

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 003**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2009 PCT/EP2009/007301**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010 WO10040564**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2009 E 09736845 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 2353011**

54 Título: **Biomarcador para la predicción de los primeros eventos adversos**

30 Prioridad:

07.10.2008 EP 08166038

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

20.11.2020

73 Titular/es:

**B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS;
STRUCK, JOACHIM;
MELANDER, OLLE;
NEWTON-CHEH, CHRISTOPHER y
WANG, THOMAS J**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 795 003 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

Biomarcador para la predicción de los primeros eventos adversos

5 La presente invención se refiere a la predicción de un primer acontecimiento adverso en sujetos sanos, ensayos de diagnóstico y sus usos como se define en las reivindicaciones.

10 La prevención cardiovascular eficaz se basa en la identificación precisa de individuos en riesgo, pero los eventos cardiovasculares ocurren con frecuencia en individuos con una carga baja de factores de riesgo tradicionales (Khot UN, y otros: Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. JAMA. 2003;290: 898-904). Como resultado, el uso potencial de biomarcadores circulantes para aumentar la evaluación de riesgos convencional ha atraído una atención creciente en los últimos años. Sin embargo, estudios anteriores han llegado a conclusiones divergentes con respecto a la utilidad de los biomarcadores para la predicción del riesgo cardiovascular. Algunos informes indican que biomarcadores como la proteína C reactiva (CPR) y el péptido natriurético de tipo pro-B N-terminal (NT-proBNP) ayudan a la predicción de riesgo (Ridker PM, y otros: Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. JAMA. 2007;297: 611-619; Zethelius B, y otros: Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. N Engl J Med. 2008;358:2107-2116), mientras que otros estudios concluyen que dichos biomarcadores aportan relativamente poca información incremental (Folsom AR, y otros: An assessment of incremental coronary risk prediction using C-reactive protein and other novel risk markers: the atherosclerosis risk in communities study. Arch Intern Med. 2006;166: 1368-1373; Wang TJ, y otros: Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. N Engl J Med. 2006;355: 2631-2639).

25 Varios factores influyen en qué medida los biomarcadores predicen los resultados, lo que incluye a la población estudiada y a los biomarcadores específicos seleccionados. Los estudios que se enfocan en poblaciones de ancianos o de alto riesgo frecuentemente ofrecen estimaciones favorables del rendimiento de los biomarcadores (Zethelius B, y otros: Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. N Engl J Med. 2008;358:2107-2116; Blankenberg S, y otros: Comparative impact of multiple biomarkers and N-Terminal pro-brain natriuretic peptide in the context of conventional risk factors for the prediction of recurrent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study; Circulation, 2006; 114:201-208), pero la mayor necesidad de nuevos marcadores de riesgo existe en poblaciones de riesgo bajo a intermedio, para las cuales los datos son más contradictorios (de Lemos JA, Lloyd-Jones DM: Multiple biomarker panels for cardiovascular risk assessment. N Engl J Med. 2008; 358:2172-2174). Con respecto a los criterios estadísticos para evaluar nuevos biomarcadores, se acepta ampliamente que las medidas de asociación básicas, como las relaciones de riesgos o las relaciones de probabilidades, son insuficientes para evaluar la utilidad pronóstica, pero existe un debate sobre qué medidas usar (Cook NR.: Use and misuse of the receiver operating characteristic curve in risk prediction. Circulation. 2007;115: 928-935). Las métricas más recientes evalúan en qué medida los biomarcadores asignan a los pacientes a las categorías de riesgo clínico (Ridker PM, et al.: Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. JAMA. 2007; 297:611-619; Pencina MJ, y otros: Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. Stat Med. 2008; 27:157-172), pero solo unos pocos estudios han incorporado dichas métricas (Zethelius B, y otros: Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. N Engl J Med. 2008;358: 2107-2116). Otra consideración importante es la selección de biomarcadores. Aunque varios biomarcadores predicen consistentemente los eventos cardiovasculares después del ajuste para factores de riesgo tradicionales (Vasan RS.: Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. Circulation; 2006; 113:2335-2362), pocos estudios de prevención primaria han incorporado múltiples biomarcadores informativos simultáneamente, un enfoque que tiene la mayor posibilidad de proporcionar información incremental (de Lemos JA, Lloyd-Jones DM: Multiple biomarker panels for cardiovascular risk assessment. N Engl J Med. 2008; 358:2172-2174).

50 El péptido Adrenomedulina (ADM) se describió por primera vez en 1993 (Kitamura y otros (1993), Biochem. Biophys. Res. Commun. 192:553-560) como un péptido hipotensor novedoso que comprende 52 aminoácidos, que se habían aislado de un feocromocitoma humano. En el mismo año, también se describió la codificación de ADNc para un péptido precursor que comprende 185 aminoácidos y la secuencia de aminoácidos completa de este péptido precursor (Kitamura y otros (1993), Biochem. Biophys. Res. Commun. 194:720-725). El péptido precursor, que comprende, entre otros, una secuencia señal de 21 aminoácidos en el extremo N, se refiere como "pre-pro-Adrenomedulina" (pre-pro-ADM).

55 El péptido ADM comprende los aminoácidos del 95 al 146 de pre-pro-ADM, a partir del cual se forma por escisión proteolítica. Algunos fragmentos peptídicos de los formados en la escisión del pre-proADM se han caracterizado en detalle, en particular los péptidos fisiológicamente activos adrenomedulina (ADM) y "PAMP", un péptido que comprende 20 aminoácidos (22-41) que siguen a los 21 aminoácidos del péptido señal en pre-Pro-ADM. Otro fragmento de función desconocida y alta estabilidad ex vivo es la proAdrenomedulina de la región media (MR-proADM) (Struck y otros (2004), Peptides 25(8):1369-72), para lo cual se ha desarrollado un método de cuantificación confiable (Morgenthaler y otros (2005), Clin. Chem. 51(10):1823-9).

65 El descubrimiento y caracterización de la ADM en 1993 desencadenó una actividad de investigación intensa y una avalancha de publicaciones, cuyos resultados se han resumido recientemente en varios artículos de revisión, en el contexto de la presente descripción, se hace referencia en particular a los artículos encontrados en un número de "Peptides" dedicado a la ADM (Peptides 22 (2001)), en particular (Takahashi (2001), Peptides 22, 1691 y Eto (2001),

Peptides 22, 1693-1711). El tema se revisa además en Hinson y otros (Hinson y otros (2000), *Endocr. Rev.* 21 (2), 138-167). La ADM puede considerarse como un péptido regulador polifuncional. Se libera a la circulación en una forma inactiva extendida por una glicina en el extremo C-terminal (Kitamura y otros (1998), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (2), 551-555).

5

La ADM es un vasodilatador efectivo. El efecto hipotensor se ha asociado particularmente con segmentos peptídicos en la parte C-terminal de la ADM. Las secuencias peptídicas del extremo N de la ADM, por otro lado, exhiben efectos hipertensivos (Kitamura y otros (2001), *Peptides* 22, 1713-1718).

10

El documento DE 102006052916 A1 describe un método de diagnóstico y estratificación de riesgo de diabetes mellitus que se basa en pro-adrenomedulina de la región media (MR-proADM). El marcador de diagnóstico CT-proADM y sus usos en la estratificación del riesgo de enfermedades que incluyen el sistema cardiovascular se describe en el documento DE 102006060112 A1. Además, el documento DE 102006034142 A1 describe métodos para controlar la terapia de pacientes que padecen insuficiencia cardíaca mediante la determinación de valores umbrales de péptidos vasoactivos in vitro. Morgenthaler y otros, (2005), *Clinical Chemistry*, Vol. 51(10), 1823-1829, describe un ensayo inmunoluminométrico tipo sándwich para la MR-proADM. Se detectaron concentraciones aumentadas de la MR-proADM en pacientes con sepsis y con enfermedades cardiovasculares. Christ-Crain y otros, (2005), *Critical Care*, Vol. 9(6), R816-R824 informa sobre la MR-proADM como marcador pronóstico en la sepsis. Gegenhuber y otros, (2007), *J. Cardial Failure*, Vol. 13(1), 42-49, informa sobre el papel del péptido natriurético de tipo B, el péptido natriurético de tipo pro-A de la región media, la pro-adrenomedulina de la región media y la copeptina para predecir la mortalidad en 1 año en pacientes con insuficiencia cardíaca desestabilizada aguda. Además, Kitamura y otros, (2002), *Microscopy Research and Technique*, Vol. 57(1), 3-13, describe las funciones fisiológicas y patológicas de la adrenomedulina (AM) y el péptido proadrenomedulina N-terminal 20 (PAMP) en enfermedades cardiovasculares.

