



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 155**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06120782 .5**
96 Fecha de presentación : **15.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1901072**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **Marcadores bioquímicos para el embolismo pulmonar agudo.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2010

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
124 Grenzacherstrasse
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Hess, Georg;**
Horsch, Andrea y
Zdunek, Dietmar

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 334 155 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

Marcadores bioquímicos para el embolismo pulmonar agudo.

5 La presente invención está relacionada con un método de diagnóstico y, en particular, con un método para diferenciar entre un embolismo pulmonar múltiple y único en un sujeto sospechoso de padecer de embolismo pulmonar agudo que comprende determinar la cantidad de NT-proBNP en una muestra de un sujeto sospechoso de padecer de embolismo pulmonar agudo y comparar dicha cantidad con una cantidad de referencia. Además, la presente invención también está relacionada con un método para diferenciar entre embolismo pulmonar crónico y agudo en un sujeto que
10 comprende determinar la cantidad de NT-proANP en un primer y segundo punto temporal y comparar las cantidades determinadas entre ellas. La presente invención también comprende el uso de dispositivos y equipos para llevar a cabo los métodos mencionados.

15 El embolismo pulmonar es un episodio médico que pone en peligro la vida, especialmente en su forma aguda. Los síntomas clínicos característicos del embolismo pulmonar agudo, normalmente, que tiene como resultado la hospitalización son falta de aliento aguda, condiciones similares al colapso y dolor en el pecho. El embolismo pulmonar está provocado por trombosis que a menudo sucede en las venas femorales. Además, la trombosis puede venir acompañada de otras enfermedades como los defectos genéticos en la cascada de coagulación de la sangre o enfermedades cancerígenas.

20 Como consecuencia de la trombosis, un trombo flotante puede entrar y ocluir la arteria pulmonar. El tamaño del émbolo determina la posición de la oclusión arterial. La oclusión de una arteria pulmonar resulta en una sobrecarga de volumen en el ventrículo derecho del corazón y, como consecuencia del mismo, a menudo un bajo soporte del lado izquierdo del corazón.

25 El embolismo pulmonar puede ocurrir como un episodio único acompañado por los síntomas clínicos agudos mencionados anteriormente que resultan, en particular en el caso de los pacientes de emergencia, en la hospitalización o puede resultar de múltiples pequeños embolismos pulmonares en los que tan solo el más reciente viene acompañado con dichos síntomas clínicos. Esta última condición se denomina “embolismo pulmonar múltiple” de ahora en adelante.

30 Una distinción fiable entre un embolismo pulmonar único y uno múltiple en base a los síntomas clínicos aparentes es imposible. No obstante, dicha distinción así como la identificación fiable de un episodio embólico pulmonar agudo es, en principio, necesario para poder seleccionar una terapia adecuada. Por ejemplo, un embolismo pulmonar único puede tratarse mediante fármacos de acción trombolítica mientras que un episodio agudo como resultado de un embolismo pulmonar múltiple puede necesitar de la eliminación del trombo mediante cirugía.

35 Así, el problema técnico subyacente a la presente invención puede verse como la provisión de medios y métodos para cumplir con las necesidades anteriormente mencionadas. El problema técnico se soluciona mediante las realizaciones descritas en las reivindicaciones y a continuación.

De acuerdo con esto, la presente invención está relacionada con un método para diferenciar entre un embolismo pulmonar múltiple y uno único en un sujeto sospechoso de padecer un embolismo pulmonar agudo que comprende

45 a) determinar la cantidad de NT-proBNP en una muestra de un sujeto sospechoso de padecer un embolismo pulmonar agudo; y

b) comparar la cantidad determinada en el paso a) con una cantidad de referencia, en la que una cantidad inferior a la cantidad de referencia es indicativa de un embolismo pulmonar único y una cantidad superior a la cantidad de
50 referencia es indicativa de un embolismo pulmonar múltiple.

