principalmente en vasos coronarios y ganglios intracardiacos y no sobre el miocardio ventricular o auricular (Hoover DB, Chang Y, Hancock JC, Zhang L. *Actions of tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease.* *Jpn J. Pharmacol.* 84(4):367-73, dic. de 2000). Una acción directa del receptor de NK1 en las arterias coronarias puede causar la vasodilatación mediada por NO (Otsuka M., Yoshioka K., Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins, *Physiol Rev.* 73(2):229-308, abril de 1993), aunque este efecto puede resultar disminuido en pacientes con enfermedad arterial coronaria (Bossaller C., Habib G.B., Yamamoto H., Williams C., Wells S., Henry P.D., Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta, *J. Clin. Invest.* 79(1):170-4, enero de 1987), llevando a una vasoconstricción dominante mediada por NK2. La SP y la neuroquinina A son negativamente inotrópicas y cronotrópicas, actuando a través de neuronas colinérgicas Hoover DB, Chang Y, Hancock JC, Zhang L., *Actions of tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease.* *Jpn J. Pharmacol.* 84(4):367-73, dic. de 2000). En contraste, los antagonistas de NK1 mejoran la inotropía y lusitropía en modelos de infarto de miocardio (AMI) en ratas, mientras que la SP atenúa el efecto inotrópico positivo de la norepinefrina (Wang LL, Guo Z, Han Y, Wang PF, Zhang RL, Zhao YL, Zhao FP, Zhao XY, Implication of Substance P in myocardial contractile function during ischemia in rats, *Regul Pept.* 167(2-3):185-91, 11 de abril de 2011). La SP (mediante el receptor de NK1) se ha implicado en el aturdimiento miocárdico post-AMI en cobayas (Chiao H., Caldwell R.W., The role of substance P in myocardial dysfunction during ischemia and reperfusion, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 353(4):400-7, marzo de 1996).

55 Sin embargo, algunos efectos de la SP potencialmente pueden ser beneficiosos en el AMI. Se ha implicado la SP en isquemia postcondicionamiento (Ren J.Y., Song J.X., Lu M.Y., Chen H., *Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in isolated perfused heart from diabetic rats: Involvement of transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide and substance P.* *Regul Pept.* 169(1-3):49-57, 8 de agosto de 2011), y antagonistas de NK1 pueden conducir a una tendencia a un tamaño incrementado de AMI en modelos animales (Zhang RL, Guo Z, Wang LL, Wu J. Degeneration of capsaicin sensitive sensory nerves enhances myocardial injury in acute myocardial infarction in rats, *Int. J. Cardiol.* 160(1):41-7, 20 de septiembre de 2012). La percepción nociceptiva durante la isquemia puede conducir a la movilización de células progenitoras de médula ósea que expresan receptor de NK1 que pueden desempeñar un papel en la angiogénesis en la zona isquémica (Amadesi S., Reni C., Katare R., Meloni M., Oikawa A., Beltrami A.P., Avolio E., Cesselli D., Fortunato O., Spinetti G., Ascione R., Cangiano E., Valgimigli M., Hunt S.P., Emanuelli C., Madeddu P., Role for substance p-based nociceptive signaling in progenitor cell activation and angiogenesis during ischemia in mice and in human subjects, *Circulation* 125 (14):1774-86, S1-19, 10 de abril de 2012).

Se ha observado SP miocárdico (Morrey C., Brazin J., Seyedi N., Corti F., Silver R.B., Levi R., Interaction between sensory C-fibers and cardiac mast cells in ischemia/reperfusion: activation of a local renin-angiotensin system culminating in severe arrhythmic dysfunction, 1. J. Pharmacol. Exp. Ther. 335(1):76-84, octubre de 2010) y pulmonar (Guo Z., Wang X.P., Wang J.P., Zhou R.H., Wang L.L., Wu J., Up-regulation of substance P in the lungs during acute myocardial ischemia and infarction in rats. Regul Pept. 160(1-3):160-7, 25 de febrero de 2010) Incrementado en modelos animales de AMI, sugiriendo un papel en el AMI.

Se ha mostrado que la sustancia P, mediante la estimulación del NK-1 R, presenta la capacidad de reducir la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  de tenocitos humanos, Br. J. Sports Med., doi: 10.1136/bjsports-2013-092438.

Las investigaciones se han visto dificultadas por la semivida muy corta de la SP (12 min) (Conlon, J.M., Sheehan, L., Conversion of substance P to C-terminal fragments in human plasma. Regul. Pept. 7:335-345, 1983). El desarrollo reciente de un ensayo para PTA estable (prosubstancia P N-terminal, anteriormente denominada también protaquicínina A N-terminal, o NT-PTA) que es un sustituto de SP lábil (Ernst, A., Suhr, J., Kohrle, J., Bergmann, A., Detection of stable N-terminal protachykinin A immunoreactivity in human plasma and cerebrospinal fluid, Peptides 29:1201-1206, 2008), ha permitido estudios sobre el papel de este sistema de taquiquinina en enfermedades humanas. El fragmento de protaquicínina PTA 1-37 puede ser un marcador de sustitución de la sustancia P.

El documento WO 2010/128071 describe la estratificación de un sujeto con enfermedad aguda o crónica, tal como pacientes postinfarto de miocardio, en respondedores y no respondedores a medicación, tal como inhibidores de ACE, diuréticos y beta-bloqueantes y aquellos con un efecto adverso durante la medicación. Como biomarcadores se utilizan hormonas vasoactivas que afectan o están correlacionadas con la función/disfunción endotelial. A niveles bajos de hormonas vasoactivas, la administración de la medicación (excepto fármacos trombolíticos en el caso de que la hormona sea proANP) presenta un efecto desfavorable sobre pacientes que han sufrido un infarto de miocardio, mientras que, a niveles más altos, la administración de fármacos presenta un efecto positivo sobre pacientes que han sufrido un infarto de miocardio. Lo anterior implica, según el documento WO 2010/128071, que niveles más bajos de biomarcador (con la excepción de proANP) indican un riesgo más elevado para el paciente, ya que la administración de la medicación (excepto fármacos trombolíticos en el caso de que la hormona sea proANP) presenta un efecto desfavorable sobre pacientes que han sufrido un infarto de miocardio. Y además, según el documento WO 2010/128071, niveles más elevados de biomarcador (con la excepción de proANP) indican un riesgo más bajo para el paciente, ya que la administración de la medicación (excepto fármacos trombolíticos en el caso de que la hormona sea proANP) presenta un efecto positivo sobre pacientes que han sufrido un infarto de miocardio.

El tratamiento y gestión eficientes de los pacientes que sufren de enfermedades cardiológicas requiere un sistema de estratificación de los riesgos. Se han descrito herramientas (NTproBNP, puntuaciones de riesgo), aunque son imperfectas. De esta manera, existe una necesidad de herramientas alternativas o adicionales para mejorar las técnicas actuales de estratificación de los riesgos.

El objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o la muerte en un sujeto que ha sufrido un infarto de miocardio agudo (AMI), que comprende:

- determinar el nivel de protaquicínina según SEC ID nº 1, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11 o fragmentos de la misma en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto, y
- correlacionar dicho nivel de protaquicínina SEC ID nº 1, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11 o fragmentos de la misma con el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o la muerte, en el que un nivel elevado es predictivo de un riesgo incrementado de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o la muerte.

en el que se seleccionan fragmentos de protaquicínina de entre el grupo que comprende la SEC ID nº 2, SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13, y

en el que dicho líquido corporal se selecciona de entre el grupo que comprende sangre, suero y plasma.

En una forma de realización preferida, el objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o la muerte en un sujeto que ha sufrido un infarto de miocardio agudo, que comprende:

- determinar el nivel de protaquicínina o fragmentos de la misma o péptidos que comprenden protaquicínina en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto, en el que se utiliza por lo menos un ligante que se une a PTA 1-37, SEC ID nº 2, EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIA y en el que dicho ligante presenta una afinidad para PTA 1-37 de por lo menos  $10^7$  M<sup>-1</sup>, y

- correlacionar dicho nivel de protaquicinina o fragmentos de la misma o péptidos que comprenden protaquicinina con el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o de muerte, en el que un nivel elevado es predictivo de un riesgo incrementado de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o la muerte.
- De esta manera, la determinación de un nivel más elevado de protaquicinina o fragmentos de la misma o de péptidos que comprenden protaquicinina o un nivel más elevado de fragmentos, en el que se utiliza por lo menos un ligante que se une a PTA 1-37, SEC ID nº 2, indica un riesgo más elevado de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o la muerte.

En una forma de realización específica, dicha predicción según la presente invención no es la predicción de si dicho sujeto muestra un efecto no favorable que está causado por una medicación o si dicho sujeto es un respondedor o no respondedor a la medicación. En una forma de realización específica, la predicción según la presente invención no es la predicción de si dicho sujeto muestra un efecto no favorable que está causado por un fármaco trombolítico o de si dicho sujeto es un respondedor o no respondedor a un fármaco trombolítico.

De esta manera, el objeto de la invención incluye en una forma de realización específica, la estratificación de sujetos en respondedores a una medicación, no respondedores a una medicación y sujetos que muestran un efecto no favorable después de haber recibido dicha medicación. En una forma de realización particular, dicha medicación es un fármaco trombolítico. El método de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o la muerte en un sujeto que ha sufrido un infarto de miocardio agudo (AMI) según la presente invención es independiente de la medicación en una forma de realización de la invención, en particular es independiente de efectos de los fármacos trombolíticos.

La predicción de riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o la muerte no es la misma que el diagnóstico de una enfermedad, afección o episodio. Predicción de riesgo se refiere a que el biomarcador predice o determina un riesgo de experimentar un episodio o afección que se producirá en el futuro y que no se encuentra presente en el momento de la medición y predicción, en el que el diagnóstico se refiere a la determinación de un episodio presente o afección presente que se ha producido. Existen muchos biomarcadores que pueden resultar adecuados como marcador diagnóstico pero que no presentan ningún poder predictivo, ya que cambian únicamente si se ha producido el episodio. Existen también muchos marcadores predictivos que no presentan ningún poder diagnóstico. En cualquier caso, no es predecible si una biomolécula puede mostrar algún poder diagnóstico o predictivo.

En una forma de realización específica de la invención, dicho episodio cardiaco adverso grave es un episodio cardiaco adverso grave agudo seleccionado de entre el grupo que comprende infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca aguda y muerte. En una forma de realización específica, se predice el riesgo de experimentar dicho episodio adverso agudo en los 6 meses o 2 años siguientes. En una forma de realización específica, dicho AMI se ha producido en las 24 horas anteriores a la obtención de la muestra de líquido corporal de dicho paciente. En una forma de realización específica, dicho AMI se ha producido en la semana anterior a la obtención de la muestra de líquido corporal de dicho paciente. En una forma de realización específica, dicho AMI se ha producido en el mes anterior a la obtención de la muestra de líquido corporal de dicho paciente. En una forma de realización específica, dicho AMI se ha producido en los 2 meses anteriores a la obtención de la muestra de líquido corporal de dicho paciente.

En una forma de realización específica, el sujeto no presenta insuficiencia cardíaca en el momento de obtención del líquido corporal y/o en el tiempo de determinación del nivel de protaquicinina, de fragmentos de la misma o de péptidos que comprenden protaquicinina en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto.

El criterio de valoración compuesto primario según la presente invención son los episodios cardiacos adversos graves (MACE), incluyendo la mortalidad por todas las causas, la hospitalización por insuficiencia cardíaca (IC) o AMI recurrente (re-AMI), que se evaluaron dentro de los 2 años. Lo anterior implica que, en una forma de realización, los episodios cardiacos adversos graves se seleccionan de entre el grupo que comprende mortalidad por todas las causas, hospitalización por insuficiencia cardíaca (IC) o AMI recurrente (re-AMI). En una forma de realización específica, los episodios cardiacos adversos graves se seleccionan de entre el grupo que comprende mortalidad por todas las causas, hospitalización por insuficiencia cardíaca (IC) o AMI recurrente (re-AMI) dentro de los 2 años.