15

20

25

El objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de obtener un primer acontecimiento adverso en un sujeto sano o identificar a un sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener un primer acontecimiento adverso, que comprende:

30

- determinar el nivel de Pro-Adrenomedulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de esta seleccionado del grupo que consiste en PAMP que es la SEQ ID NO: 3, MR-proADM que es la SEQ ID NO: 4 y ADM que es la SEQ ID NO: 5 en una muestra obtenida de dicho sujeto; y
- usar dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o el fragmento de esta para la predicción del primer acontecimiento adverso o para la deducción a partir de este de un riesgo de obtener el primer acontecimiento adverso,

35

en donde el uso de dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o el fragmento de esta comprende la comparación de dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o el fragmento de esta a un nivel de umbral predeterminado donde el percentil es 75, 90, 95 o 99 de una población normal, de manera que, cuando dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o el fragmento de esta excede dicho nivel umbral predeterminado, se predice el primer acontecimiento adverso en el sujeto sano o se identifica al sujeto sano que tiene un riesgo aumentado de obtener el primer acontecimiento adverso y

40

en donde dicho primer acontecimiento adverso es un acontecimiento coronario o cardiovascular, en donde el acontecimiento coronario se define como síndromes coronarios agudos letales o no letales que incluyen infarto del miocardio, o muerte debido a una enfermedad cardíaca isquémica, en donde el acontecimiento cardiovascular se define como síndromes coronarios agudos letales o no letales, que incluyen el infarto del miocardio, accidente cerebrovascular letal o no letal, o la muerte por enfermedad cardiovascular, y en donde el sujeto sano es un sujeto que no ha tenido previamente un acontecimiento cardiovascular o coronario y que no tiene una enfermedad infecciosa aguda y que no padece de diabetes y/o hipertensión y

45

en donde dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma.

50

En un aspecto, este acontecimiento adverso puede ser el primero que se haya diagnosticado para este sujeto. En un caso, un primer acontecimiento puede ser, por ejemplo, un acontecimiento coronario, lo que significa que este sujeto nunca ha tenido anteriormente un acontecimiento coronario. En un aspecto como se define en las reivindicaciones, se predice el riesgo de tener un primer acontecimiento adverso y se identifica a un sujeto que tiene un riesgo avanzado de tener un primer acontecimiento adverso.

55

En el contexto de la presente descripción, el término "Pro-Adrenomedulina" y el término "Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta" se refieren a la molécula completa de Pro-Adrenomedulina o a fragmentos de esta seleccionados del grupo que consiste en PAMP que se representa en la SEQ ID NO: 3, MR-proADM que se representa en la SEQ ID NO: 4 y ADM que se representa en la SEQ ID NO: 5. La Pro-Adrenomedulina se refiere a la molécula completa de Pro-Adrenomedulina o los fragmentos de esta descritos anteriormente con la excepción de la Adrenomedulina madura. La Pro-Adrenomedulina se refiere a la molécula completa de Pro-Adrenomedulina o a los fragmentos de esta descritos anteriormente con la excepción de la Adrenomedulina madura o fragmentos de la Adrenomedulina madura. Por lo tanto, en un aspecto "determinar el nivel de Pro-Adrenomedulina o los fragmentos de esta descritos anteriormente" se refiere a determinar el nivel de Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta, en donde no se determina el nivel de Adrenomedulina madura y/o fragmentos de Adrenomedulina madura.

60

65

La secuencia de aminoácidos del péptido precursor de la Adrenomedulina (pre-pro-Adrenomedulina) se brinda en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). La Pro-Adrenomedulina se relaciona a los residuos de aminoácidos 22 a 185 de la secuencia de pre-pro-Adrenomedulina. La secuencia de aminoácidos de pro-Adrenomedulina (pro-ADM) se brinda en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2). El péptido pro-ADM N-terminal 20 (PAMP) se relaciona con los residuos de aminoácidos 22-41 de pre-pro-ADM. La secuencia de aminoácidos de PAMP se brinda en la Figura 3 (SEQ ID NO: 3). MR-pro-Adrenomedullin (MR-pro-ADM) se relaciona con los residuos de aminoácidos 45-92 de pre-pro-ADM. La secuencia de aminoácidos de MR-pro-ADM se brinda en la Figura 4 (SEQ ID NO: 4). La secuencia de aminoácidos de Adrenomedulina madura (ADM) se brinda en la Figura 5 (SEQ ID NO: 5).

Como se menciona en la presente memoria en el contexto de proteínas o péptidos, el término "fragmento" se refiere a proteínas o péptidos más pequeños que pueden derivarse de proteínas o péptidos más grandes, que por lo tanto comprenden una secuencia parcial de la proteína o péptido más grande. Dichos fragmentos pueden derivarse de las proteínas o péptidos más grandes por saponificación de uno o más de sus enlaces peptídicos y se seleccionan del grupo que consiste en PAMP que se representa en la SEQ ID NO: 3, MR-proADM que se representa en la SEQ ID NO: 4 y ADM que se representa en la SEQ ID NO: 5.

Además, el término "nivel" en expresiones como "nivel de una proteasa", "nivel de analito" y expresiones similares, se refiere a la cantidad de la entidad molecular mencionada en el contexto respectivo, o en el caso de enzimas también puede referirse a la actividad enzimática.

Un acontecimiento adverso se define como un acontecimiento que compromete la salud de un individuo. Dicho acontecimiento adverso puede seleccionarse del grupo que comprende un acontecimiento coronario, un acontecimiento cardiovascular, la muerte, la insuficiencia cardíaca y la hipertensión. El término "diabetes" en el contexto de esta descripción es diabetes mellitus a menos que se indique lo contrario. Se describe la diabetes mellitus tipo 1 o la diabetes mellitus tipo 2. Como se define en las reivindicaciones, el primer acontecimiento adverso es un primer acontecimiento coronario o un primer acontecimiento cardiovascular, en donde el sujeto sano es un sujeto que no ha tenido anteriormente un acontecimiento cardiovascular o coronario y que no tiene una enfermedad infecciosa aguda y no padece de diabetes y/o hipertensión.

Los eventos coronarios se definen como síndromes coronarios agudos letales o no letales, que incluye el infarto del miocardio o la muerte por cardiopatía isquémica.

Los eventos cardiovasculares se definen como síndromes coronarios agudos letales o no letales que incluyen el infarto del miocardio, accidente cerebrovascular letal o no letal o muerte debido a enfermedad cardiovascular.

Como se define en las reivindicaciones, el método es para predecir un primer acontecimiento adverso en un sujeto sano o identificar a un sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener un primer acontecimiento adverso, en donde dicho acontecimiento adverso es un acontecimiento coronario o cardiovascular tal como un acontecimiento coronario.

Dicho sujeto sano es un sujeto con una baja carga de factores de riesgo tradicionales seleccionados del grupo que comprende: tabaquismo (definido como fumar en el último año), diabetes, hiperlipidemia, hipertensión, alto índice de masa corporal (BMI) (es decir, preferentemente dicho sujeto tiene un BMI inferior a 30, preferentemente inferior a 28, más preferentemente inferior a 27, incluso más preferentemente inferior a 26 y lo más preferentemente inferior a 25), género masculino, tratamiento antihipertensivo y edad (el riesgo aumenta con la edad; preferentemente dicho sujeto tiene una edad por debajo de 55, preferentemente por debajo de 60, más preferentemente por debajo de 65, incluso más preferentemente por debajo de 70 y lo más preferentemente por debajo de 75).