El término “diferenciación” tal como se utiliza aquí significa distinguir entre un sujeto que padece de un embolismo pulmonar único o un embolismo pulmonar múltiple en el que los sujetos que padecen de dichas enfermedades muestran esencialmente los mismos síntomas clínicos, es decir, falta aguda de aliento, condiciones similares al colapso y/o dolor de pecho. Además, los sujetos pueden además mostrar una sobrecarga del volumen ventricular derecho del corazón y, como consecuencia del mismo, a menudo un bajo soporte del lado izquierdo del corazón. El término como se utiliza
55 aquí, preferiblemente, incluye el diagnóstico diferencial de cada enfermedad.

Diagnosticar tal como se utiliza aquí, se refiere a evaluar la probabilidad de acuerdo con el que un sujeto padezca
60 las enfermedades referidas en la presente especificación. Tal como deben entender los expertos en la materia, dicha evaluación no pretende normalmente corregir al 100% los sujetos a diagnosticar. El término, no obstante, requiere que una porción de sujetos estadísticamente significativa pueda diagnosticarse si padecen de dicha enfermedad (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). Si una porción es estadísticamente significativa puede determinarse sin dificultad por el experto en la materia utilizando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de los intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba de t de Student, prueba de Mann-Whitney etc. Los detalles se encuentra en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983. Los intervalos de confianza preferibles son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al
65 menos del 98% o al menos del 99%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, o 0,0001.

ES 2 334 155 T3

El diagnóstico de acuerdo con la presente invención también incluye la monitorización, confirmación, subclasificación y predicción de las enfermedades relevantes, síntomas de riesgo de los mismos. La monitorización se refiere a seguir el rastro de una enfermedad ya diagnosticada, o complicación, por ejemplo, analizar la progresión de la enfermedad o la influencia de un tratamiento particular en la progresión de una enfermedad o complicación. La confirmación se refiere al refuerzo o corroboración de un diagnóstico ya realizado utilizando otros indicadores o marcadores. La subclasificación se refiere a definir además un diagnóstico de acuerdo con diferentes subclases de enfermedades diagnosticadas, por ejemplo, definir de acuerdo con las formas medias y severas de la enfermedad. La predicción se refiere al pronóstico de una enfermedad o complicación antes de que sus síntomas o marcadores sean evidentes o se alteren significativamente.

El término “embolismo pulmonar único” tal como se utiliza aquí se refiere a una enfermedad o condición acompañada con los síntomas clínicos anteriormente mencionados de embolismo pulmonar, es decir, falta aguda de aliento, condiciones similares al colapso y/o dolor de pecho y, opcionalmente, sobrecarga del volumen ventricular derecho del corazón que puede estar acompañada por un bajo soporte del corazón izquierdo. El embolismo pulmonar único referido de acuerdo a la presente invención es el resultado de una oclusión arterial única.

De acuerdo con la presente invención, el término “embolismo pulmonar múltiple” se refiere a una enfermedad o condición que está acompañada por los mismos síntomas clínicos generales que los especificados para el embolismo pulmonar único anterior. No obstante, está provocado por episodios oclusivos múltiples en los que solo el episodio más reciente está acompañado por dichos síntomas clínicos aparentes o, en otras palabras, los episodios embólicos previos no han mostrado los síntomas anteriormente mencionados hasta un grado clínico relevante.

El término “sujeto” tal como se utiliza aquí se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y, más preferiblemente, humanos. No obstante, la presente invención abarca que el sujeto pueda, preferiblemente, presentar los anteriormente mencionados síntomas clínicos aparentes de un embolismo pulmonar múltiple y único, respectivamente.