La hospitalización por IC se define como una readmisión hospitalaria para la que la IC era el motivo principal que requería tratamiento con una dosis elevada de diuréticos, inótrópos o nitrato intravenoso. Se diagnosticó el AMI recurrente utilizando la definición universal (Thygesen K., Alpert J.S., White H.D.; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. Circulation 116:2634-53, 2007). Los criterios de evaluación secundaria eran compuestos de muerte y/o re-AMI y muerte y/o readmisión por IC y re-AMI individualmente. El criterio de evaluación de muerte y/o re-AMI a los 6 meses se utilizó

- 5 en análisis que implicaban la puntuación GRACE, ya que este punto temporal se utilizó en el desarrollo de la puntuación de riesgo. Se obtuvieron los criterios de evaluación mediante la revisión de las bases de datos hospitalarias locales, de la Office of National Statistics Registry y de las llamadas telefónicas a los pacientes. Lo anterior significa que, en una forma de realización, los episodios cardiacos adversos graves se seleccionan de entre el grupo que comprende compuestos de muerte y/o re-AMI y muerte y/o readmisión por IC y re-AMI individualmente. En una forma de realización específica, los episodios cardiacos adversos graves se seleccionan de entre el grupo que comprenden compuestos de muerte y/o re-AMI y muerte y/o readmisión por IC y re-AMI individualmente dentro de los seis meses.
- 10 En una forma de realización específica, los episodios cardiacos adversos graves son muerte y/o re-AMI. En una forma de realización específica, los episodios cardiacos adversos graves son muerte y/o re-AMI a los 6 meses.
- 15 La protaquicinina y fragmentos de la misma o péptidos que comprenden protaquicinina pueden utilizarse como un marcador de sustitución de sustancia P liberada y/o de neuroquinina liberada, ya que la sustancia P/neuroquinina y la protaquicinina y fragmentos de la misma o los péptidos que comprenden protaquicinina resultan liberados en cantidades equimolares respecto a la protaquicinina. En una forma de realización, se determina el nivel de protaquicinina y fragmentos de la misma o péptidos que comprenden protaquicinina excluyendo sustancia P o neuroquinina. En otra forma de realización, se determina el nivel de sustancia P o de neuroquinina. El nivel de un determinado péptido o fragmento de péptido puede determinarse mediante cualquier método analítico disponible, por ejemplo mediante la utilización de por lo menos un ligante que se une a dicha protaquicinina y fragmentos de la misma o péptidos que comprenden protaquicinina. Dicho ligante puede ser un anticuerpo. Dicho nivel puede determinarse mediante, por ejemplo, espectroscopia de masas.
- 20 En una forma de realización de los métodos anteriores, un nivel incrementado de protaquicinina, de sus variantes de procesamiento o de fragmentos de la misma es un nivel superior a un umbral en el que dicho umbral es de (aproximadamente) 100 pmoles/l o superior a 100 pmoles/l, preferentemente de (aproximadamente) 80 pmoles/l o superior a 80 pmoles/l, preferentemente de (aproximadamente) 70 pmoles/l o superior a 70 pmoles/l.
- 25 Los umbrales deben considerarse a partir del método de calibración utilizado y los valores anteriores deben considerarse a partir de los ensayos y métodos de calibración utilizados en los presentes ejemplos 1, 2 y 3. Con el método de calibración utilizado en la presente invención según el ejemplo 1, se ha determinado que el nivel de la mediana de protaquicinina en sujetos sanos es de 53 pmoles/l.
- 30 En una forma de realización de la invención, dicho episodio cardiaco adverso grave es un episodio cardiaco adverso grave agudo seleccionado de entre el grupo que comprende infarto de miocardio, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca aguda y muerte.
- 35 En una forma de realización de la invención, dicha muestra de líquido corporal de dicho sujeto se ha obtenido dentro de un marco temporal determinado después de producirse el AMI, siendo este marco temporal de 2 meses, más preferentemente de 1 mes, más preferentemente de 1 semana, todavía más preferentemente dentro de las 24 horas.
- 40 En una forma de realización de la invención, dicho nivel elevado es predictivo de un riesgo incrementado de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o muerte dentro de los 6 meses siguientes o dentro de los 2 años siguientes.
- 45 A lo largo de la presente memoria, el término protaquicinina y protaquicinina (PTA) se utilizan como sinónimos. El término incluye todas las variantes de procesamiento de la protaquicinina A, es decir,  $\alpha$ PTA,  $\beta$ PTA,  $\gamma$ PTA y  $\delta$ PTA.
- 50 La expresión “determinar el nivel de protaquicinina, sus variantes de procesamiento o fragmentos de la misma” se refiere a que se determina habitualmente la inmunorreactividad con una región dentro de las moléculas anteriormente indicadas. Lo anterior significa que no resulta necesario medir selectivamente un determinado fragmento. Se entiende que un ligante que se utiliza para la determinación del nivel de protaquicinina o de fragmentos de la misma se une a un fragmento que comprende la región de unión de dicho ligante, en el que se seleccionan los fragmentos de protaquicinina de entre el grupo que comprende SEC ID nº 2, SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13. Dicho ligante puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o un andamiaje no IgG.
- 55 Lo anterior significa a lo largo de la presente memoria y las reivindicaciones, que la expresión “determinar el nivel de protaquicinina o de fragmentos de la misma, o de péptidos que comprenden protaquicinina” es equivalente a “determinar la inmunorreactividad con una región dentro de las moléculas anteriormente indicadas” y es equivalente a “determinar el nivel de un ligante, por ejemplo, un anticuerpo que se une a una región que está comprendida en la protaquicinina o fragmentos de la misma, o péptidos que comprenden protaquicinina”.
- 60 El término “sujeto” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un organismo humano o no humano vivo. Preferentemente en la presente memoria, el sujeto es un sujeto humano.
- 65

La correlación entre el nivel de protaquicínina o péptidos que comprenden protaquicínina en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto y el riesgo de experimentar un episodio cardíaco adverso grave es continuo, es decir, a mayor nivel, mayor riesgo. Lo anterior puede observarse a partir de los datos en, por ejemplo, la tabla 2. En comparación con el primer cuartil, los segundo, tercer y cuarto cuartiles muestran riesgos más elevados, respectivamente.

En aras de la practicabilidad, el experto en la materia puede utilizar uno o más umbrales.

De esta manera, la expresión "nivel elevado" puede significar un nivel superior a un nivel umbral.

Un líquido corporal puede seleccionarse de entre el grupo que comprende sangre, suero y plasma.

En una forma de realización específica, dicha enfermedad cardiovascular en el momento en que se obtiene la muestra de líquido corporal de dicho sujeto es el infarto de miocardio agudo (AMI). En una forma de realización específica, dicho AMI es un IMEST (infarto de miocardio con elevación del segmento ST) o un IMSEST (infarto de miocardio sin elevación del segmento ST). En una forma de realización de la invención, dicho sujeto presenta un AMI, en el que, en una forma de realización, dicho paciente presentaba un nivel de troponina cardíaca superior al percentil 99 con por lo menos uno de los siguientes: dolor torácico durante >20 minutos o cambios electrocardiográficos en serie diagnósticos que consisten en nuevas ondas Q patológicas o cambios de segmento ST y onda T.

En otra forma de realización específica de la invención, la predicción de un episodio adverso en un sujeto o la identificación de un sujeto con un riesgo incrementado de experimentar otro episodio adverso tras haber experimentado un AMI se mejora mediante la determinación y utilización adicional del nivel de por lo menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que comprende: troponina I, troponina T, CRP, LpLA2, cistatina C y péptidos natriuréticos de tipo A y B, así como sus precursores y fragmentos de los mismos, incluyendo ANP, proANP, NT-proANP, MR-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP triglicéridos, colesterol-HDL o subfracciones de los mismos, LDL-colesterol o subfracciones del mismo, GDF15, ST2, copeptina y cualquier puntuación, tal como, por ejemplo, las puntuaciones de riesgo PURSUIT, TIMI, GRACE y FRISC (B.E. Backus, A.J. Six, J.H. Kelder, W.B. Gibler, F.L. Moll, y P.A. Doevendans, Risk Scores for Patients with Chest Pain: Evaluation in the Emergency Department, Curr. Cardiol. Rev. 7(1):2-8, febrero de 2011).

En una forma de realización muy específica del método según la invención, además del nivel de protaquicínina o fragmentos de la misma, en la que se seleccionan fragmentos de protaquicínina de entre el grupo que comprende SEC ID nº 2, SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13, o péptidos que comprenden protaquicínina, se determina y se utiliza el nivel del marcador siguiente: proBNP o fragmentos o precursores del mismo con por lo menos 12 aminoácidos y/o CRP.

En otra forma de realización específica de la invención se determina adicionalmente por lo menos un parámetro clínico seleccionado de entre el grupo que comprende: edad, presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, tratamiento antihipertensor, índice de masa corporal, presencia de diabetes mellitus y tabaquismo actual.

La protaquicínina puede presentar la secuencia o secuencias siguientes:

SEC ID nº 1 (pro-traquicínina A (1-107)).

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARRPKPQQFFGLMGKRDADSSI

EKQVALLKALYGHGQISHKRHKTDSEVGLMGKRALNSVAYERSAMQNYERRR

Los fragmentos de protaquicínina que pueden determinarse en un líquido corporal pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo de los fragmentos siguientes:

SEC ID nº 2 (protraquicínina 1-37, P37)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIA

SEC ID nº 3 (sustancia P), que no forma parte de la invención, RPKPQQFFGLM(-NH<sub>2</sub>)

SEC ID nº 4 (neuropéptido K), que no forma parte de la invención, DADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHKTDSEVGLM (-NH<sub>2</sub>)

SEC ID nº 5 (neuropéptido gamma), que no forma parte de la invención, GHGQISHKRHKTDSEVGLM (-NH<sub>2</sub>)

SEC ID nº 6 (neuroquinina 1), que no forma parte de la invención,  
HKTDSFVGLM(-NH2)

5 SEC ID nº 7 (péptido flanqueante C-terminal, PTA 1 92-107), que no forma parte de la invención,  
ALNSVAYERSAMQNYE

SEC ID nº 8 (PTA isoforma alfa)

10 EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARRPKPQQFFGLMGKRDADSSI  
EKQVALLKALYGHGQISHKMAYERSAMQNYERRR

SEC ID nº 9 (PTA Isoforma beta)

15 EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARRPKPQQFFGLMGKRDADSSI  
EKQVALLKALYGHGQISHKRHKTDSFVGLMGKRALNSVAYERSAMQNYERRR

SEC ID nº 10 (PTA Isoforma delta)

20 EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARRPKPQQFFGLMGKRDAGHG  
QISHKMAYERSAMQNYERRR

SEC ID nº 11 (PTA Isoforma gamma)

25 EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARRPKPQQFFGLMGKRDAGHG  
QISHKRHKTDSFVGLMGKRALNSVAYERSAMQNYERRRSEQ

SEC ID nº 12 (PTA3-22)  
GANDDLNYWSDWYDSDQIK

25 SEC ID nº 13 (PTA 21-36)  
IKEELPEPFEHLLQRI

30 La determinación del nivel de PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de la misma puede significar que se determina la inmunorreactividad con PTA o fragmentos de la misma, en la que se seleccionan fragmentos de protaquicinina de entre el grupo que comprende SEC ID nº 2, SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13. Un ligante utilizado para la determinación de PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de la misma dependiendo de la región de unión puede utilizarse a más de una de las moléculas anteriormente mostradas. Lo anterior resulta evidente para el experto en la materia.

35 En una forma de realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de P37 (PTA 1-37, SEC ID nº 2, EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIA). En una forma de realización todavía más específica según la presente invención se utilizan por lo menos uno o dos ligantes que se unen a PTA 1-37, SEC ID nº 2, EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIA; en el caso de más de un ligante se unen preferentemente a dos regiones diferentes dentro de PTA 1-37, SEC ID nº 2, EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIA. Dicho ligante o ligantes puede ser preferentemente un anticuerpo o un fragmento de unión al mismo.