"Sano" o "aparentemente sano", como se usa en la presente memoria, se relaciona con individuos que no han tenido previamente o alternativamente no son conscientes de haber tenido un acontecimiento cardiovascular o coronario o insuficiencia cardíaca, y que no tienen una enfermedad infecciosa aguda. Sano o aparentemente sano se refiere a individuos que no han tenido previamente un acontecimiento cardiovascular o coronario o insuficiencia cardíaca, y que no tienen una enfermedad infecciosa aguda.

Por lo tanto, como se define en las reivindicaciones, el sujeto "sano" o "aparentemente sano" es un sujeto que no ha tenido previamente o alternativamente no es consciente de haber tenido un acontecimiento cardiovascular o coronario. Se describe además que el sujeto "sano" o "aparentemente sano" no padece de diabetes, y/o de hipertensión.

El sujeto aparentemente sano no muestra ningún síntoma de ninguna enfermedad.

En un aspecto, el acontecimiento adverso es un acontecimiento coronario y el sujeto "sano" o "aparentemente sano" puede padecer de hiperlipidemia. En otro aspecto, el acontecimiento adverso es un acontecimiento cardiovascular y el sujeto "sano" o "aparentemente sano" puede padecer de hiperlipidemia.

En otro aspecto más, el acontecimiento adverso es un infarto del miocardio y el sujeto "sano" o "aparentemente sano" padece de hiperlipidemia. En un aspecto adicional, el acontecimiento adverso es un infarto del miocardio y el sujeto "sano" o "aparentemente sano" no muestra ningún síntoma de ninguna enfermedad.

En aún otro aspecto, el acontecimiento adverso es la muerte debida a una cardiopatía isquémica y el sujeto "sano" o "aparentemente sano" padece de hiperlipidemia. En un aspecto adicional, el acontecimiento adverso es la cardiopatía isquémica y el sujeto "sano" o "aparentemente sano" no muestra ningún síntoma de ninguna enfermedad.

5 Sin embargo, en general, en caso de que el sujeto "sano" o "aparentemente sano" padezca de una enfermedad particular, el primer acontecimiento adverso de acuerdo con la presente invención y como se define en la presente memoria no puede ser esta enfermedad particular.

10 De acuerdo con esta descripción, los subgrupos de sujetos sanos y aparentemente sanos son el mismo subgrupo de sujetos, ya que una persona aparentemente sana es una persona que aún no ha sido diagnosticada como que tiene o ha tenido un acontecimiento o afección que comprende la salud de dicho sujeto, lo que significa que una persona aparentemente sana es una persona que se considera sana.

15 En un aspecto del método de la invención como se define en las reivindicaciones, se determina el nivel de Pro-Adrenomedulina o un fragmento de esta seleccionado del grupo que consiste en PAMP que es la SEQ ID NO: 3, MR-proADM que es la SEQ ID NO: 4 y ADM que es la SEQ ID NO: 5 y se usa como un marcador único.

20 En otro aspecto de la invención, la predicción de un primer acontecimiento adverso en un sujeto o la identificación de un sujeto que tiene un mayor riesgo de tener un primer acontecimiento adverso se mejora mediante la determinación y el uso adicional de un parámetro de laboratorio seleccionado del grupo que consiste en: CRP, LpLA2, Cistatina C, ANP, proANP, NT-proANP, MR-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP, triglicéridos, colesterol HDL o subfracciones de este, colesterol LDL o subfracciones de este, GDF15, ST2, Procalcitonina, Pro-Vasopresina que incluye copeptina, vasopresina y neurofina, Pro-Endotelina-1, CT-proET-1, NT-proET-1, Endotelina-1 grande y Endotelina-1.

25 Como se menciona en la presente memoria en el contexto de CRP, LpLA2, Cistatina C, ANP, BNP, proANP, NT-proANP, MR-proANP, proBNP, NT-proBNP, GDF15, ST2, Procalcitonina, Pro-Vasopresina que incluye copeptina, vasopresina y neurofina, Pro-Endotelina-1, CT-proET-1, NT-proET-1, Endotelina-1 grande y Endotelina-1, estos términos se refieren a la molécula completa.

30 El término "adicionalmente mediante la determinación" no implica, aunque no excluye, que dichas determinaciones se combinen técnicamente. El término "adicionalmente mediante el uso" se define como cualquier tipo de combinación matemática de parámetros, ya sean parámetros de laboratorio y/o clínicos, que brindan una descripción del riesgo de un sujeto de experimentar un acontecimiento adverso o que identifican a un sujeto que tiene un mayor riesgo de tener un acontecimiento adverso. Un ejemplo de tal combinación matemática es el análisis de riesgos proporcionales de Cox, del cual se puede derivar el riesgo de un sujeto de experimentar un acontecimiento adverso, pero también se pueden usar otros métodos.

35 Se describe que el nivel de marcador para el individuo debe compararse con un valor predeterminado. El valor predeterminado puede tomar una variedad de formas. Puede ser un valor de corte único, como por ejemplo una mediana o media o el percentil 75, 90, 95 o 99 de una población. Se puede establecer sobre la base de grupos comparativos, tal como cuando el riesgo en un grupo definido es el doble del riesgo en otro grupo definido. Puede ser un rango, por ejemplo, donde la población analizada se divide en partes iguales (o desiguales) en grupos, tal como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio y un grupo de alto riesgo, o en cuantiles, donde el cuartil más bajo son individuos con el menor riesgo y el cuartil más alto son individuos con el mayor riesgo.

40 El valor predeterminado puede variar entre poblaciones particulares seleccionadas, en dependencia de sus hábitos, origen étnico, genética, etc. Por ejemplo, una población "sana" o "aparentemente sana", no fumadora (sin enfermedad detectable y sin antecedente de un trastorno cardiovascular) podría tener un rango "normal" diferente de marcadores que una población fumadora o una población cuyos miembros hayan tenido un trastorno cardiovascular previo. En consecuencia, los valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría en la que cae un individuo. Los rangos y categorías apropiados se pueden seleccionar solo con la experimentación de rutina por parte de los expertos en la materia.

45 El nivel del marcador mencionado anteriormente se puede obtener por cualquier método reconocido en la técnica. Típicamente, el nivel se determina mediante la medición del nivel o la actividad del marcador en un fluido corporal, por ejemplo, sangre, linfa o saliva. El nivel puede determinarse mediante inmunoensayos u otras técnicas convencionales para determinar el nivel del marcador. Los métodos reconocidos incluyen enviar muestras del fluido corporal de un paciente a un laboratorio comercial para su medición, pero también realizar la medición en el punto de atención.

50 Una combinación específica de marcadores parece ser especialmente valiosa para predecir un acontecimiento adverso en un sujeto o identificar a un sujeto que tiene un mayor riesgo de tener un acontecimiento adverso.

55 Por lo tanto, en un aspecto de la invención como se define en las reivindicaciones, solo se determina y se usa el nivel del siguiente marcador: proBNP, CRP o LpLA2 en combinación con Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta. Esta combinación específica parece ser especialmente valiosa en donde se predice un primer acontecimiento cardiovascular en un sujeto o se identifica un sujeto que tiene un mayor riesgo de tener un primer evento cardiovascular.

Alternativamente o adicionalmente, los niveles determinados de Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta pueden combinarse con parámetros clínicos. Por lo tanto, en otra modalidad preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, la predicción de un primer acontecimiento adverso en un sujeto sano o la identificación de un sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener un primer acontecimiento adverso se mejora mediante la determinación y el uso de parámetros clínicos, además de Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta, seleccionados del grupo: edad, género, tratamiento antihipertensivo, índice de masa corporal y tabaquismo actual.

Además, la predicción de un acontecimiento adverso en un sujeto sano o la identificación de un sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener un acontecimiento adverso se mejora mediante la determinación y el uso de parámetros clínicos y de laboratorio, por ejemplo, un biomarcador, además de Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta, seleccionado de los grupos antes mencionados.