Determinar la cantidad de un NT-proBNP o cualquier otro polipéptido referido aquí de acuerdo con la presente invención se refiere a medir la cantidad o concentración, preferiblemente semi-cuantitativamente o cuantitativamente. La medición puede realizarse directamente o indirectamente. La medición directa se refiere a la medición de la cantidad o concentración del polipéptido sobre la base de la señal que se obtiene del polipéptido en sí y la intensidad que se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presente en la muestra. Dicha señal - a menudo referida aquí como intensidad de señal - puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad específica física o química del polipéptido. La medición indirecta incluye la medición de una señal obtenida de un componente secundario (es decir, un componente que no es el polipéptido en sí) o un sistema biológico de lectura, por ejemplo, respuestas celulares medibles, ligandos, marcas, o productos de reacción enzimática.

De acuerdo con la presente invención, determinar la cantidad de polipéptido puede lograrse por todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos métodos comprenden dispositivo de inmunoensayo y métodos que pueden utilizar moléculas marcadas en varios ensayos en sándwich, de competición, o otros formatos. Dichos ensayos desarrollan una señal que es indicativa de la presencia o ausencia del polipéptido. Además, la fuerza de la señal puede, preferiblemente, correlacionarse directa o indirectamente (por ejemplo, inversamente proporcional) a la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Además los métodos adecuados comprenden medir una propiedad específica física o química del polipéptido como su masa molecular exacta o espectro de RMN. Dichos métodos comprenden, preferiblemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos como espectrómetros de masas, analizadores de RMN, o dispositivos de cromatografía. Además, los métodos incluyen métodos basados en microplacas de ELISA, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (disponibles por ejemplo en los analizadores Elecsys™), CBA (un ensayo enzimático de unión a Cobalto, disponible por ejemplo en los analizadores Roche-Hitachi™), y ensayos de aglutinación con látex (disponible por ejemplo en analizadores Roche-Hitachi™).

Preferiblemente, determinar la cantidad de un polipéptido comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula capaz de provocar una respuesta celular cuya intensidad es indicativa de la cantidad de péptido con el péptido por un periodo de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular.

Para medir las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade, preferiblemente, a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir a expresión medible de un gen marcador o la secreción de una sustancia, por ejemplo, un péptido, polipéptido, o molécula pequeña. La expresión o sustancia generará una intensidad de señal que se correlaciona con la cantidad de péptido.

También preferiblemente, determinar la cantidad de polipéptido comprende el paso de medir una intensidad de señal específica obtenible del polipéptido o una proteína pulmonar surfactante en la muestra.

Como se ha descrito antes, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada en una m/z variable específica para el polipéptido observado en el espectro de masas o un espectro de RMN específico del polipéptido.

Además, determinar la cantidad de un polipéptido, preferiblemente, comprende los pasos de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una intensidad de señal. La unión de acuerdo con la presente invención incluye la