45 En una forma de realización todavía más específica, se utiliza uno o más ligantes para la determinación de PTA, sus variantes y fragmentos que se unen a uno o ambos, respectivamente, de las regiones siguientes dentro de PTA 1-37:

GANDDLNYWSDWYDSDQIK	PTA 3-22 (SEC ID nº 12)
IKEELPEPFEHLLQRI	PTA 21-36 (SEC ID nº 13)

50 En una forma de realización específica, el nivel de PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de la misma se miden con un inmunoensayo utilizando anticuerpo o fragmentos de anticuerpo que se unen a PTA, a sus variantes de procesamiento o a fragmentos de los mismos. Un inmunoensayo que puede resultar útil para determinar el nivel de PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de la misma puede comprender las etapas descritas de manera general en el ejemplo 1. Todos los umbrales y valores deben considerarse en correlación al ensayo y la calibración utilizada según el ejemplo 1. El experto en la materia conocerá que el valor absoluto de un umbral puede resultar influido por la calibración utilizada. Lo anterior significa que todos los valores y umbrales proporcionados en la presente memoria deben entenderse en el contexto de la calibración utilizada en

la presente memoria (Ejemplo 1).

En una forma de realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de protaquicnina.

5 Según la invención, el ligante diagnóstico de PTA o los demás biomarcadores adicionales se seleccionan de entre el grupo que consiste en anticuerpos, por ejemplo, IgG, una inmunoglobulina de longitud completa típica, o fragmentos de anticuerpo que contienen por lo menos el dominio variable F de cadena pesada y/o ligera, tal como, por ejemplo, anticuerpos acoplados químicamente (fragmento de unión a antígeno), incluyendo, aunque sin limitación, fragmentos Fab, incluyendo minicuerpos Fab, anticuerpos Fab de cadena sencilla, anticuerpos Fab monovalente con etiquetas epítopo, por ejemplo, Fab-V5Sx2; Fab bivalente (minianticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab multivalente, por ejemplo, formado mediante multimerización con ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo, mediante dimerización de dominios dHLX, por ejemplo, Fab-dHLX-FSx2, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos scFv, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® (acoplador biespecífico de células T), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo, de una clase diferente de G; anticuerpos de dominio único, por ejemplo, nanocuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélido o de pez. En una forma de realización específica, el nivel de PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de los mismos o los otros biomarcadores adicionales se mide con un ensayo utilizando ligantes seleccionados de entre el grupo que comprende aptámeros, andamiajes no Ig, tal como se describe con mayor detalle posteriormente de unión a PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de los mismos, o alternativamente a los biomarcadores adicionales.

25 El ligante que puede utilizarse para determinar el nivel de protaquicnina (PTA), sus variantes de procesamiento o fragmentos de los mismos, muestran una constante de afinidad para PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de los mismos de por lo menos  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , preferentemente  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , constante de afinidad preferida es superior a  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , todavía más preferentemente superior a  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ . El experto en la materia conoce que puede considerarse la compensación de una afinidad más baja mediante la aplicación de una dosis más elevada de compuestos y esta medida no llevaría a apartarse del alcance de la invención. La afinidad de unión puede determinarse utilizando el método Biacore, ofrecido como análisis de servicio, por ejemplo, en Biaffin, Kassel, Alemania (<http://www.biaffin.com/de/>), ver también anteriormente.

35 El ligante que puede utilizarse para determinar el nivel de PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de los mismos, muestran una constante de afinidad para PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de los mismos de por lo menos  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , preferentemente  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , la constante de afinidad preferida es superior a  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , todavía más preferentemente superior a  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ . El experto en la materia conoce que puede considerarse la compensación de una afinidad más baja mediante la aplicación de una dosis más elevada de compuestos y esta medida no llevaría a apartarse del alcance de la invención. La afinidad de unión puede determinarse utilizando el método Biacore, ofrecido como análisis de servicio, por ejemplo, en Biaffin, Kassel, Alemania (<http://www.biaffin.com/de/>).

#### 40 Constantes de afinidad

45 Para determinar la afinidad de los anticuerpos, la cinética de unión de PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de los mismos a anticuerpo inmovilizado se determinó mediante resonancia del plasmón superficial libre de marcapos utilizando un sistema Biacore 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania). Se llevó a cabo la inmovilización reversible de los anticuerpos utilizando un anticuerpo anti-Fc de ratón acoplado covalentemente a alta densidad con la superficie de un sensor CM5 siguiendo las instrucciones del fabricante (kit de captura de anticuerpos de ratón; GE Healthcare). (Lorenz *et al.*, "Functional Antibodies Targeting IsaA of Staphylococcus aureus Augment Host Immune Response and Open New Perspectives for Antibacterial Therapy"; Antimicrob Agents Chemother. 55(1):165-173, enero de 2011).

55 Una muestra de control de PTA humano se encuentra disponible de ICI-Diagnostics, Berlin, Alemania, <http://www.ici-diagnostics.com/>. El ensayo también puede calibrarse con PTA sintético (para los experimentos de los presentes inventores se utilizó P37 sintético, SEC ID n° 2) o PTA recombinante, sus variantes de procesamiento o fragmentos de los mismos.

60 En una forma de realización de la invención, dicho método se lleva a cabo más de una vez con el fin de monitorizar el riesgo de experimentar un episodio cardíaco adverso grave en un sujeto o con el fin de monitorizar el curso del tratamiento. En una forma de realización específica, dicha monitorización se lleva a cabo con el fin de evaluar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas adoptadas.

En una forma de realización de la invención, el método se utiliza para estratificar dichos sujetos en grupos de riesgo.

65 La materia objeto de la invención es además un ensayo, al que se hace referencia en las reivindicaciones como "dispositivo", para determinar la PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos en una muestra que

comprende dos ligantes que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de PTA que son los aminoácidos 3-22 (GANDDLNYWSDWYDSDQIK, SEC ID nº 12) y los aminoácidos 21-36 (IKEELPEPFEHLLQRI, SEC ID nº 13), en la que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

5 En una forma de realización de los ensayos para determinar la PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos en una muestra según la presente invención, la sensibilidad analítica de ensayo de dicho ensayo es capaz de cuantificar la PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos de PTA de sujetos sanos y es <20 pmoles/l, preferentemente <10 pmoles/l y más preferentemente <5 pmoles/l.

10 En una forma de realización de los ensayos para determinar la PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos en una muestra según la presente invención, dicho ensayo es un ensayo de tipo sándwich, preferentemente un ensayo totalmente automatizado. Puede ser un ELISA, un ensayo totalmente automatizado o un ensayo manual. Puede ser un denominado ensayo PDA (punto de asistencia). Los ejemplos de ensayo automatizado o totalmente automatizado comprenden ensayos que pueden utilizarse para uno de los sistemas siguientes: Roche Elecsys®, Abbott Architect®, Siemens Centauer®, Brahms Kryptor®, Biomerieux Vidas®, Alere Triage®. Anteriormente se han proporcionado ejemplos de formatos de ensayo.

15 En una forma de realización de los ensayos para determinar la PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos en una muestra según la presente invención por lo menos uno de dichos dos ligantes se marca con el fin de ser detectado. Se han proporcionado anteriormente ejemplos de marcajes.

20 En una forma de realización de los ensayos para determinar la PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos en una muestra según la presente invención, por lo menos uno de dichos dos ligantes se encuentra unido a una fase sólida. Los ejemplos de fases sólidas son perlas magnéticas, tubos de poliestireno o placas de microtitulación.

25 En una forma de realización, se utilizó un ensayo homogéneo, es decir, utilizando tecnologías de emisión de criptato amplificada con resolución temporal (TRACE).

30 En una forma de realización de los ensayos para determinar la PTA, sus variantes de procesamiento o fragmentos en una muestra según la presente invención, dicho marcaje se selecciona de entre el grupo que comprende marcaje quimioluminiscente, marcaje enzimático, marcaje fluorescente y marcaje de radioyodo.

Un objeto adicional de la presente invención es un kit que comprende un ensayo según la presente invención, en el que los componentes de dicho ensayo pueden encontrarse comprendidos en uno o más recipientes.

35 En una forma de realización específica del método según la invención, se determina adicionalmente por lo menos un parámetro clínico seleccionado de entre el grupo que comprende edad, género, presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, tratamiento antihipertensor (THA), índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, proporción cintura-cadera, fumador actual, herencia de diabetes y enfermedad cardiovascular (ECV) anterior.

40 La materia objeto de la presente invención es además un método para predecir el riesgo de experimentar un episodio cardíaco adverso grave en un sujeto que sufre de AMI o identificar un sujeto que sufre de AMI con un riesgo incrementado de experimentar un episodio cardíaco adverso grave según la invención, en el que el nivel de protaquicininina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos solos o junto con otros parámetros de laboratorio o clínicos pronósticamente útiles se utiliza para la predicción del riesgo de un sujeto de experimentar un episodio cardíaco adverso grave mediante un método que puede seleccionarse de entre las alternativas siguientes:

- 45 • La comparación con la mediana del nivel de protaquicininina o fragmentos de la misma o péptidos que comprenden protaquicininina en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",
- 50 • Comparación con la mediana del nivel de protaquicininina o fragmentos de la misma o péptidos que comprenden protaquicininina en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",
- 55 • Cálculo basado en el análisis de riesgos proporcionales de Cox o mediante la utilización de cálculos de índice de riesgo, tales como el IRN (índice de reclasificación neta) o el IDI (índice de discriminación integrada).

60 En una forma de realización del método según la invención, dicho método se lleva a cabo más de una vez con el fin de monitorizar el riesgo de experimentar un episodio cardíaco adverso grave en un sujeto que sufre de AMI.

65 En otra forma de realización del método según la invención, dicha monitorización se lleva a cabo con el fin de evaluar la respuesta de dicho sujeto que sufre de AMI a las medidas preventivas y/o terapéuticas adoptadas.

En otra forma de realización del método según la invención, el método se utiliza para estratificar dichos sujetos que sufren de AMI en grupos de riesgo.

5 También se encuentra comprendido en la presente invención un dispositivo de punto de asistencia (“point-of-care”) para llevar a cabo un método según la invención.

También se encuentra comprendido en la presente invención un ensayo y/o kit para llevar a cabo un método según la invención.

10

**Descripción de las figuras**

figura 1: representa una curva de dosis/señal de PTA típica. Curva estándar de PTA.

15 figura 2: perfil de PTA plasmático durante los 5 días posteriores a AMI en pacientes con (en rojo) o sin (en verde) MACE a los 2 años.

figura 3: gráfico de reclasificación que representa la reclasificación hacia arriba y hacia abajo de las probabilidades de episodios en supervivientes y pacientes con el criterio de evaluación de muerte y/o MI a los 6 meses.

20

figura 4: árbol de clasificación para el criterio de evaluación de muerte y/o MI a los 6 meses.

figura 5: árboles de clasificación que utilizan PTA como el clasificador inicial, para el criterio de evaluación de muerte y/o MI a los 6 meses.

25

figura 6: gráfico de Kaplan Meier que muestra episodios de muerte y/o MI con el tiempo estratificados según PTA plasmático inferior o superior a 72.1 pmoles/l. Funciones de supervivencia.

30 figura 7: medias marginales estimadas de MEASURE\_1.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

35

Inmunoensayo de PTA

Desarrollo de anticuerpos anti-PTA

40 Péptidos/conjugados para la inmunización

Los péptidos para la inmunización se sintetizaron (JPT Technologies, Berlin, Alemania) con un residuo de cisteína N-terminal adicional para la conjugación de los péptidos con albúmina de suero bovino (BSA). Los péptidos se unieron covalentemente a BSA mediante la utilización de sulfó-SMCC (Perbio-Science, Bonn, Alemania). El procedimiento de acoplamiento se llevó a cabo según el manual de Perbio.