En otro aspecto del método de acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, solo se determina y se usa el nivel del siguiente marcador: proBNP en combinación con Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta. Esta combinación específica parece ser especialmente valiosa en donde se predice un acontecimiento coronario en un sujeto o se identifica un sujeto que tiene un mayor riesgo de tener un acontecimiento coronario, especialmente un primer acontecimiento coronario.

El uso de dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta puede comprender comparar dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta con un nivel umbral, de manera que, cuando dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta excede dicho nivel umbral, se predice un acontecimiento cardiovascular o un primer acontecimiento cardiovascular en un sujeto o se identifica un sujeto que tiene un mayor riesgo de tener un (primer) acontecimiento adverso.

Dicho nivel de umbral se puede obtener, por ejemplo, de un análisis de Kaplan-Meier (Figura 6), donde la aparición de eventos coronarios a lo largo del tiempo en la población investigada se representa de acuerdo con los cuartiles MR-proADM de la población. De acuerdo con este análisis, los sujetos con niveles de MR-proADM por encima del percentil 75, que está por encima de 0,52 nmol/l en la población investigada, tienen un riesgo significativamente aumentado de tener un primer acontecimiento coronario adverso. Este resultado está respaldado además por el análisis de regresión de Cox con ajuste completo para los factores de riesgo clásicos: El cuartil MR-proADM más alto (todos los sujetos con niveles de MR-proADM superiores a 0,52 nmol/l) contra todos los demás sujetos se asocia muy significativamente con un mayor riesgo (HR = 1,6 CI 95 % 1,2-2,2) de tener un primer acontecimiento adverso coronario.

Otros valores de corte son, por ejemplo, el percentil 90, 95 o 99 de una población normal. Mediante el uso de un percentil más alto que el percentil 75, se reduce la cantidad de sujetos falsos positivos identificados, pero se puede fallar al identificar a los sujetos, que están en riesgo moderado, aunque aún alto. Por lo tanto, se podría adoptar el valor de corte en dependencia de si se considera más apropiado identificar a la mayoría de los sujetos en riesgo a expensas de identificar también "falsos positivos", o si se considera más apropiado identificar principalmente a los sujetos con alto riesgo a expensas de perder varios sujetos con riesgo moderado.

Otras posibilidades matemáticas para calcular el riesgo de un individuo mediante el uso del valor de MR-proADM del individuo y otros parámetros de laboratorio y clínicos de pronóstico son, por ejemplo, el NRI (Índice de reclasificación neta) o el IDI (Índice de discriminación integrado). Los índices pueden calcularse de acuerdo con Pencina (Pencina MJ, y otros: Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. Stat Med. 2008; 27:157-172).

En pocas palabras, el NRI (Índice de reclasificación neta) (se basa en las clases de riesgo de CVD de acuerdo con el algoritmo de riesgo ATPIII, < 10, 10 -< 20 y 20 + % de riesgo a 10 años) calcula si, mediante la adición de, por ejemplo, MR-proADM al modelo de los factores de riesgo clásicos, se mueve un número significativo de sujetos que de hecho tuvieron un acontecimiento a una clase de mayor riesgo y los sujetos que no tuvieron un acontecimiento a una clase de menor riesgo. El IDI (Índice de discriminación integrado), hace algo similar, pero ignora los límites de riesgo < 10, 10 -< 20 y 20 + % a 10 años y en su lugar calcula el "movimiento integrado total", es decir, la adición de MR-proADM mueve a los sujetos que tuvieron un acontecimiento hacia arriba en una escala de riesgo continua y a los sujetos que no tuvieron un acontecimiento hacia abajo en la escala de riesgo continua.

El NRI tiene relevancia clínica, ya que cruzar el "límite mágico" del 20 % significa que el paciente debe ser tratado como un paciente preventivo secundario y por lo tanto, significa algo para el tratamiento (de acuerdo con las pautas de prevención de cardiología).

Además, se describe un método para predecir el riesgo de tener un acontecimiento adverso en un sujeto sano o identificar a un sujeto que tiene un mayor riesgo de tener un acontecimiento adverso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el nivel de Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta están seleccionados del grupo de secuencias representadas en las secs. con núms. de ident.: 3, 4 y 5, ya sea solo o junto con otros parámetros de laboratorio o clínicos útiles para el pronóstico, se usa para predecir el riesgo de un sujeto sano de tener un acontecimiento adverso mediante un método que puede seleccionarse entre las siguientes alternativas:

Comparación con la mediana del nivel de Pro-Adrenomedulina o los fragmentos de esta mencionados anteriormente en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",
 Comparación con un cuantil (por ejemplo, el percentil 75, 90, 95 o 99) del nivel de Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos aparentemente sanos,
 5 Cálculo basado en el análisis de riesgos proporcionales de Cox o mediante el uso de cálculos del índice de riesgo como el NRI (Índice de reclasificación neta) o el IDI (Índice de discriminación integrado).

Dicha muestra se selecciona de un grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma, o un extracto de cualquiera de las muestras mencionadas anteriormente.

En otro aspecto como se define en las reivindicaciones, se mide el nivel de MR-proADM. MR-proADM comprende los aminoácidos 45-92 de Pre-Pro-ADM.

En otro aspecto de la invención como se define en las reivindicaciones, el nivel de Pro-Adrenomedulina se mide mediante el uso de un ensayo de diagnóstico mediante el uso de una o más sondas de captura dirigidas contra uno o más epítomos ubicados en las posiciones de aminoácidos 45-92 de Pre-pro-ADM.

Como se menciona en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo de diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Dicho ensayo puede estar basado en la unión de un analito a detectar a una o más sondas de captura con una cierta afinidad. Con respecto a la interacción entre las moléculas de captura y moléculas objetivo o moléculas de interés, la constante de afinidad es preferentemente mayor que 10^8 M^{-1} .

En el contexto de la descripción, "moléculas de captura" son moléculas que pueden usarse para unir moléculas objetivo o moléculas de interés, es decir, analitos, de una muestra. Las moléculas de captura deben, por lo tanto, tener una forma adecuada, tanto espacialmente como en términos de características de la superficie, tales como carga superficial, hidrofobicidad, hidrofiliidad, presencia o ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para unir específicamente las moléculas objetivo o moléculas de interés. Por este medio, la unión puede estar mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, van-der-Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrofóbicas o de enlaces de hidrógeno o una combinación de dos o más de las interacciones mencionadas anteriormente entre las moléculas de captura y las moléculas objetivo o moléculas de interés. Las moléculas de captura se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de PNA, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glicoproteína. Las moléculas de captura pueden ser anticuerpos, que incluyen fragmentos de estos con suficiente afinidad a un objetivo o molécula de interés, y que incluyen anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpos recombinantes, así como derivados modificados química y/o bioquímicamente de dichos anticuerpos o fragmentos derivados de la cadena variante con una longitud de al menos 12 aminoácidos de esta.

Los métodos de detección pueden comprender inmunoensayos en varios formatos, como por ejemplo, radioinmunoensayos, inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), matrices de perlas basadas en Luminex, ensayos de micromatrices de proteínas y formatos de pruebas rápidas como por ejemplo pruebas de tiras inmunocromatográficas. Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos tipo sándwich competitivos y no competitivos. El ensayo puede estar en la forma de un ensayo tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en donde la molécula a detectar y/o cuantificar está unida a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede unirse a una fase sólida, por ejemplo, una perla, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que está marcado, por ejemplo, con un pigmento, con un radioisótopo, o un resto reactivo o catalíticamente activo. La cantidad de anticuerpo marcado unido al analito se mide entonces mediante un método apropiado. La composición general y los procedimientos involucrados con los "ensayos tipo sándwich" están bien establecidos y son conocidos por el experto en la técnica. (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª edición (mayo 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C y otros, Curr Opin Chem Biol. 2006 feb;10(1):4-10. PMID: 16376134).