unión covalente y la no covalente. Un ligando de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier compuesto, por ejemplo, un péptido, polipéptido, ácido nucleico, o molécula pequeña, que se une al polipéptido descrito aquí. Los ligandos preferibles incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos como receptores para el polipéptido y fragmentos de los mismos que comprenden los dominios de unión para los péptidos, y aptámeros, por ejemplo, aptámeros de ácido nucleico o de péptido. Los métodos para preparar dichos ligandos son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados se ofrece también por las casas comerciales. El experto en la materia está familiarizado con los métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos con gran afinidad o especificidad. Por ejemplo, las mutaciones aleatorias pueden introducirse en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Estos derivados pueden analizarse entonces por su unión de acuerdo con los procesos de cribado conocidos en la materia, por ejemplo, presentación de fagos. Los anticuerpos referidos aquí incluyen ambos anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos, como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unirse al antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos híbridos humanizados en los que las secuencias de aminoácido de un anticuerpo donante no humano que presenta una especificidad de antígeno deseada se combina con secuencias de un anticuerpo humano aceptor. Las secuencias donadoras incluirán normalmente al menos los residuos de aminoácidos de unión al antígeno del donador pero puede comprender otros residuos de aminoácidos estructuralmente y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donador también. Dichos híbridos pueden prepararse mediante varios métodos bien conocidos en la materia. Preferiblemente, el ligando o agente se une específicamente al polipéptido. La unión específica de acuerdo con la presente invención significa que el ligando o agente no se unirá sustancialmente a ("reacción cruzada" con) otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra a analizar. Preferiblemente, el polipéptido unido específicamente se unirá con al menos 3 veces más, más preferiblemente al menos 10 veces más y aún más preferiblemente al menos 50 veces con más afinidad que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede tolerarse, si puede distinguirse y medirse de forma inequívoca, por ejemplo, de acuerdo con su tamaño en un Western Blot, o mediante su mayor abundancia relativa en la muestra. La unión del ligando puede medirse mediante cualquier método conocido en la materia. Preferiblemente, dicho método es semi-cuantitativo o cuantitativo. Los métodos adecuados se describen a continuación. Primero, la unión de un ligando puede medirse directamente, por ejemplo, mediante RMN, espectrometría de masas o resonancia en plasmón de superficie. Segundo, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse el producto de la reacción enzimática (por ejemplo, la cantidad de una proteasa puede medirse midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo, en un Western Blot). Alternativamente, el ligando puede presentar propiedades enzimáticas en sí y el complejo ligando/polipéptido o el ligando que está unido mediante el polipéptido, respectivamente, puede estar en contacto con un sustrato adecuado que permite la detección mediante la generación de una intensidad de señal. Para la medición de los productos reacción enzimática, preferiblemente la cantidad de sustrato es saturante. El sustrato puede también marcarse con una marca detectable antes de la reacción. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato por un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para una cantidad detectable, preferiblemente medible, de producto a producir. En lugar de medir la cantidad de producto, puede medirse el tiempo necesario de aparición de una cantidad de producto determinada (por ejemplo, detectable). Tercero, el ligando puede acoplarse covalentemente o no covalentemente a una marca que permite la detección y medición del ligando. El marcaje se puede realizar mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcaje directamente (covalentemente o no covalentemente) al ligando. El marcaje indirecto implica la unión (covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. EL ligando secundario se unirá específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con un marcaje adecuado y/o ser la diana (receptor) de un ligando terciario que se une al ligando secundario. El uso de ligandos secundarios, terciarios o incluso de un orden superior se utiliza a menudo para aumentar la señal. Los ligandos secundarios y de orden superior adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios, y el sistema bien conocido de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato puede también "marcarse" con una o más marcas conocidas en la materia. Dichos marcajes pueden ser dianas de ligandos de orden superior. Los marcajes adecuados incluyen biotina, digoxigenina, His-Tag, Glutación-S-Transferasa, FLAG, GFP, myctag, hemaglutinina A (HA) del virus de la gripe, proteína de unión a maltosa, y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, el marcaje está preferiblemente en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Los marcajes adecuados son cualquier marcaje detectable mediante un método de detección apropiado. Los marcajes típicos incluyen partículas de oro, cuentas de látex, ésteres de acridano, luminol, rutenio, marcajes enzimáticamente activos, marcajes radioactivos, marcajes magnéticos ("por ejemplo, cuentas magnéticas", que incluye marcajes paramagnéticos y superparamagnéticos), y marcajes fluorescentes. Los marcajes enzimáticamente activos incluyen por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-Galactosidasa, Luciferasa, y derivados de los mismos. Lo sustratos adecuados para la detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametil-bencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponibles como solución de reserva recién preparada de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación adecuada de enzima-sustrato puede resultar en un producto de reacción de color, fluorescente o quimioluminescente, que puede medirse de acuerdo con los métodos conocidos en la materia (por ejemplo, utilizando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). Para medir la reacción enzimática, los criterios dados anteriormente se aplican de forma análoga. Los marcajes fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Texas Red, Fluoresceína, y los colorantes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Además los marcaje fluorescentes están disponibles por ejemplo, de Molecular Probes (Oregon). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcajes fluorescentes. Los marcajes radioactivos típicos incluyen 35S, 125I, 32P, 33P y similares. Un marcaje radioactivo puede detectarse mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo, una película sensible a la luz o una pantalla de fósforo. Los métodos de medición adecuados de acuerdo con la presente invención también incluye precipitación (particularmente inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electro-generada), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzima), ensayos inmuno-