45

Tabla 1:

Péptido para la inmunización	Secuencia de PTA
(C)GANDDLNYWSDWYDSDQIK	3-22 (SEC ID nº 12)
(C) IKEELPEPFEHLLQRI	21-36 (SEC ID nº 13)

50 Se generaron los anticuerpos siguiendo el método a continuación:

Se inmunizó un ratón Balb/c con 100 µg de conjugado de péptido-BSA los días 0 y 14 (emulsionados en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg los días 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund). Tres días antes de realizar el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg del conjugado disueltos en 100 µl de solución salina, administrados como una inyección intraperitoneal y una inyección intravenosa.

55

Se fusionaron esplenocitos procedentes del ratón inmunizado y células de la estirpe celular de mieloma SP2/0 con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37°C. Tras el lavado, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Los clones híbridos se seleccionaron mediante el cultivo en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 20% y suplemento HAT]. Tras dos semanas, se sustituyó el medio HAT por medio HT durante tres pases, seguido del retorno al medio de cultivo celular normal.

60

Los sobrenadantes de cultivo celular se sometieron a cribado primario para anticuerpos Ig específicos de antígeno

tres semanas después de la fusión. Los microcultivos con resultado positivo en el ensayo se transfirieron a placas de 24 pocillos para la propagación. Tras realizar nuevamente los ensayos, los cultivos seleccionados se clonaron y reclonaron utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos.

- 5 (Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusión technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81: 223-228, 1985; Ziegler, B. *et al.*, "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28:11-15, 1996).

#### 10 Producción de anticuerpos monoclonales

Se produjeron anticuerpos mediante métodos estándares de producción de anticuerpos (Marx *et al.*, Monoclonal Antibody Production (1997), ATLA 25, 121) y se purificaron mediante cromatografía de proteína A. Las purezas de los anticuerpos eran >95% según el análisis de electroforesis en gel SDS.

#### 15 Marcaje y recubrimiento de anticuerpos:

Todos los anticuerpos se marcaron con éster de acridinio siguiendo el procedimiento siguiente:

- 20 El compuesto marcado (trazador, anti-PTA 3-22): 100 µg (100 µl) de anticuerpo (se mezcló 1 mg/ml en PBS, pH 7,4, con 10 µl de éster de NHS de acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (EP 0 353 971) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Se purificó el anticuerpo marcado mediante HPLC de filtración en gel en Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). El anticuerpo marcado purificado se diluyó en (fosfato de potasio 300 mmoles/l, NaCl 100 mmoles/l, Na-EDTA 10 mmoles/l, albúmina de suero bovino 5 g/l, pH 7.0). La concentración final era de aprox. 800.000 unidades lumínicas relativas (ULR) de compuesto marcado (aprox. 20 ng de anticuerpo marcado) por cada 200 µl. Se midió la quimioluminiscencia del éster de acridinio mediante la utilización de un AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

#### 30 Anticuerpo de fase sólida (anticuerpo recubierto):

Fase sólida: Se recubrieron tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) (18 h a temperatura ambiente) con anticuerpo anti-PTA 22-36 (1.5 µg de anticuerpo/0.3 ml, NaCl 100 mmoles/l, Tris/HCl 50 mmoles/l, pH 7.8). Tras el bloqueo con albúmina de suero bovino al 5 %, los tubos se lavaron con PBS, pH 7,4, y se secaron al vacío.

#### 35 Inmunoensayo de PTA:

- 40 Se pipetearon 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos recubiertos, tras añadir anticuerpo marcado (200 µl); los tubos se incubaron durante 2 h a 18-25°C. El trazador no unido se eliminó mediante lavado 5 veces (cada vez, 1 ml) con solución de lavado (PBS 20 mmoles/l, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%). El anticuerpo marcado unido a los tubos se midió mediante la utilización de un luminómetro LB 953, Berthold, Alemania.

#### Calibración:

- 45 El ensayo se calibró utilizando diluciones de P37 sintético, diluido en K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, EDTA 6 mM, BSA al 0.5%, amastatina 50 µM, leupeptina 100 µM, pH 8.0. El plasma de control de PTA se encuentra disponible en ICI-Diagnostics, Berlin, Alemania.

- 50 La sensibilidad analítica del ensayo era (la mediana de señal generada por 20 determinaciones de calibrador 0 (sin adición de PTA) + desviaciones estándar (SD) 2SD<sub>2</sub>; la concentración de PTA correspondiente se calcula a partir de una curva estándar) 4.4 pmoles/l.

### **Ejemplo 2 - Estudio en pacientes con infarto de miocardio agudo**

#### 55 Población de estudio:

- 60 En el contexto de la presente invención se estudiaron 1148 pacientes de IMEST (=infarto de miocardio con elevación del segmento ST) y de IMSEST (=infarto de miocardio sin elevación del segmento ST) hospitalizados en University Hospitals of Leicester NHS trust entre agosto de 2004 y abril de 2007. Este estudio de cohorte observacional cumplía con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité ético local; se obtuvo consentimiento informado por escrito de los pacientes. Se diagnosticó AMI en el caso de que el paciente presentase un nivel de troponina cardíaca I superior al centil 99 con por lo menos uno de los siguientes síntomas: dolor torácico durante >20 minutos o cambios electrocardiográficos en serie diagnósticos consistentes en ondas Q patológicas nuevas o cambios en el segmento ST u onda T (Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. Circulation 116:2634-53, 2007). Los pacientes con neoplasia maligna conocida, terapia de reemplazo

renal o cirugía en el mes anterior fueron excluidos. Se calculó la velocidad de filtración glomerular estimada (eGFR) a partir de la fórmula simplificada de Modification of Diet in Renal Disease (Smilde T.D., van Veldhuisen D.J., Navis G., Voors A.A., Hillege H.L. Drawbacks and prognostic value of formulas estimating renal function in patients with chronic heart failure and systolic dysfunction. *Circulation* 114:1572-80, 2006). Todos los pacientes recibieron tratamiento médico estándar y revascularización según el criterio del médico responsable.

#### Muestras de plasma:

Se extrajeron muestras de sangre (anticoaguladas con EDTA y aprotinina) tras 15 minutos de reposo en cama, inmediatamente después del diagnóstico y dentro de las 36 h posteriores a la aparición de los síntomas. Se almacenó el plasma a -80°C hasta el ensayo en un único lote para la determinación en ciego de PTA y NTPproBNP en plasma.

#### Ecocardiografía:

Se llevó a cabo ecocardiografía transtorácica en 895 pacientes (77.9%) durante el ingreso índice, utilizando un instrumento Sonos 5500 o IE 33 (Philips Medical Systems, Reigate, Reino Unido). Se calculó una puntuación de índice de movimiento de pared ventricular izquierda de 16 segmentos (IMPVI) basado en el método de la American Society of Echocardiography (Schiller N.B., Shah P.M., Crawford M. *et al.*, Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. Comité de estándares de la American Society of Echocardiography, subcomité de cuantificación de ecocardiogramas bidimensionales. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2: 358-367, 1989). En pacientes adecuados, se calculó la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) utilizando la fórmula del método biplano de discos. Se definió la disfunción sistólica del VI (DSVI) como un FEVI < 40% o un IMPVI > 1.8.

Puntuaciones del registro global de episodios coronarios agudos (GRACE): basándose en la base de datos observacionales internacional de pacientes de síndrome coronario agudo, pueden calcularse puntuaciones de GRACE en la presentación inicial para predecir la mortalidad hospitalaria Granger C.B., Goldberg R.J., Dabbous O. *et al.*, Global Registry of Acute Coronary Events Investigators. Predictors of hospital mortality in the global registry of acute coronary events. *Arch. Intern. Med.* 163:2345-53, 2003) o de episodios cardíacos adversos graves (MACE) a los 6 meses, definidos como muerte y/o re-MI (Eagle KA, Lim MJ, Dabbous O.H. *et al.*, A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month post discharge death in an international registry. *JAMA* 291:2727-33, 2004). En el contexto de la presente invención se utilizaron las puntuaciones de GRACE en el momento del alta para la comparación con muerte y/o re-AMI a los 6 meses.

#### Criterios de evaluación:

El criterio de evaluación compuesto primario son los episodios cardíacos adversos graves (MACE), incluyendo la mortalidad por todas las causas, la hospitalización por insuficiencia cardíaca (IC) o AMI recurrente (re-AMI), que se evaluaron dentro de los 2 años. La hospitalización por IC se define como una readmisión hospitalaria para la que la IC era el motivo principal que requería tratamiento con una dosis elevada de diuréticos, inótrópos o nitrato intravenoso. Se diagnosticó el AMI recurrente utilizando la definición universal (Thygesen K., Alpert J.S., White H.D.; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction, *Circulation* 116:2634-53, 2007). Los criterios de evaluación secundaria eran compuestos de muerte y/o re-AMI y muerte y/o readmisión por IC y re-AMI individualmente. El criterio de evaluación de muerte y/o re-AMI a los 6 meses se utilizó en análisis que implicaban la puntuación GRACE, ya que este punto temporal se utilizó en el desarrollo de la puntuación de riesgo. Se obtuvieron los criterios de evaluación mediante la revisión de las bases de datos hospitalarias locales y la Office of National Statistics Registry y de las llamadas telefónicas a los pacientes.

En el contexto de la presente invención se consigue un seguimiento de 100%. Análisis estadístico: Se llevaron a cabo los análisis estadísticos en SPSS versión 20 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) y Stata 12.1 (Texas, USA). Suponiendo una tasa de episodios de 15% y que las covariables predicen hasta 30% de la varianza del biomarcador, un tamaño de muestra de 600 pacientes presentaría el poder (90% con  $p < 0,05$ ) para detectar un cociente de riesgos del biomarcador de 1,5. Los niveles de los biomarcadores se transformaron con  $\log_{10}$  y, por lo tanto, los cocientes de riesgos se refieren a una elevación de 10 veces de los niveles de estos marcadores. Se utilizaron las puntuaciones de GRACE como las puntuaciones originales. Se utilizaron pruebas no paramétricas para los datos no gaussianos (prueba U de Mann-Whitney, prueba de Kruskal-Wallis y correlaciones de Spearman (rs)). Se evaluaron predictores independientes de los niveles de PTA utilizando modelos lineales generales univariantes. Para evaluar el valor pronóstico de los biomarcadores, se generó un modelo 'base' utilizando el análisis de supervivencia de Cox, que incluía variables que estaban significativamente ( $p < 0,10$ ) asociadas a cualquiera de los criterios de evaluación del estudio en el análisis univariante (edad, género, historia anterior de enfermedad cardíaca isquémica (ECI), hipertensión o diabetes, clase de Killip, eGFR y log troponina I). Se añadieron biomarcadores (NTproBNP, PTA) a este modelo base para evaluar el valor pronóstico relativo de cada uno con todas las variables introducidas simultáneamente. Se utilizó un segundo modelo de Cox 'comparativo' para evaluar el poder pronóstico relativo de estos marcadores y la puntuación de GRACE. El valor pronóstico

adicional de PTA para la puntuación de GRACE se evaluó mediante análisis de reclasificación con cálculo de la mejora de reclasificación neta (IRN) sin categorías tal como describen Pencina *et al.* (Pencina M.J., D'Agostino R.B. Sr, Steyerberg E.W., Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. Stat. Med. 30:11-21, 2011). En el contexto de la presente invención se construyen árboles de clasificación utilizando el análisis de detección automática de interacciones mediante chi-cuadrado (CHAID, análisis realizado por SPSS), que selecciona en cada etapa el biomarcador que presenta la interacción más fuerte con la variable dependiente.

#### Características de los pacientes

Las características de la población de estudio se muestran en la tabla 2, según sus cuartiles de PTA. Los pacientes con niveles más altos de PTA eran de más edad, de sexo femenino, con historia de hipertensión, ECI; diabetes, IC, y presentaban puntuaciones de GRACE, y niveles de NTproBNP y de glucosa más elevados. También presentaban funciones cardíaca y renal más deterioradas.