El ensayo puede comprender dos moléculas de captura, preferentemente anticuerpos que ambos estén presentes como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en donde un primer componente de marcado se une a la primera molécula de captura, en donde dicho primer componente de marcado es parte de un sistema de marcado basado en la desactivación o amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia, y un segundo componente de marcado de dicho sistema de marcado se une a la segunda molécula de captura, de manera que tras la unión de ambas moléculas de captura al analito se genera una señal medible que permite la detección de los complejos tipo sándwich formados en la disolución que comprende la muestra.

Además, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierra rara o quelatos de tierra rara en combinación con un pigmento de fluorescencia o un pigmento de quimioluminiscencia, en particular un pigmento del tipo cianina.

Los ensayos basados en fluorescencia pueden comprender el uso de pigmentos, que pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que comprende FAM (5 o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, pigmentos de cianina, tales como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetodifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G (RG6),

rodamina, verde rodamina, rojo rodamina, rodamina 110, pigmentos BODIPY, como BODIPY TMR, verde Oregon, coumarinas como umbeliferona, bencimidias, como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como rojo Texas, amarillo Yakima, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, pigmentos de acridinio, pigmentos carbazol, pigmentos de fenoxazina, pigmentos porfirina, pigmentos de polimetina y similares.

Los ensayos basados en quimioluminiscencia pueden comprender el uso de pigmentos, basados en los principios físicos descritos para materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4ª edición, editor ejecutivo, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol. 15, páginas 518-562, que incluyen las citas en las páginas 551-562. Los pigmentos quimioluminiscentes preferidos son ésteres de acridinio.

En un aspecto, se usa un ensayo MR-proADM que tiene un límite de detección por debajo de 0,3 nmol/l y una precisión entre ensayos de < 30 % CV en el rango normal para predecir un primer acontecimiento adverso en un sujeto sano o identificar un sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener un primer acontecimiento adverso.

Además, se describe el uso de una sonda de captura, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra la Pro-Adrenomedulina o fragmentos de esta para predecir un primer acontecimiento adverso en un sujeto sano o identificar a un sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener un primer acontecimiento adverso.

Se describe el uso de uno o más anticuerpos que se dirigen contra un epítipo incluido en las posiciones de aminoácidos 45-92 de Pre-ProADM.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos resumen la presente invención en mayor detalle, pero no se entenderá que limitan el objeto de la presente invención. Los ejemplos que no caen en el objeto de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la presente invención.

Métodos

Población de estudio

El estudio Malmo Diet and Cancer (MDC) es una cohorte epidemiológica prospectiva basada en la comunidad de 28 449 personas inscritas entre 1991 y 1996. De esta cohorte, 6103 personas se seleccionaron al azar para participar en la Cohorte Cardiovascular MDC, que se diseñó para investigar la epidemiología de la aterosclerosis. Los datos completos sobre factores de riesgo cardiovascular y biomarcadores plasmáticos estaban disponibles para 4707 sujetos. Después de excluir a los participantes con enfermedad cardiovascular prevalente al inicio del estudio, hubo 4601 participantes en el análisis de eventos coronarios y 4483 participantes en el análisis de todos los eventos cardiovasculares.

Examen clínico y ensayos

Todos los participantes se sometieron a una historia clínica, un examen físico y una evaluación de laboratorio de los factores de riesgo cardiovascular estándar. La presión sanguínea se midió mediante el uso de un esfigmomanómetro de mercurio después de 10 minutos de descanso en la posición supina. La diabetes mellitus se definió como un nivel de glucosa en sangre en ayunas superior a 6,0 mmol/l, un diagnóstico médico autoinformado de diabetes o el uso de medicamentos antidiabéticos. La información de tabaquismo se obtuvo mediante un cuestionario autoadministrado, donde el tabaquismo actual se definió como cualquier consumo de tabaco en el último año. Medimos el colesterol total en ayunas, el colesterol HDL y los triglicéridos de acuerdo con los procedimientos estándar de Department of Clinical Chemistry, University Hospital Malmo. El colesterol LDL se calculó de acuerdo con la fórmula de Friedewald.

Todos los participantes tuvieron evaluación de biomarcadores cardiovasculares mediante el uso de muestras de plasma en ayunas que se habían congelado a -80 °C inmediatamente después de la recolección. La proteína C reactiva se midió mediante un ensayo de alta sensibilidad (Tina-quant CRP, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). La actividad de LpPLA2 se midió por duplicado mediante el uso del factor activador de plaquetas[3H] como sustrato (Persson M, y otros: Elevated Lp-PLA2 levels add prognostic information to the metabolic syndrome on incidence of cardiovascular events among middle-aged nondiabetic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27: 1411-1416). MR-proANP y MR-proADM se midieron mediante el uso de ensayos de tipo sándwich inmunoluminométricos dirigidos contra aminoácidos en las regiones intermedias del péptido respectivo (BRAHMS, AG, Alemania) (Morgenthaler NG, y otros: Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chem.* 2004;50: 234-236; Morgenthaler NG, y otros: Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem.* 2005;51: 1823-1829). NT-proBNP se determinó mediante el uso de Dimension RxL N-BNP (Dade-Behring, Alemania) (Di SF, y otros: Analytical evaluation of the Dade Behring Dimension RxL automated N-Terminal proBNP (NT-proBNP) method and comparison with the Roche Elecsys 2010. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43: 1263-1273). La cistatina C se midió mediante el uso de un ensayo inmunonefelométrico mejorado con partículas (N Latex Cystatin C, Dade Behring, IL) (Shlipak MG, y otros: Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons. *N Engl J Med.* 2005;352: 2049-2060).

Resultados clínicos

Examinamos dos resultados primarios: eventos coronarios y todos los eventos cardiovasculares. El procedimiento para determinar los resultados de eventos se ha detallado previamente (Rosvall M, y otros: Incident coronary events and case fatality in relation to common carotid intima-media thickness. *J Intern Med.* 2005;257: 430-437; Rosvall M, y otros: Incidence of stroke is related to carotid IMT even in the absence of plaque. *Atherosclerosis.* 2005;179: 325-331). Los eventos coronarios se definieron como síndromes coronarios agudos letales o no letales, que incluye el infarto del miocardio, o la muerte debido a cardiopatía isquémica. Todos los eventos cardiovasculares se definieron como síndromes coronarios agudos letales o no letales que incluyen el infarto del miocardio, el accidente cerebrovascular letal o no letal o la muerte debido a enfermedad cardiovascular. Los eventos se identificaron mediante el enlace del número de identificación personal de 10 dígitos de cada ciudadano sueco con dos registros: el Registro de alta hospitalaria de Suecia y el Registro de causa de muerte de Suecia. El infarto del miocardio se definió sobre la base de la *International Classification of Diseases 9ª* y *10ª* revisiones (ICD9 e ICD10) códigos 410 y 121, respectivamente. La muerte por cardiopatía isquémica se definió sobre la base de los códigos 412 y 414 (ICD9) o 122-123 y 125 (ICD10) en el Registro de Causas de Muerte de Suecia. El derrame cerebral letal o no letal mediante el uso de los códigos 430, 431 y 434 (ICD9). La clasificación de los resultados mediante el uso de estos registros se ha validado previamente (Engstrom G, y otros: Geographic distribution of stroke incidence within an urban population: relations to socioeconomic circumstances and prevalence of cardiovascular risk factors. *Stroke.* 2001;32: 1098-1103). El seguimiento de los resultados se extendió hasta el 31 de diciembre de 2003.

Análisis estadísticos

Las variables de biomarcadores continuos con distribuciones asimétricas se transformaron logarítmicamente antes del análisis. Realizamos modelos de riesgos proporcionales de Cox multivariantes para examinar la asociación entre los biomarcadores y los eventos incidentes. Confirmamos que se cumplió el supuesto de proporcionalidad de riesgos. Las relaciones de riesgos se expresaron por incremento de 1 SD en el biomarcador respectivo. Cada biomarcador se evaluó individualmente contra cada resultado con ajuste para los factores de riesgo tradicionales (edad, sexo, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, uso de terapia antihipertensiva, tabaquismo actual, diabetes, colesterol LDL, colesterol HDL e índice de masa corporal). A continuación, todos los biomarcadores que muestran una relación significativa con el resultado se incluyeron en un modelo de eliminación regresiva, con los factores de riesgo tradicionales forzados. $P < 0,05$ se usó como criterio para retener los biomarcadores en este modelo.