zimáticos en sándwich, inmunoensayos electroquimioluminescentes en sándwich (ECLIA), fluoroinmunoensayo de disociación aumentada con lantánidos (DELFLIA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría aumentada por látex, inmunoensayos de fase sólida. Además los métodos conocidos en la materia (como la electroforesis en gel, electroforesis en gel 2D, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), Western Blotting, y espectrometría de masas), pueden utilizarse solos o en combinación con marcaje u otros métodos de detección como se ha descrito anteriormente.

Además preferiblemente, determinar la cantidad de un polipéptido comprende (a) contactar un soporte sólido que comprende un ligando del polipéptido como se ha especificado antes con una muestra que comprende el polipéptido y (b) medir la cantidad de polipéptido que está unido al soporte. El ligando, preferiblemente escogido de entre el grupo que consiste de ácido nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está preferiblemente presente en un soporte sólido en su forma inmovilizada. Los materiales para la elaboración de soportes sólidos son bien conocidos en la materia e incluye, entre otros, materiales en columna comercialmente disponibles, cuentas de poliestireno, cuentas de látex, cuentas magnéticas, partículas coloidales de metal, chips y superficies de vidrio y/o sílice, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitas, pocillos y paredes de tiras de reacción, tubos de plástico etc. El ligando o agente puede unirse a muchos transportadores diferentes. Ejemplos de transportadores bien conocidos incluye vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas, y magnetita. La naturaleza del transportador puede ser soluble o insoluble para el propósito de la invención. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, pero no se limitan a interacciones iónicas, hidrofóbicas, covalentes y similares. También se contempla el uso de "matriz en suspensión" como matrices de acuerdo con la presente invención (Nolan JP, Sklar LA. (2002). Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. Trends Biotechnol. 20(1):9-12). En dichas matrices en suspensión, el transportador, por ejemplo, una microcuenta o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consta de diferentes microcuentas o microesferas, posiblemente marcadas, que llevan diferentes ligandos. Los métodos para producir dichas matrices, por ejemplo en base a la química en fase sólida y grupos protectores foto lábiles, se conocen en general (US 5.744.305).

El término "cantidad" tal como se utiliza aquí abarca la cantidad absoluta de NT-proBNP o cualquier otro polipéptido referido aquí, la cantidad relativa o concentración de NT-proBNP o cualquier otro polipéptido referido aquí así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona con ellos. Dichos valores o parámetros comprenden los valores de intensidad de señal de todas las propiedades específicas físicas o químicas obtenidas del polipéptido referido aquí mediante mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en el espectro de masas o espectro de RMN. Además, se abarcan todos los valores o parámetros que se obtienen mediante las mediciones indirectas especificadas en cualquier parte de esta descripción, por ejemplo, niveles de expresión determinados de los sistemas de lectura biológicos en respuesta al polipéptido o cualquier otro polipéptido referido aquí o intensidad de señales obtenidas de los ligandos específicamente unidos. Debe entenderse que los valores que se correlacionan con las cantidades anteriormente mencionadas o parámetros pueden también obtenerse mediante cualquier operación matemática estándar.

El término "NT-proBNP" está relacionado con un polipéptido que comprende, preferiblemente, 76 aminoácidos de longitud que corresponde con la porción N-terminal de la molécula NT-proBNP humana. La estructura del BNP y NT-proBNP humano se ha descrito ya en detalle en la técnica anterior, por ejemplo, WO 02/089657, WO 02/083913, Bonow 1996, New Insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation 93: 1946-1950. Preferiblemente, el NT-proBNP humano tal como se utiliza aquí es el NT-proBNP humano como se describe en PE 0 648 228 B1 o bajo el número de acceso del GeneBank NP-002512.1; GI:4505433. Estos documentos anteriores se incorporan aquí por referencia respecto a las secuencias específicas de NT-proBNP y las variantes de las mismas descritas allí.