Tabla 2:

	Todos	Cuartiles de PTA				valor de P
		1	2	3	4	
		<52.0 pmoles/l	52.0 a 65.19 pmoles/l	65.19 a 89.1 pmoles/l	>89.1 pmoles/l	
	n=1148	n=288	n=286	n=288	n=286	
PTA (pmoles/l)	77,2 ± 55,7	42,2 ± 7,43	58,4 ± 4,0	75,6 ± 7,1	132,9 ± 87,4	<0.005
NTproBNP (pmoles/l)	1849 ± 2108	891,3 ± 1062	1339 ± 1641	1874 ± 2030	3300 ± 2569	<0.005
Datos demográficos						
Edad (años)	66.2 ± 12.8	58.3 ± 11.2	63.1 ± 11.0	68.1 ± 11.9	75.4 ± 10.3	<0.001
Sexo masculino (%)	825 (72)	235 (82)	214 (75)	208 (72)	168 (58)	<0.001
MI con elevación de ST	545 (47)	144 (50)	132 (46)	149 (52)	120 (42)	NS
Historia previa						
ECI	379 (33)	67 (23)	80 (28)	91 (31)	141 (49)	<0.001
Insuficiencia cardíaca	46 (4)	3 (1)	8 (3)	10 (3)	19 (7)	<0.003
Hipertensión	596 (52)	125 (44)	134 (47)	152 (53)	185 (65)	<0.001
Diabetes mellitus	266 (23)	53 (18)	71 (25)	61 (21)	81 (28)	0,032
Clase de Killip>1	426 (40)	61 (24)	92 (35)	121 (45)	152 (56)	<0.001
Glucosa (mmoles/l)	8.9 ± 4.2	8.5 ± 3.9	8.7 ± 3.9	8.4 ± 3.5	9.9 ± 5.4	<0.001
Troponina I (ng/ml)	13.1 ± 25.8	13.2 ± 26.7	12.0 ± 24.4	15.0 ± 27.9	12.1 ± 24.2	NS
eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	65.6 ± 20.1	77.9 ± 17.7	71.4 ± 15.5	64.4 ± 16.6	48.9 ± 17.9	<0.001
Marcadores de riesgo en el alta						
DSVI ecocardiográfica [n=893]						
Índice de movimiento de la pared del VI	1.47 ± 0.42	1.38 ± 0.37	1.46 ± 0.42	1.46 ± 0.41	1.60 ± 0.43	<0.001
Fracción de eyección del VI	42.1 ± 14.5	44.8 ± 13.8	43.8 ± 14.3	41.4 ± 13.8	38.3 ± 15.2	<0.001
Puntuación de GRACE	120.0 ± 32.7	99.7 ± 26.6	109.6 ± 26.9	125.6 ± 28.4	144.5 ± 29.9	<0.001
Tratamiento						
Aspirina	963 (84)	255 (89)	255 (89)	238 (82)	215 (75)	<0.001
Betabloqueante	920 (80)	256 (89)	238 (83)	230 (80)	196 (69)	<0.001
Inhibidor de ACE o ARB*	940 (82)	249 (87)	234 (82)	245 (85)	212 (74)	<0.001
Estatina	1002 (87)	270 (94)	258 (90)	260 (90)	214 (75)	<0.001

	Todos	Cuartiles de PTA				valor de P
		1	2	3	4	
		<52.0 pmoles/l	52.0 a 65.19 pmoles/l	65.19 a 89.1 pmoles/l	>89.1 pmoles/l	
Diurético del asa	289 (25)	39 (14)	59 (21)	69 (24)	122 (43)	<0.001
Criterios de evaluación (2 años)						
Episodios cardíacos adversos graves	324 (28)	45 (16)	53 (18)	77 (27)	149 (52)	<0.001
Muerte	140 (12)	11 (4)	11 (4)	31 (11)	87 (30)	<0.001
Episodios cardíacos adversos graves no fatales	230 (20)	41 (14)	46 (16)	56 (19)	87 (30)	<0.001
Insuficiencia cardíaca	112 (9,8)	13 (5)	19 (7)	28 (10)	52 (18)	<0.001
Re-AMI	149 (13)	29 (10)	35 (12)	33 (11)	52 (18)	<0.021

Características de los 1148 pacientes de AMI según los cuartiles de PTA en el momento del alta. Los datos de números se presentan como n (%). Se indican los valores de P para los análisis de ANOVA (estadístico F) o pruebas de Kruskal Wallis para las variables continuas o discretas, respectivamente. Se proporcionan números (%) o medias  $\pm$  SD.

Análisis de correlación

El análisis de Spearman (rs) reveló que PTA se encontraba significativamente correlacionada con edad (0.521), eGFR (-0.555), pulso diastólico (-0.178), NTproBNP (0.428), fracción de eyección (-0.175) (todos con P<0.0005) y frecuencia cardíaca (0.100, P<0.001). PTA no se correlacionaba con los niveles de troponina o con los niveles pico de creatina cinasa.

Un modelo lineal general univariante señaló los predictores independientes siguientes de nivel de PTA, en orden descendente según la varianza explicada en el modelo (Tabla 3): eGFR, edad, historia de diabetes y ECI, clase de Killip superior a 1, puntuación de movimiento de pared del VI, género femenino y pulso diastólico. eGFR explicaba la fracción más grande de la varianza (20.7%).

Tabla 3:

Variable	Suma de cuadrados de tipo III	Estadístico F	valor de P
eGFR	2.299	107.384	0.000
Edad	0.688	32,141	0.000
Historia de diabetes	0.275	12.859	0.000
ECI anterior	0.217	10,112	0.002
Clase de Killip>1	0.176	8.198	0.004
IPMP (puntuación de movimiento parietal)	0.119	5.554	0.019
Género femenino	0.112	5.242	0.022
Pulso diastólico	0.100	4.649	0.031
Antecedentes de hipertensión	0.071	3.332	NS
Frecuencia cardíaca	0.011	0.499	NS
R <sup>2</sup> ajustado: 0.38			

Modelo lineal general univariante que muestra predictores independientes de niveles de PTA

Curvas diarias de PTA

Se disponía de muestras secuenciales de plasma para 5 días de 110 pacientes, de los cuales 29 presentaron un MACE en 2 años. La figura 2 demuestra el perfil plasmático junto con un modelo lineal general con medidas repetidas que mostraba cambios significativos de PTA durante el tiempo (p<0.001) y niveles más elevados en pacientes con MACE (p<0.03). En las pruebas post-hoc, los niveles de PTA el día 1 eran más altos que el día 3, 4 o 5 (p<0.001, 0.004 y 0.002, respectivamente, con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples). Los niveles de PTA los días 1 y 2 eran similares. No se observó interacción estadísticamente significativa del perfil

temporal de PTA y los MACE.

Análisis de supervivencia

- 5 Durante el seguimiento durante 2 años, los pacientes con niveles elevados de PTA (transformados con log10 y expresados como una variable continua) presentaron más muertes por MACE y rehospitalizaciones con insuficiencia cardiaca (IC) o re-AMI (Tabla 2). La tabla 4 proporciona los cocientes de riesgos univariantes y multivariantes de diversos factores que afectaban al resultado de MACE a los 2 años.

10

Tabla 4:

	CR univariante (IC al 95%)	P	CR de modelo multivariante 1 (IC al 95%)	P	CR de modelo multivariante 2 (IC al 95%)	P	CR de modelo multivariante 3 (IC al 95%)	P
Edad	1.05 (1.04-1.06)	0,000	1.02 (1.00-1.03)	0.023	1.02 (1.00-1.03)	0.027	1.02 (1.00-1.04)	0.024
Sexo	0.63 (0.50-0.79)	0,000		NS		NS		NS
Elevación de ST	0.43 (0.88-1.36)	NS						
Puntuación de GRACE	1.02 (1.02-1.03)	0,000						
Clase de Killip>1	2.68 (2.12-3.37)	0,000	1.63 (1.26-2.11)	0.000		NS	1.75 (1.27-2.42)	0.001
eGFR	0.97 (0.96-0.98)	0,000		NS		NS		NS
Troponina	1.15 (0.98-1.34)	NS						
Disfunción sistólica del VI (eco)	2.24 (1.74-2.88)	0,000						
<b>Antecedentes</b>								
Enfermedad cardiaca isquémica	1.52 (1.22-1.90)	0,000		NS		NS		NS
Hipertensión	1.64 (1.31-2.05)	0,000		NS		NS		NS
Diabetes	1.55 (1.22-1.96)	0,000		NS		NS		NS
<b>Tratamiento en el alta</b>								
Aspirina	0.57 (0.44-0.75)	0.000		NS		NS		NS
Beta-bloqueantes	0.52 (0.41-0.66)	0.000		NS		NS	0.64 (0.47-0.88)	0.006
Inhibidor de ACE/ARB	0.55 (0.43-0.71)	0.000	0.74 (0.56-0.99)	0.045	0.65 (0.48-0.89)	0.007		NS
Estatinas	0.40 (0.31-0.52)	0.000	0.66 (0.47-0.92)	0.014	0.61 (0.43-0.88)	0.008	0.54 (0.38-0.78)	0.001
Diuréticos	2.36 (1.89-2.94)	0.000	1.34 (1.03-1.74)	0.03		NS	1.65 (1.21-2.26)	0.002
<b>Marcadores biológicos</b>								
Log NTproBNP	2.32 (1.90-2.84)	0.000		NS		NS	1.74 (1.25-2.42)	0.001
Log PTA	19.96 (12.29-32.42)	0.000	3.87 (1.82-8.22)	0.000	6.22 (2.82-13.72)	0.000	4.10 (1.69-9.94)	0.002

Análisis de regresión de Cox para MACE a los 2 años post-AMI. Los resultados del análisis multivariante se informan para el modelo 1, que incluía variables y biomarcadores que eran significativos en el análisis univariante para la predicción de MACE (excepto GRACE y disfunción sistólica del VI). Los modelos multivariantes 2 y 3 son para la predicción de criterios de evaluación compuestos de muerte y/o re-MI (modelo 2) y muerte y/o rehospitalización por IC (modelo 3). Sólo se informa de cocientes de riesgos significativos.

15

En el análisis multivariante para predecir SCAT a los 2 años, los predictores independientes significativos incluían edad, clase de Killip superior a 1, terapia con estatinas, ACE/ARB y diuréticos, y PTA. En otros modelos de predicción de los criterios de evaluación compuestos secundarios de muerte y/o re-AMI (modelo 2) y muerte y/o rehospitalización por IC (modelo 3), PTA se mantuvo como predictor independiente ( $p < 0.0005$  y  $p < 0.002$ , respectivamente). En modelos de MACE y cada uno de los criterios de evaluación compuestos secundarios que incluían evidencia ecocardiográfica de DSVI (datos no representados), PTA se mantuvo como un predictor independiente significativo ( $P < 0.005$  para todos) junto con DSVI (valores de  $p$  entre 0.015 y 0.025).

La tabla 5 informa de cocientes de riesgos univariantes y multivariantes para el criterio de evaluación de re-AMI a los 2 años.