Para evaluar la discriminación del modelo, calculamos la estadística c para modelos con factores de riesgo tradicionales con y sin biomarcadores. El estadístico c es una generalización del área bajo la curva ROC (receiver-operating-characteristic) (Pencina MJ, y otros: Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med.* 2008; 27:157-172). Usamos la incidencia de eventos coronarios o cardiovasculares a los 10 años como resultado. Para evaluar la calibración global de los modelos de riesgo, calculamos las estadísticas de Hosmer-Lemeshow para modelos con y sin biomarcadores. Los valores de p no significativos para la estadística de Hosmer-Lemeshow denotan buena correspondencia entre las tasas de eventos esperadas y observadas en los deciles de riesgo esperado.

También evaluamos la capacidad de los biomarcadores para reclasificar el riesgo en las categorías de riesgo del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATP3), se siguieron los métodos sugeridos previamente (Ridker PM, y otros: Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. *JAMA.* 2007;297: 611-619; Pencina MJ, y otros: Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med.* 2008; 27:157-172). Basado en un puntaje de factor de riesgo tradicional, los participantes se clasificaron inicialmente como de riesgo bajo, intermedio o alto si su riesgo esperado a 10 años de un acontecimiento coronario era $< 10\%$, $10\% < 20\%$ o $\geq 20\%$, respectivamente. A los participantes se les permitió después ser reclasificados en diferentes categorías con la adición de los datos de biomarcadores. Evaluamos el número de participantes reclasificados, y también calculamos el Índice de Reclasificación Neta (NRI) y el Índice de Discriminación Integrada (IDI), según lo descrito por (Pencina MJ, y otros: Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med.* 2008; 27:157-172). En el cálculo del NRI, los individuos se consideraron reclasificados con precisión si se reclasificaron a una categoría superior y posteriormente desarrollaron un acontecimiento coronario, o si se reclasificaron a una categoría inferior y se mantuvieron libres de acontecimiento durante el seguimiento. El IDI es una medida análoga del desempeño del modelo, que mejora cuando el modelo de riesgo asigna mayores probabilidades a quienes desarrollan eventos y menores probabilidades a quienes permanecen libres de eventos. A diferencia del NRI, el IDI se basa en probabilidades continuas y, por lo tanto, la mejora en el índice no depende del movimiento a través de los umbrales de las categorías de riesgo.

Todos los análisis se realizaron mediante el uso del programa Stata versión 8.0 (StataCorp), excepto para las pruebas para la suposición de proporcionalidad de riesgos que se realizaron mediante el uso del paquete de supervivencia para R y las estadísticas c que se generaron mediante el uso del paquete ROCR para R (www.r-project.org). Las pruebas se consideraron significativas si el valor P de dos lados era inferior a 0,05.

Resultados

Las características de la muestra de estudio se muestran en la **Tabla 1**. La edad media de la muestra fue de 58 años.

Predicción de eventos cardiovasculares mediante el uso de biomarcadores únicos

5 Durante un seguimiento medio de 10,6 años, se produjeron los primeros eventos cardiovasculares y coronarios en 288 y 169 participantes, respectivamente. Los resultados de los modelos de riesgos proporcionales de Cox para la asociación de biomarcadores individuales con eventos cardiovasculares se muestran en la **Tabla 2**. Después del ajuste para factores de riesgo tradicionales, 5 de 6 biomarcadores (NT-proBNP, CRP, cistatina C, MR-proADM, LpPLA2) fueron predictores significativos de eventos cardiovasculares incidentes.

10

Se usaron varias métricas para resumir la utilidad pronóstica de adicionar biomarcadores individuales a los factores de riesgo clásicos (**Tabla 2**). Un modelo basado en factores de riesgo clásicos tenía una estadística c de 0,772, y la adición de biomarcadores individuales dio como resultado pequeños aumentos en la estadística c ($< 0,005$). Los modelos se calibraron bien, con valores de p de Hosmer-Lemeshow $> 0,05$ independientemente de que se incluyeran o no biomarcadores. Ni el NRI ni el IDI fueron significativos para todos los biomarcadores.

15

Predicción de eventos coronarios mediante el uso de biomarcadores únicos

20 Los resultados de los modelos de riesgos proporcionales de Cox para eventos coronarios se muestran en la **Tabla 3**. Cuando se ingresaron individualmente en un modelo con factores de riesgo clásicos, 4 de los 6 biomarcadores (NT-proBNP, MR-proANP, cistatina C, MR-proADM) fueron predictores significativos de eventos coronarios incidentes. Los aumentos en NT-proBNP y MR-proADM se asociaron con los riesgos más altos para eventos coronarios, con ratios de riesgos ajustados por incremento de SD de 1,24 (intervalo de confianza del 95 %, 1,07-1,44) y 1,25 (intervalo de confianza del 95 %, 1,10-1,42), respectivamente.

25

La estadística c asociada con los factores de riesgo clásicos para predecir eventos coronarios fue de 0,777. Al igual que con los eventos cardiovasculares, la adición de biomarcadores individuales no aumentó sustancialmente la estadística c (**Tabla 3**). La calibración del modelo fue buena (Hosmer-Lemeshow $p > 0,05$) con o sin biomarcadores, y el NRI no fue significativo. El IDI fue significativo para MR-proADM ($p = 0,02$) y límite significativo para NT-proBNP ($p = 0,05$).

30

Biomarcadores múltiples para eventos cardiovasculares y coronarios

35 Las combinaciones de biomarcadores se evaluaron tras ingresar los biomarcadores como un conjunto en modelos de predicción para eventos cardiovasculares y eventos coronarios. La eliminación regresiva paso a paso se usó para eliminar biomarcadores menos informativos, mediante el uso de $p < 0,05$ como criterio de retención. Se retuvieron tres biomarcadores para la predicción de eventos cardiovasculares (NT-proBNP, CRP y LpPLA2), y 2 biomarcadores para la predicción de eventos coronarios (NT-proBNP y MR-proADM). Los resultados de los modelos de riesgos proporcionales de Cox multivariantes se muestran en la **Tabla 4**, para ambos resultados. La incorporación del conjunto de biomarcadores significativos en los modelos de predicción de eventos cardiovasculares y coronarios condujo a pequeños incrementos (aproximadamente 0,01) en las estadísticas c. El NRI no fue significativo para ninguno de los resultados. Por otro lado, el IDI tuvo valores de p de 0,06 para los eventos cardiovasculares y 0,02 para los eventos coronarios.

40

La **Tabla 5** muestra el número de participantes reclasificados mediante el uso de biomarcadores para eventos cardiovasculares (**Panel A**) y eventos coronarios (**Panel B**), respectivamente. Para los eventos cardiovasculares, el uso de biomarcadores movió a 273 participantes (6%) a una categoría de mayor o menor riesgo. Solo 39 participantes (0,8 %) se movieron a la categoría de alto riesgo (riesgo esperado a 10 años ≥ 20 %). Para los eventos coronarios, 137 (3 %) participantes se reclasificaron en una categoría de mayor o menor riesgo, con solo 22 (0,5 %) movidos a la categoría de alto riesgo.

45

50 Se construyeron puntajes de riesgo de biomarcadores simples para cada resultado. Los coeficientes beta para los 3 biomarcadores que predicen eventos cardiovasculares fueron similares en magnitud, al igual que los coeficientes beta para los 2 biomarcadores que predicen eventos coronarios. Por lo tanto, elegimos ponderar cada uno de los biomarcadores por igual en los puntajes de riesgo de biomarcadores. Para la enfermedad cardiovascular, a cada participante se le asignó un puntaje de 0, 1, 2 o 3, correspondiente al número de biomarcadores que se elevaron, definido como tener un nivel de más de 1 SD por encima de la media. De manera similar, a cada participante se le asignó un puntaje de 0, 1 o 2 para eventos coronarios. La **Figura 6** representa la incidencia acumulada de eventos cardiovasculares (**Panel A**) o coronarios (**Panel B**), de acuerdo con los valores de los puntajes de riesgo de biomarcadores.