	CR univariante (IC al 95%)	P	CR de modelo multivariante 1 (IC al 95%)	P	CR de modelo multivariante 2 (IC al 95%)	P	CR de modelo multivariante 3 (IC al 95%)	P
Edad	1.02 (1.01-1.03)	0.004		NS		NS		NS
Sexo	0.85 (0.60-1.21)	NS						
Elevación de ST	1.15 (0.83-1.58)	NS						
Puntuación de GRACE	1.01 (1.00-1.01)	0.003						
Clase de Killip >1	1.64 (1.18-2.27)	0.003		NS		NS		NS
eGFR	0.99 (0.98-0.99)	0.016		NS		NS		NS
Troponina	1.01 (0.81-1.27)	NS						
Disfunción sistólica del VI (eco)	1.60 (1.12-2.29)	0.010						NS
<b>Antecedentes</b>								
Enfermedad cardíaca isquémica	1.73 (1.25-2.39)	0.001	1.42 (0.99-2.03)	0.055		NS		NS
Hipertensión	1.56 (1.12-2.18)	0.008		NS		NS		NS
Diabetes	1.60 (1.13-2.26)	0.008		NS		NS		NS
<b>Tratamiento en el alta</b>								
Aspirina	0.99 (0.63-1.55)	NS						
Beta-bloqueantes	1.29 (0.82-2.03)	NS						
Inhibidor de ACE/ARB	0.74 (0.50-1.09)	NS						
Estatinas	1.03 (0.61-1.76)	NS						
Diuréticos	1.51 (1.07-2.13)	0.018		NS		NS		NS
<b>Marcadores biológicos</b>								
Log NTproBNP	1.34 (1.05-1.71)	0.019		NS		NS		NS
Log PTA	4.45 (2.00-9.91)	0.000			3.11 (1.06-9.11)	0.039	3.06 (0.92-10.13)	0.068

Tabla 5: análisis de regresión de Cox de criterio de evaluación de re-MI 2 años después de AMI. Se informa de los resultados del análisis multivariante para el modelo 1, que incluía variables y NTproBNP que eran significativos en el análisis univariante (excepto GRACE y disfunción sistólica del VI). El modelo multivariante 2 informa de cocientes de riesgos tras la adición de pro-SP al modelo 1. El modelo multivariante 3 informa de cocientes de riesgos tras la adición de DSVI al modelo 2. Sólo se informa de cocientes de riesgos significativos.

En el modelo 1, que incluía predictores univariantes significativos y NTproBNP, existía una tendencia a la significancia ( $p = 0.055$ ) de los antecedentes de ECI. La adición de PTA a lo anterior reveló que PTA era un predictor

significativo de re-AMI (modelo 2, tabla 5). Al añadir DSVI ecocardiográfico, PTA mostró una tendencia a la significancia (modelo 3, tabla 5).

Comparación con las puntuaciones de GRACE

5 La ampliamente utilizada puntuación de riesgo de GRACE (Eagle K.A., Lim M.J., Dabbous O.H. *et al.*, A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month post discharge death in an international registry. JAMA 291:2727-33, 2004) se derivó originalmente para la predicción de muerte y/o MI a los 6 meses. Las puntuaciones de GRACE y los biomarcadores NTproBNP y PTA eran predictores de MACE en el análisis univariante (Tabla 6).

Tabla 6:

	CR univariante (IC al 95%)	P	CR modelo univariante 1 (IC al 95%)	P	CR modelo univariante 2 (IC al 95%)	P	CR modelo univariante 3 (IC al 95%)	P
Puntuación de GRACE	1.02 (1.02-1.03)	0.000	1.02 (1.01-1.02)	0.000	1.01 (1.01-1.02)	0.000	1.02 (1.02-1.03)	0.000
Biomarcadores								
Log NTproBNP	2.50 (1.97-3.18)	0.000	1.39 (1.05-1.83)	0.02		NS	2.21 (1.46-3.35)	0.000
Log PTA	17.19 (9.85-29.99)	0.000	3.90 (1.72-8.84)	0.001	5.93 (2.64-13.33)	0.000	3.46 (1.29-9.28)	0.014

15 El análisis de regresión de Cox para criterios de evaluación a los 6 meses. CR univariante se refiere a MACE a los 6 meses. Los modelos multivariantes incluían puntuación de GRACE y biomarcadores para la predicción de MACE (modelo 1), muerte y/o MI (modelo 2) y muerte y/o IC (modelo 3). Sólo se informa de cocientes de riesgos significativos.

20 En el análisis multivariante de MACE, muerte y/o MI y muerte y/o IC a los 6 meses, la puntuación de GRACE y PTA siguieron siendo predictores, mientras que NTproBNP sólo se mantuvo para el modelo de MACE y muerte y/o IC (modelos 1 y 3 en la tabla 6).

25 Utilizando el análisis de la curva característica de receptor-operador (ROC) para muerte y/o MI a los 6 meses, la superficie bajo la curva (AUC) se incrementó de 0.695 (IC al 95%: 0.649-0.741) para la puntuación de GRACE solo a 0.722 (0.677-0.768) con la adición de PTA (P=0.016 en comparación con la puntuación de GRACE sola). Con la adición de NTproBNP a este ROC, no se produjo un incremento adicional de AUC (0.722 (0.676-0.768)), aunque este AUC era significativamente mayor que el de la puntuación de GRACE por sí sola (P=0.027).

30 Se utilizó análisis de reclasificación sin categorías tal como describen Pencina *et al.* (Pencina M.J., D'Agostino R.B. Sr, Steyerberg E.W., Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers, Stat. Med. 30:11-21, 2011) para calcular la NRI (>0) de manera que no se seleccionasen probabilidades de corte arbitrarias para el análisis. La figura 3 muestra el gráfico de reclasificación tal como propone Steyerberg (Steyerberg E.W., Vickers A.J., Cook N.R., Gerds T., Gonen M., Obuchowski N., Pencina M.J., Kattan M.W., Assessing the performance of prediction models. A framework for traditional and novel measures. Epidemiology 21:128-138, 2010), con probabilidades de episodios utilizando la puntuación de GRACE sola representada frente a las probabilidades de los episodios utilizando puntuaciones de GRACE ajustadas para PTA. Las probabilidades ajustadas según PTA en aquellas sin resultado adverso se clasifican hacia abajo (es decir, bajo la diagonal en la figura 3). La NRI en pacientes sin el criterio de evaluación de muerte y/o MI a los 6 meses era de 22.3 (IC al 95% 15.6 - 29.0, P<0.0005) y en aquellos con el criterio de evaluación era de 9.3 (IC al 95% de 6.7-25.3, P=NS), con NRI global (>0) de 31.6 (IC al 95% 14.3 - 49.0, P<0.0005), sugiriendo que PTA mejoraba la estratificación de riesgos con la puntuación de GRACE, predominantemente clasificando hacia abajo aquellos sin criterios de evaluación (Tabla 7).

Tabla 7:

Continua							
	Hacia arriba	Hacia abajo	NRI	p	IC inferior	IC superior	
Sin criterio de evaluación	329	518	22.3	0.000	15.6	29.0	
Con criterio de evaluación	82	68	9.3	0.253	-6.7	25.3	
Total			31.6	0.000	14.3	49.0	
Tertilas							
	Hacia arriba	Hacia abajo	NRI	p	IC inferior	IC superior	
Sin criterio de evaluación	86	135	5.8	0.001	2.3	9.2	

Con criterio de evaluación	21	15	4.0	0.3317	-3.8	11.8
Total			9.8	0.025	1.2	18.3
Umbral de riesgo 0.05 y 0.1						
	Hacia arriba	Hacia abajo	NRI	p	IC inferior	IC superior
Sin criterio de evaluación	58	157	11.7	0.000	8.3	15.1
Con criterio de evaluación	6	10	-2.7	0.3317	-7.9	2.6
Total			9.0	0.005	2.8	15.3

El análisis de reclasificación utilizando la reclasificación continua, tertias o 2 umbrales de riesgo especificados de 0.05 y 0.1, que mostraba la mejora de reclasificación neta (NRI) y la significancia de la NRI de la adición de PTA a la clasificación utilizando la puntuación de GRACE sola, para el criterio de evaluación de muerte y/o MI a los 6 meses.

5

En el caso de que se seleccionasen tertias como los dos valores de corte para las probabilidades de muerte y/o MI a los 6 meses, el análisis de reclasificación mostró que PTA principalmente clasificó hacia abajo aquellos sin el criterio de evaluación, con una NRI neta significativa (9.8,  $P < 0.025$ ).

10

En el caso de que se seleccionasen dos valores de corte de probabilidades de muerte y/o MI a los 6 meses (5% y 10%), la NRI en aquellos sin el criterio de evaluación de muerte y/o MI a los 6 meses era de 11.7 ( $P < 0.0005$ ) y una NRI no significativa en aquellos con el criterio de evaluación, conduciendo a una NRI global de 9.0 ( $P < 0.005$ ).

#### Análisis de árbol de decisiones

15

Con el fin de determinar los puntos de corte óptimos para los biomarcadores, en el contexto de la presente invención se construyeron árboles de decisión (utilizando los niveles de PTA y NTproBNP y puntuaciones de GRACE) para clasificar los pacientes en supervivientes o aquellos con criterios de evaluación. Para el criterio de evaluación de muerte y/o MI a los 6 meses (figura 4), PTA bajo 82.8 pmoles/l seleccionó un subgrupo (n=583, 50.8% del total) en aquellos con NTproBNP inferior a 2256 pmoles/l y puntuación de GRACE inferior a 137, quienes presentaban un riesgo bajo de muerte y/o MI (6.3% en comparación con 15.5% en la población original).

20

25

En los árboles de decisión que utilizan PTA como un clasificador inicial (figura 5), un nivel de PTA inferior a 72.08 pmoles/l y puntuación de GRACE inferior a 137 define un grupo de pacientes de bajo riesgo (n=512, 44.6% del total) en el que la tasa de episodios era de 6.8%. De ellos, sólo 3 pacientes (0.26%) habían muerto en 6 meses y 1 (0.09%) había muerto en 30 días. Los niveles de PTA superiores a 121.6 pmoles/l definieron un grupo de pacientes de alto riesgo con una tasa de muerte/MI de 37.7% y una tasa de muerte de 30.7% (figura 5).

#### Análisis de Kaplan-Meier

30

Utilizando un valor de corte de 72.1 pmoles/l, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier del criterio de evaluación combinado de muerte y/o MI demostró una diferencia significativa entre aquellos con niveles inferiores (n=689, 60% del total) o superiores a este valor de corte (valor de P para la prueba de rangos log  $< 0.0005$ ) (figura 6).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para predecir el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o muerte en un sujeto que ha sufrido de un infarto de miocardio agudo que comprende:
- determinar el nivel de protaquicinina según SEC ID nº 1, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11 o fragmentos de la misma en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto; y
  - correlacionar dicho nivel de protaquicinina, SEC ID nº 1, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11 o fragmentos de la misma con el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o la muerte, en el que un nivel elevado es predictivo de un riesgo aumentado de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o la muerte.
- 10 en el que los fragmentos de protaquicinina se seleccionan de entre el grupo que comprende SEC ID nº 2, SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13, y
- 15 en el que dicho líquido corporal se selecciona de entre el grupo que comprende sangre, suero y plasma.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que se determina el nivel de protaquicinina o fragmentos de la misma en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto, en el que se utiliza por lo menos un ligante para dicha determinación que se liga a PTA 1-37, SEC ID nº 2, EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIA, y en el que dicho ligante presenta una afinidad a PTA 1-37 de por lo menos  $10^7 M^{-1}$ .
- 25 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho episodio cardiaco adverso grave es un episodio cardiaco adverso grave agudo seleccionado de entre el grupo que comprende infarto de miocardio, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca aguda.
- 30 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una muestra de líquido corporal de dicho sujeto se ha obtenido dentro de un marco temporal determinado después de que haya ocurrido el AMI, siendo este marco temporal 2 meses, más preferentemente 1 mes, más preferentemente 1 semana, todavía más preferentemente dentro de 24 horas.
- 35 5. Método para predecir el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o muerte en un sujeto que ha sufrido de un infarto de miocardio agudo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que un nivel elevado es predictivo de un riesgo aumentado de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o muerte dentro de los 6 meses siguientes o dentro de los 2 años siguientes.
- 40 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que además se determina y se utiliza el nivel de uno o más de los marcadores siguientes: troponina I, troponina T, CRP, LpLA2, cistatina C y péptidos natriuréticos de los tipos A y B, así como sus precursores y fragmentos de los mismos, que incluyen ANP, proANP, NT-proANP, MR-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP triglicéridos, colesterol de HDL o subfracciones del mismo, colesterol de LDL o subfracciones del mismo, GDF15, ST2, copeptina, y/o cualquier puntuación, tal como por ejemplo la puntuación de riesgo PURSUIT, TIMI, GRACE y FRISC.
- 45 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que adicionalmente se determina por lo menos un parámetro clínico seleccionado de entre el grupo que comprende: edad, presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, tratamiento antihipertensor, índice de masa corporal, presencia de diabetes mellitus, tabaquismo actual.
- 50 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se mide el nivel de protaquicinina o fragmentos de la misma con un inmunoensayo.
- 55 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho método se lleva a cabo más de una vez para monitorizar el riesgo de experimentar un episodio cardiaco adverso grave o muerte en un sujeto.
- 60 10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha monitorización se lleva a cabo para evaluar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas adoptadas.
- 65 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para estratificar dichos sujetos en grupos de riesgo.
12. Utilización de un dispositivo seleccionado de entre el grupo que comprende ensayos de tipo sándwich, ensayos totalmente automatizados o manuales, ELISA, y dispositivos de punto de asistencia para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.
13. Utilización de un dispositivo según la reivindicación 12, que comprende dos ligantes que se ligan a dos regiones diferentes dentro de la región de PTA, en la que dichas dos regiones corresponden a por lo menos 4 o 5

aminoácidos de SEC ID nº 12 y 13.