55

60

65

Tabla 1: Características de la muestra de estudio (n = 4601)

Variable clínica		
5	Edad, años	58 ± 6
	Género masculino, %	40
	Presión arterial sistólica, mm Hg	141 ± 19
	Presión arterial diastólica, mm Hg	87 ± 9
10	Tratamiento antihipertensivo, %	16
	Índice de masa corporal, kg/m ²	25,7 ± 3,9
	Colesterol LDL, mmol/l	4,2 ± 1,0
	Colesterol HDL, mmol/L	1,4 ± 0,4
15	Diabetes mellitus, %	8
	Tabaquismo actual, %	27
	MR-proADM, nmol/l	0,46 ± 0,13
	MR-proANP, pmol/l	66 (51-86)
20	NT-proBNP, pg/ml	61 (34-110)
	Cistatina C, mg/l	0,78 ± 0,15
	CRP, mg/l	1,3 (0,7-2,7)
25	Actividad de LpPLA2, nmol/min/ml	44 (36-52)

Los datos normalmente distribuidos se dan como media ± SD, las variables asimétricas se dan como mediana (IQR).

Tabla 2: Biomarcadores individuales y eventos cardiovasculares incidentes (n = 4481)

Biomarcador	HR ajustado	CI 95 %	P	ΔC*	P _{NRI} †	P _{IDI} †	
30	NT-proBNP	1,18	(1,05-1,33)	0,007	0,004	0,21	0,06
	MR-proADM	1,14	(1,02-1,27)	0,01	0,004	0,91	0,19
	MR-proANP	1,12	(0,99-1,26)	0,06	0,001	0,78	0,26
35	Cistatina C	1,12	(1,02-1,24)	0,01	0,004	0,52	0,44
	LpPLA2	1,14	(1,005-1,30)	0,04	0,003	0,68	0,51
	CRP	1,19	(1,05-1,34)	0,005	0,004	0,92	0,43

40 Todas las relaciones de riesgos se expresan por incremento de SD en la concentración del biomarcador. Los modelos de riesgos proporcionales de Cox multivariados se ajustaron para la edad, sexo, tratamiento antihipertensivo, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, índice de masa corporal, diabetes, LDL, HDL y tabaquismo actual. *Incremento en la estadística C en un modelo con factores de riesgo clásicos y el biomarcador, en comparación con los factores de riesgo clásicos solos (C = 0,772). † Valor de P para el aumento del índice de reclasificación neta (NRI) o el índice de discriminación integrado (IDI) en un modelo con factores de riesgo clásicos y el biomarcador, en comparación con los factores de riesgo clásicos solos. CI, intervalo de confianza; HR, relación de riesgos.

Tabla 3: Biomarcadores individuales y eventos coronarios incidentes (n=4601)

Biomarcador	HR ajustado	CI 95 %	P	ΔC*	P _{NRI} †	P _{IDI} †	
50	NT-proBNP	1,24	(1,07-1,44)	0,005	0,004	0,70	0,05
	MR-proADM	1,25	(1,10-1,42)	< 0,001	0,005	0,43	0,02
	MR-proANP	1,21	(1,04-1,41)	0,01	0,0001	0,42	0,12
55	Cistatina C	1,15	(1,05-1,28)	0,005	0,004	0,55	0,30
	LpPLA2	1,07	(0,91-1,26)	0,31	NA	NA	NA
	CRP	1,12	(0,96-1,31)	0,17	NA	NA	NA

60 Todas las relaciones de riesgos se expresan por incremento de SD en la concentración del biomarcador. Los modelos de riesgos proporcionales de Cox multivariados se ajustaron para la edad, sexo, tratamiento antihipertensivo, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, índice de masa corporal, diabetes, LDL, HDL y tabaquismo actual. *Incremento en la estadística C en un modelo con factores de riesgo clásicos y el biomarcador, en comparación con los factores de riesgo clásicos solos (C = 0,777). † Valor de P para el aumento del Índice de clasificación neta (NRI) o el índice de discriminación

integrado (IDI) en un modelo con factores de riesgo clásicos y el biomarcador, en comparación con los factores de riesgo clásicos solos. CI, intervalo de confianza; HR, cociente de riesgos; NA, no analizado.

Tabla 4: Biomarcadores múltiples y eventos cardiovasculares y coronarios incidentes

	Biomarcadores retenidos por eliminación regresiva	HR ajustado	CI 95 %	P	ΔC^*	$P_{NRI}\dagger$	$P_{IDI}\dagger$
	Primeros eventos						
	NT-proBNP	1,16	(1,03-1,30)	0,017			
	CRP	1,18	(1,03-1,33)	0,008	0,008	0,13	0,06
	LpPLA2	1,15	(1,01-1,30)	0,03			
	Primeros eventos coronarios						
	NT-proBNP	1,19	(1,02-1,38)	0,03			
	MR-proADM	1,21	(1,06-1,38)	0,004	0,009	0,28	0,02

Todas las relaciones de riesgos se expresan por incremento de SD en la concentración del biomarcador. Los modelos de riesgos proporcionales de Cox multivariantes se ajustaron para la edad, sexo, tratamiento antihipertensivo, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, índice de masa corporal, diabetes, LDL, HDL y tabaquismo actual. Para cada resultado, todos los biomarcadores mostrados se ingresaron juntos en el modelo de Cox. * Incremento en la estadística C en un modelo con factores de riesgo clásicos y el conjunto de biomarcadores. † Valor de P para el aumento en el Índice de Clasificación Neta (NRI) o el índice de discriminación integrado (IDI) en un modelo con factores de riesgo clásicos y el conjunto de biomarcadores, en comparación con los factores de riesgo clásicos solos. CI, intervalo de confianza; HR, relación de riesgos.

Tabla 5: Reclasificación de participantes con la adición de biomarcadores a los factores de riesgo cardiovascular tradicionales

Panel A: Eventos cardiovasculares				
Modelo con factores de riesgo tradicionales solos	Modelo con factores de riesgo tradicionales y biomarcadores			
	< 10 %	10 % a < 20 %	≥ 20 %	Total
< 10 %	3728	103	1	3832
10 % a < 20 %	99	344	38	481
≥ 20 %	0	32	138	170
Total	3827	479	177	4483
Panel B: Eventos coronarios				
Modelo con factores de riesgo tradicionales solos	Modelo con factores de riesgo tradicionales y biomarcadores			
	< 10 %	10 % a < 20 %	≥ 20 %	Total
< 10 %	4265	52	0	4317
10 % a < 20 %	52	165	22	239
≥ 20 %	0	11	34	45
Total	4317	228	56	4601

Descripción de los dibujos

Figura 1: Secuencia de aminoácidos del péptido precursor de adrenomedulina (ADM) (pre-pro-ADM). Los aminoácidos 1-21 forman un péptido señal. Los aminoácidos 22-41 forman el péptido pro-ADM N-terminal 20 (pro-ADM N20)). Los aminoácidos 45-92 forman el péptido MR-proADM. La ADM madura comprende los aminoácidos 95-146. Los aminoácidos 148-185 forman el fragmento C-terminal pro-ADM.

Figura 2: Secuencia de aminoácidos del péptido pro-adrenomedulina (pro-ADM).

Figura 3: Secuencia de aminoácidos del péptido pro-ADM N-terminal 20 (pro-ADM N20; PAMP). El péptido PAMP puede tener un extremo C-terminal amidado.

Figura 4: Secuencia de aminoácidos de la MR pro-adrenomedulina (MR-pro-ADM).

Figura 5: Secuencia de aminoácidos del péptido de adrenomedulina maduro (ADM). El péptido ADM puede tener un extremo C-terminal amidado y/o puede estar glicosilado.