14. Utilización de un dispositivo según la reivindicación 12, que comprende además:

- 5
- un ligante contra proBNP o fragmentos o precursores del mismo que presentan por lo menos 5 aminoácidos, y
  - un ligante contra la protaquicínina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos o péptidos que comprenden protaquicínina y/o un ligante contra CRP.

10

15. Utilización de un dispositivo según la reivindicación 14, en la que dicho ligante se selecciona de entre el grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y un andamiaje no Ig.

Fig. 1:

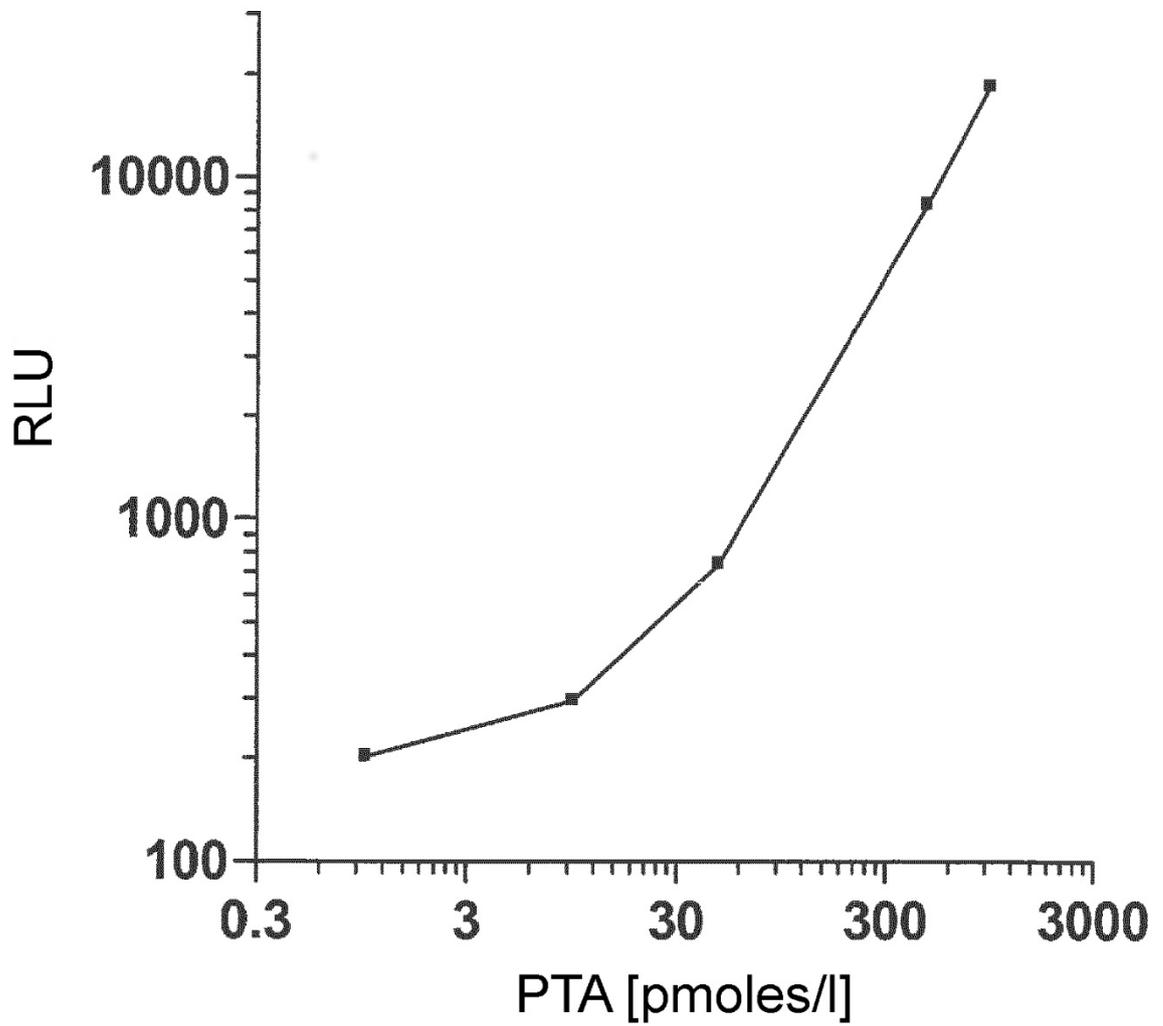


Fig. 2:

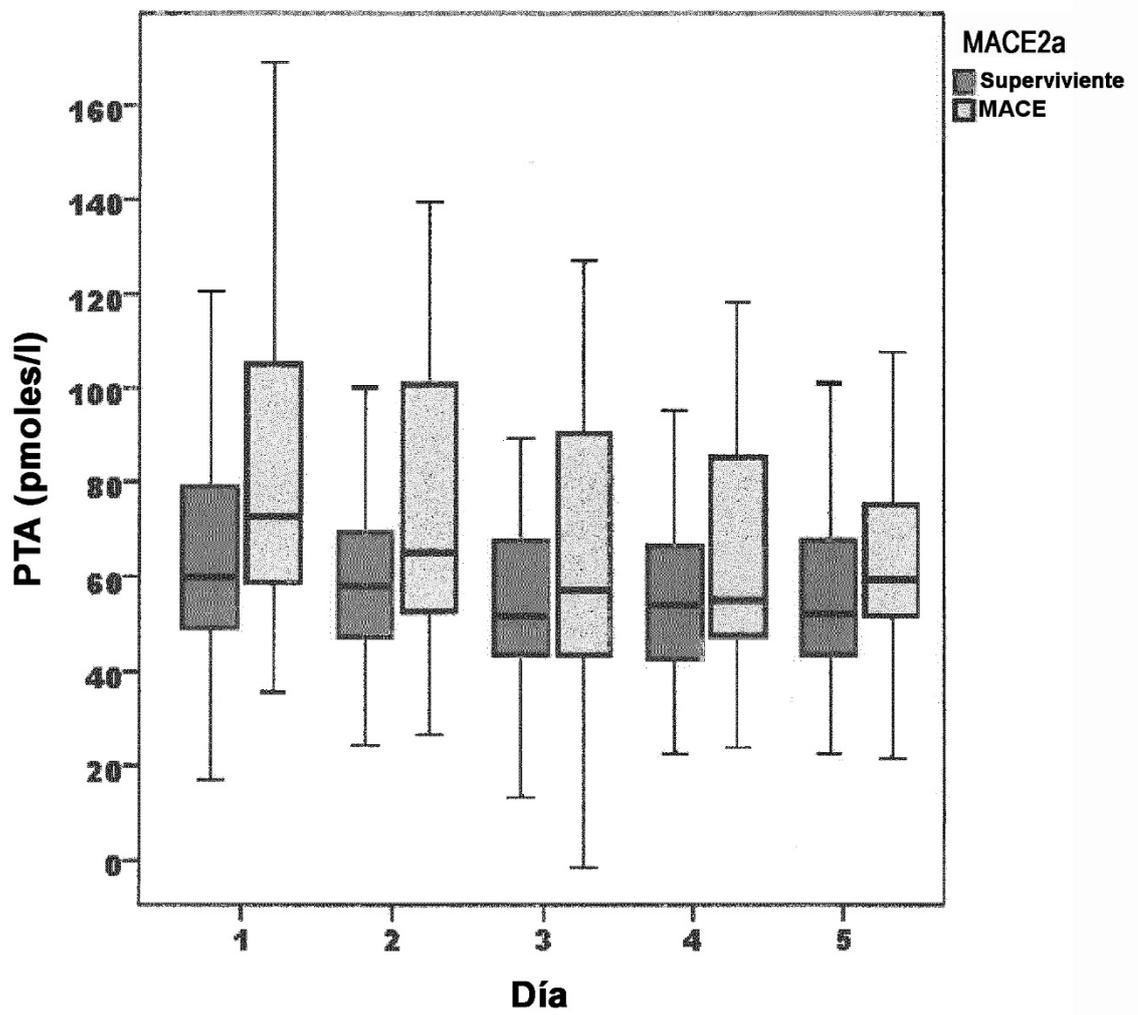


Fig. 3

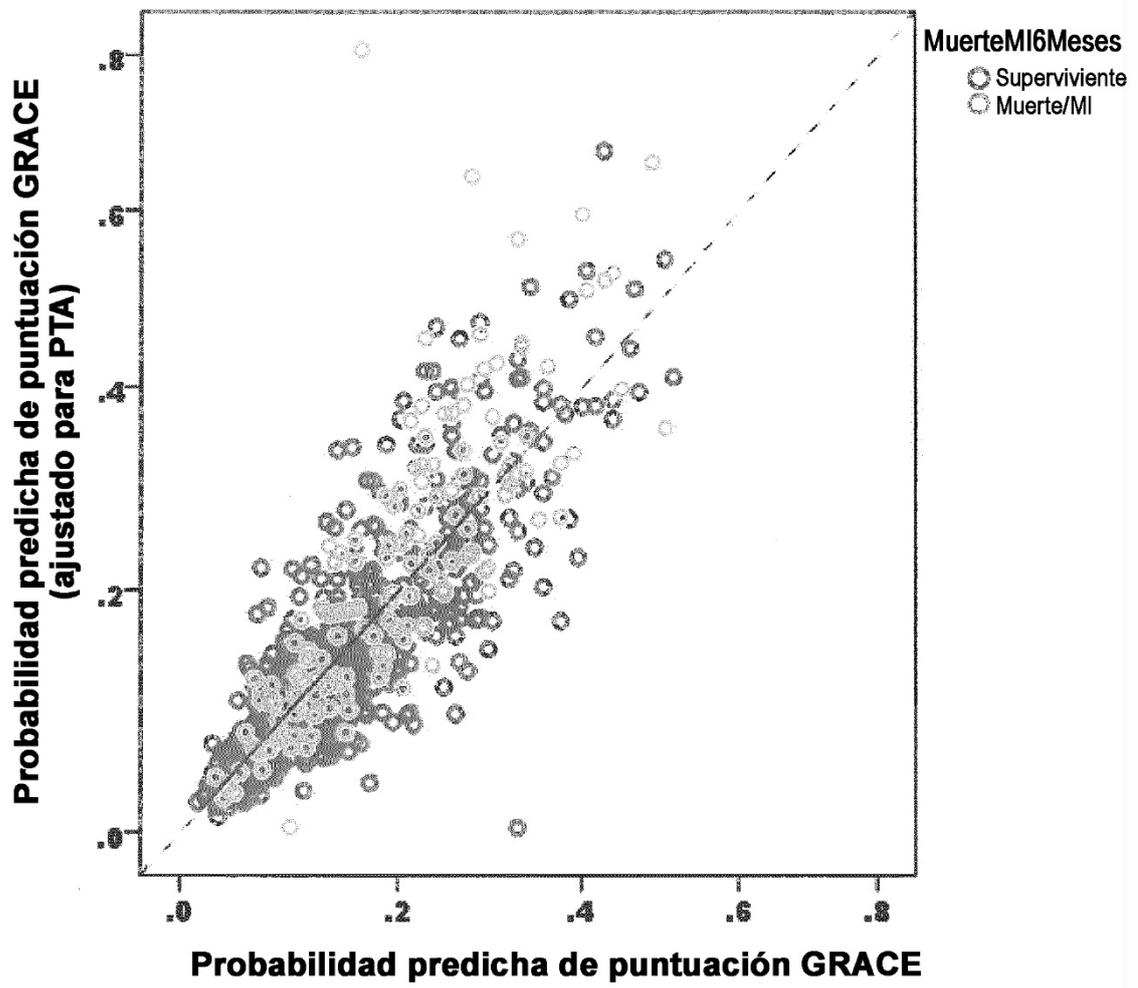


Fig. 4

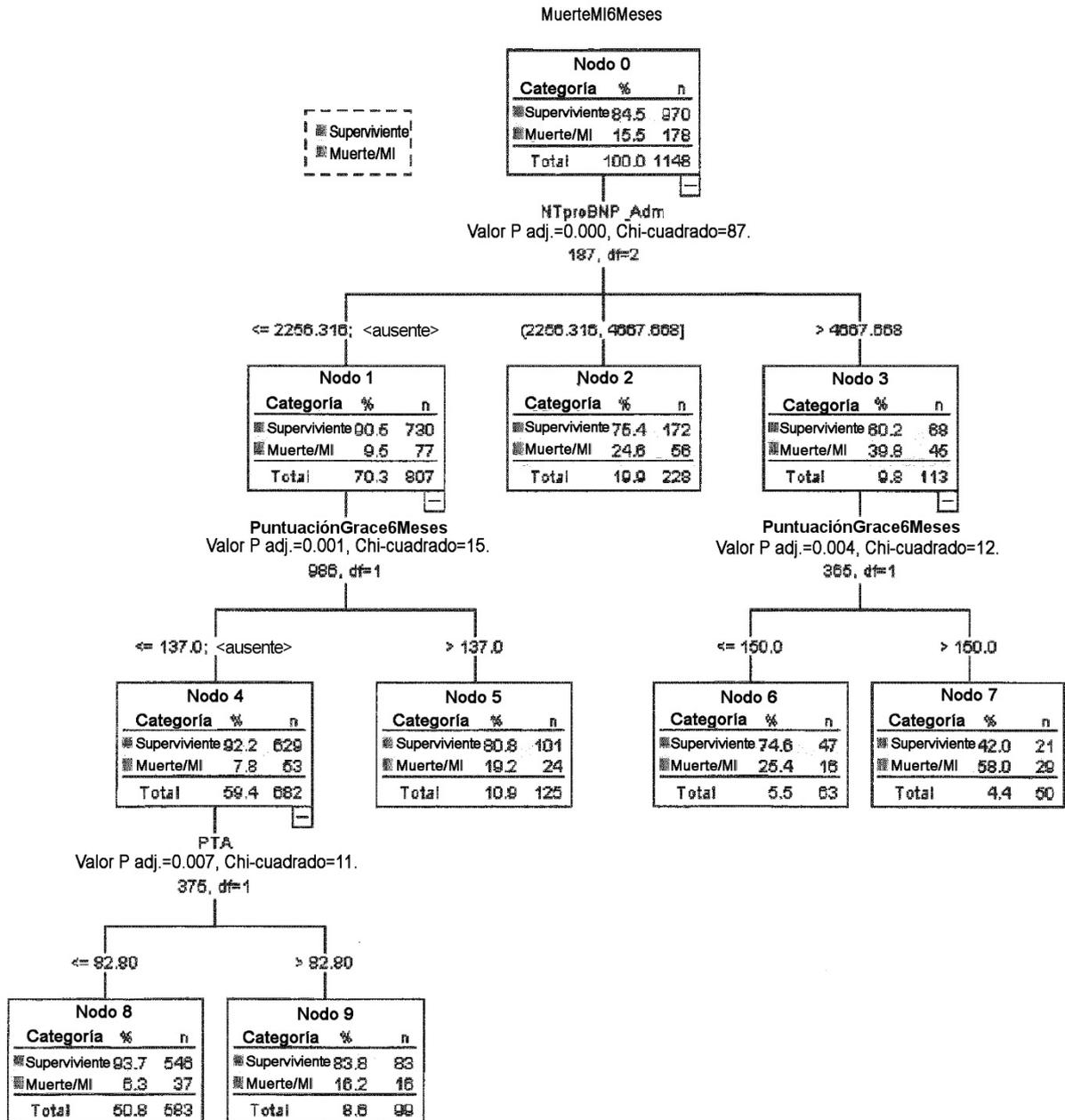


Fig. 5

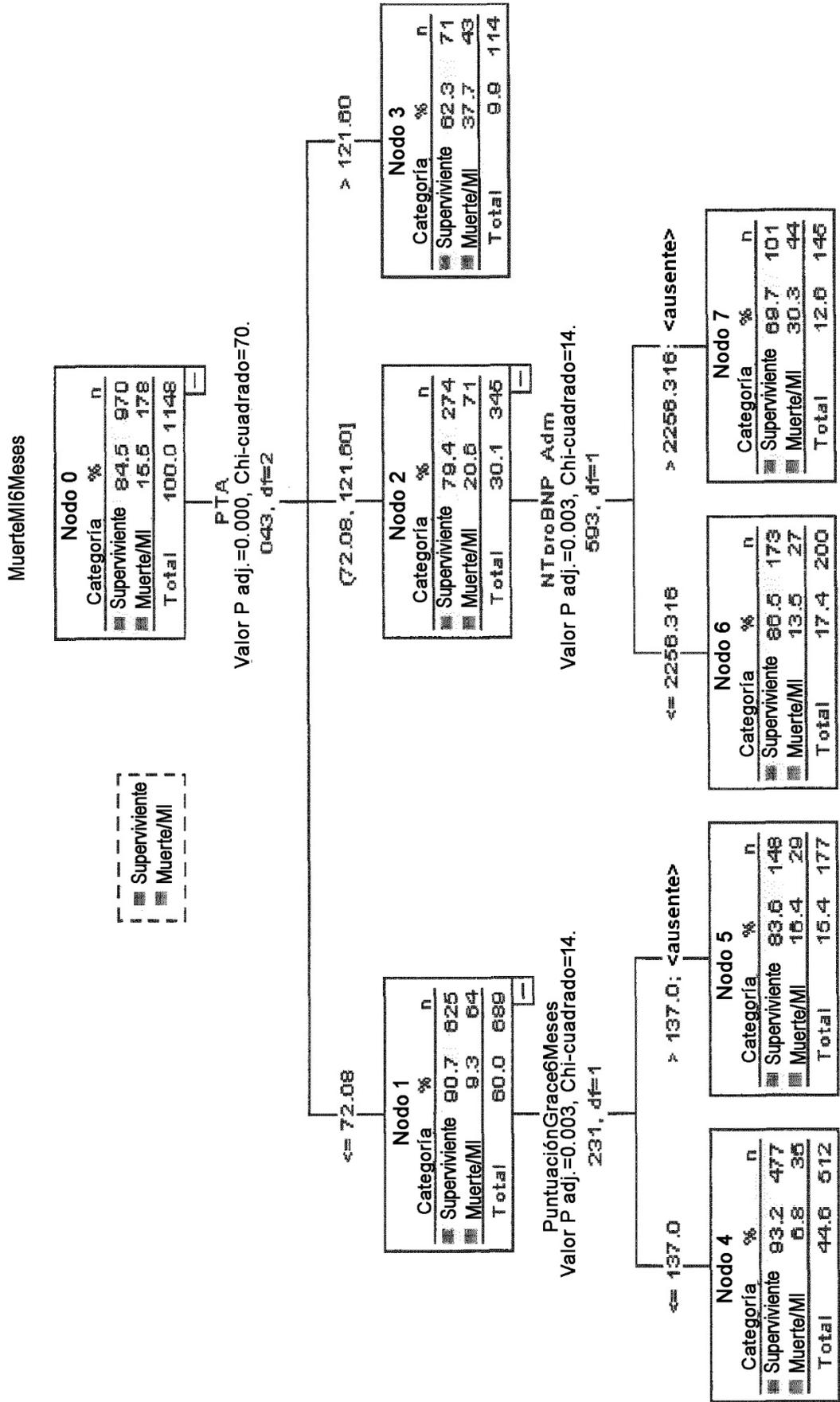


Fig. 6

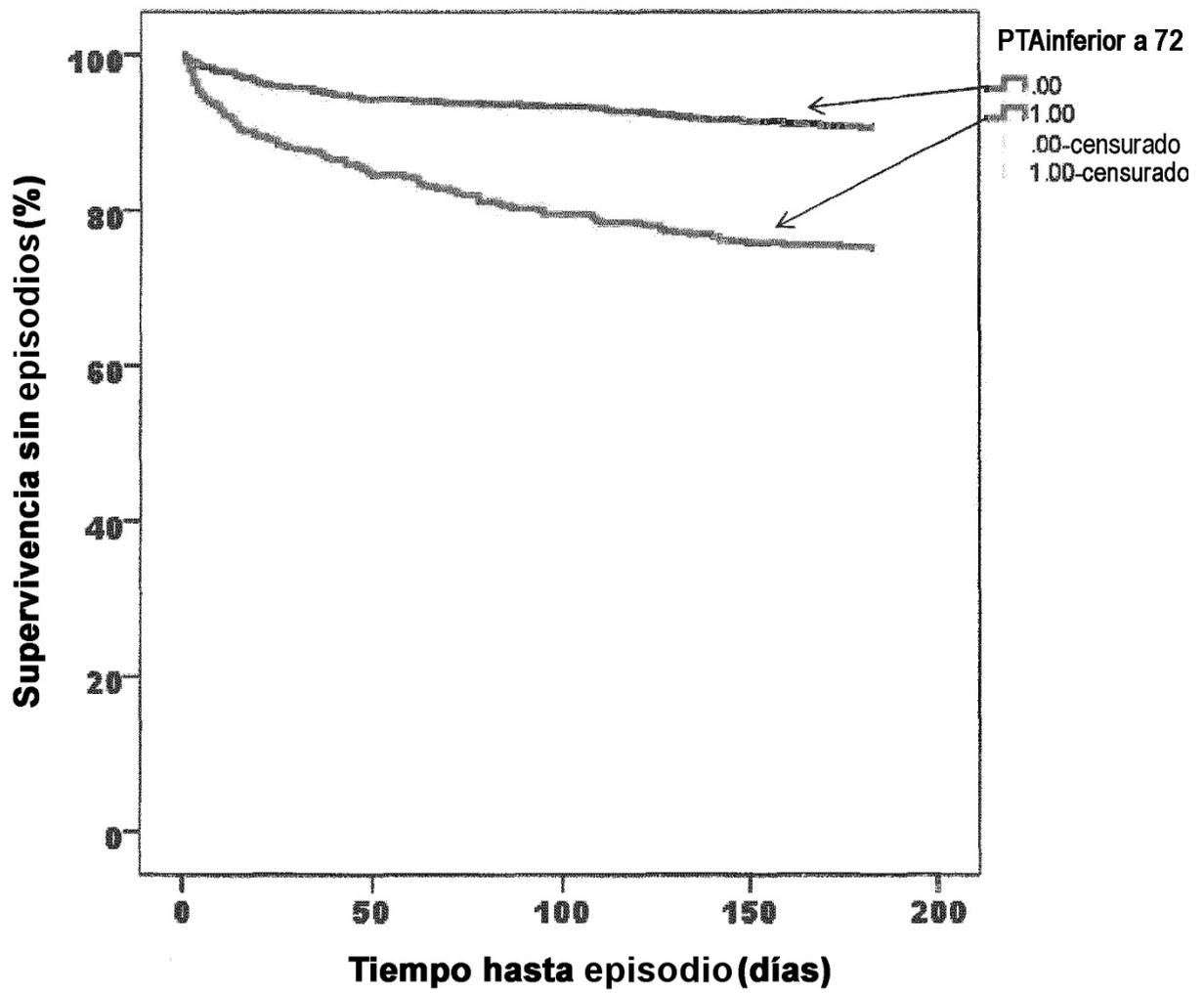


Fig. 7