Figura 6: Gráfico de Kaplan-Meier para los eventos coronarios de la población investigada agrupada en cuartiles de MR-proADM.

Listado de secuencias

<110> BRAHMS AKTIENGESELLSCHAFT

<120> Biomarcador para la predicción de los primeros eventos adversos

<130> B60403PCT

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 185

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe
 1          5          10          15
Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys
 20          25          30
Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met
 35          40          45
Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala
 50          55          60
Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro
 65          70          75          80
Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg
 85          90          95
Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe
 100          105          110
Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr
 115          120          125
Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln
 130          135          140
Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly
 145          150          155          160
Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro
 165          170          175
Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu
 180          185
    
```

ES 2 795 003 T3

<210> 2
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys Trp
 1 5 10 15

10

Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met Ser Ser Ser Tyr Pro
 20 25 30

15

Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile Arg
 35 40 45

20

Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro Glu Asp Ser Ser Pro
 50 55 60

25

Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn
 65 70 75 80

Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val
 85 90 95

30

Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp
 100 105 110

Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr Gly Arg Arg
 115 120 125

35

Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly Arg Thr Leu Val Ser
 130 135 140

Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro Pro Ser Gly Ser Ala
 145 150 155 160

40

Pro His Phe Leu

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

<400> 3

Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys Trp
 1 5 10 15

55

Ala Leu Ser Arg
 20

<210> 4
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60

<400> 4

65

ES 2 795 003 T3

5 Glu Leu Arg Met Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys
 1 5 10 15
 Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala
 20 25 30
 Ser Arg Ser Pro Glu Asp Ser Ser
 35 40
 10 <210> 5
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 5
 Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
 1 5 10 15
 20 Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
 20 25 30
 25 Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
 35 40 45
 30 Pro Gln Gly Tyr
 50

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir el riesgo de tener un primer evento adverso en un sujeto sano o identificar a un sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener un primer evento adverso que comprende:
 - determinar el nivel de Pro-Adrenomedulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de esta seleccionado del grupo que consiste en PAMP que es la SEQ ID NO: 3, MR-proADM que es la SEQ ID NO: 4 y ADM que es la SEQ ID NO: 5 en una muestra obtenida de dicho sujeto; y
 - usar dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o el fragmento de esta para la predicción del primer acontecimiento adverso o para la deducción a partir de este de un riesgo de obtener el primer acontecimiento adverso,

en donde el uso de dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o el fragmento de esta comprende la comparación de dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o el fragmento de esta con un nivel umbral predeterminado donde el percentil es 75, 90, 95 o 99 de una población normal, de manera que, cuando dicho nivel de Pro-Adrenomedulina o el fragmento de esta excede dicho nivel umbral predeterminado, se predice el primer evento adverso en el sujeto sano o se identifica el sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener el primer evento adverso y

en donde dicho primer evento adverso es un evento coronario o cardiovascular, en donde el evento coronario se define como síndromes coronarios agudos letales o no letales, que incluyen infarto del miocardio o muerte por cardiopatía isquémica, en donde el evento cardiovascular se define como síndromes coronarios agudos letales o no letales, que incluyen infarto del miocardio, accidente cerebrovascular letal o no letal, o muerte por enfermedad cardiovascular, y, en donde el sujeto sano es un sujeto que no ha tenido previamente un evento cardiovascular o coronario y que no tiene una enfermedad infecciosa aguda y que no padece de diabetes y/o hipertensión y

en donde dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el nivel de Pro-Adrenomedulina o un fragmento de esta seleccionado del grupo que consiste en PAMP que es la SEQ ID NO: 3, MR-proADM que es la SEQ ID NO: 4 y ADM que es la SEQ ID NO: 5 se determina y se usa como un marcador único.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la predicción del primer evento adverso en el sujeto sano o la identificación del sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener el primer evento adverso se mejora mediante la determinación y el uso adicional del nivel de al menos un marcador adicional seleccionado del grupo que consiste en: CRP, LpLA2, Cistatina C, ANP, proANP, NT-proANP, MR-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP, triglicéridos, colesterol HDL o sus subfracciones, colesterol LDL o sus subfracciones, GDF15, ST2, Procalcitonina, Pro-Vasopresina que incluye coceptina, vasopresina y neurofisina, Pro-Endotelina-1, CT-proET-1, NT-proET-1, Endotelina-1 grande y Endotelina-1.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde solo se determina y se usa el nivel del siguiente marcador: proBNP, CRP o LpLA2 en combinación con Pro-Adrenomedulina o un fragmento de esta seleccionado del grupo que consiste en PAMP que es la SEQ ID NO: 3, MR-proADM que es la SEQ ID NO: 4 y ADM que es la SEQ ID NO: 5.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde se predice el primer evento cardiovascular en el sujeto sano o se identifica el sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener el primer evento cardiovascular.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde solo se determina y se usa el nivel del siguiente marcador: proBNP en combinación con Pro-Adrenomedulina o un fragmento de esta seleccionado del grupo que consiste en PAMP que es la SEQ ID NO: 3, MR-proADM que es la SEQ ID NO: 4 y ADM que es la SEQ ID NO: 5.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde se predice el primer evento coronario en el sujeto sano o se identifica el sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener el primer evento coronario.
8. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en donde adicionalmente se determina al menos un parámetro clínico seleccionado del grupo que comprende: edad, género, tratamiento antihipertensivo, índice de masa corporal y tabaquismo actual.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el nivel de MR-proADM se mide mediante el uso de un ensayo diagnóstico que comprende una o más sondas de captura dirigidas contra uno o más epítomos ubicados en las posiciones de aminoácidos 45-92 de Pre-pro-ADM.
10. Uso de un ensayo MR-proADM en los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Uso de una sonda de captura dirigida contra Pro-Adrenomedulina o un fragmento de esta seleccionado del grupo que consiste en PAMP que es la SEQ ID NO: 3, MR-proADM que es la SEQ ID NO: 4 y ADM que es la SEQ ID NO: 5.

NO: 5 para predecir el primer evento adverso en el sujeto sano o identificar el sujeto sano que tiene un mayor riesgo de tener el primer evento adverso de acuerdo con los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o de acuerdo con el uso definido en la reivindicación 10.

- 5 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la sonda de captura se dirige contra uno o más epítomos ubicados en las posiciones de aminoácidos 45-92 de Pre-pro-ADM.

Figura 1

SEQ ID NO: 1 (secuencia de aminoácidos de pre-pro-ADM):

```
1      MKLVSVALMY LGSLAFLGAD TARLDVASEF RKKWKNWALS RGKRELRMSS
51     SYPTGLADV KAGPAQTLIRP QDMKGASRSP EDSSPDAARI RVKRYRQSMN
101    NFQGLRSFGC RFGTCTVQKL AHQIQFTDK  DKDNVAPRSK ISPOGYGRRR
151    RRSLEAGPG  RTLVSCKPQA HGAPAPPSGS APHFL
```

Figura 2

SEQ ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos de pro-ADM):

```
1      ARLDVASEFR KKWNKWALSR GKRELRMSSS YPTGLADVKA GPAQTLIRPQ
51     DMKGASRSPE DSSPDAARIR VKRYRQSMNN FQGLRSFGCR FGTCTVQKLA
101    HQIQFTDKD  KDNVAPRSKI SPQGYGRRRR RSLPEAGPGR TLVSSCKPAH
151    GAPAPPSGSA PHFL
```

Figura 3

SEQ ID NO: 3 (secuencia de aminoácidos de pro-ADM N20):

```
1      ARLDVASEFR KKWNKWALSR
```

Figura 4

SEQ ID NO: 4 (secuencia de aminoácidos de MR-pro-ADM):

```
1      ELRMSSSYPT GLADV KAGPA QTLIRPQDMK GASRSPEDSS
```

Figura 5

SEQ ID NO: 5 (secuencia de aminoácidos de ADM):

```
1      YRQSMNNFQG LRSFGCRFGT CTVQKLAHQI YQFTDKDKDN VAPRSKISPO
51     GY
```

Figura 6