EL NT-proBNP referido de acuerdo con la presente invención además abarca las variantes alélicas y otras de dicha secuencia específica para el NT-proBNP humano descrito anteriormente. Específicamente, están comprendidas variantes de polipéptidos que presentan una identidad de aminoácidos de al menos un 60%, más preferiblemente de al menos un 70%, de al menos un 80%, de al menos un 90%, de al menos un 95%, de al menos un 98% o de al menos un 99% de identidad al NT-proBNP humano. Sustancialmente similar y también comprendidos son los productos de degradación proteolíticos que aún son reconocidos mediante los métodos de diagnóstico o mediante ligandos dirigidos contra los correspondientes péptidos de longitud completa. También están comprendidas las variantes de polipéptidos con deleciones de aminoácidos, sustituciones, y/o adiciones si se compara con la secuencia de aminoácidos de NT-proBNP humano siempre que dichos polipéptidos posean las propiedades de NT-proBNP. Las propiedades de NT-proBNP referidas aquí son las propiedades inmunológicas esenciales y/o biológicas. Preferiblemente, las variantes de NT-proBNP poseen propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítomos) comparables a aquellas de NT-proBNP. Así, las variantes serán reconocibles por los medios anteriormente mencionados o ligandos utilizados para la determinación de la cantidad de secuencias de NT-proBNP específicas humanas referidas anteriormente. Las propiedades biológicas y/o inmunológicas de NT-proBNP pueden detectarse mediante el ensayo descrito por Karl *et al.* (Karl 1999. Development of a novel, N-Terminal-proBNP (NT-proBNP) assay with a low detection limit. Scand J Clin Invest 59:177-181), Yeo *et al.* (Yeo 2003. Multicenter evaluation of the Roche NT-proBNP assay and comparison to the Biosite Triage assay. Clinica Chimica Acta 338:107-115). Las variantes también incluyen NT-proBNP modificados después de la traducción como variantes glicosiladas, miristiladas o fosforiladas.

Una variante de acuerdo con la presente invención es también un péptido o un polipéptido que ha sido modificado tras la recogida de la muestra, por ejemplo mediante unión covalente o no covalente de un marcaje, particularmente un marcaje radioactivo o fluorescente, al péptido.

El término “muestra” se refiere a una muestra de fluido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o un órgano. Las muestras de fluidos corporales pueden obtenerse mediante técnicas bien conocidas e incluyen, preferiblemente, muestras de sangre, plasma, suero u orina. Las muestras de tejido u órganos pueden obtenerse a partir de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. Las células aisladas pueden obtenerse a partir de los fluidos corporales o de tejido u órgano mediante técnicas de separación como la centrifugación o selección de células.

La comparación tal como se utiliza aquí comprende comparar la cantidad de NT-proBNP o cualquier otro péptido referido aquí comprendido por la muestra a analizar con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada más adelante en esta descripción. Debe entenderse que comparar, tal como se utiliza aquí, se refiere a la comparación de los parámetros correspondientes o valores, por ejemplo, una cantidad absoluta se compara con una cantidad de referencia absoluta mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia o una intensidad de señal obtenida de una muestra de pruebas se compara con el mismo tipo de intensidad de señal de una muestra de referencia. La comparación referida en el paso (b) del método de la presente invención puede llevarse a cabo manualmente o asistido por ordenador. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse a los valores correspondientes a las referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos mediante un programa de ordenador. El programa de ordenador puede además evaluar el resultado de la comparación, es decir, proporciona automáticamente un diagnóstico diferencial para las enfermedades referidas aquí en un formato de salida adecuado.

El término “cantidad de referencia” tal como se utiliza aquí se refiere a una cantidad que permite evaluar si un sujeto sufre cualquiera de las anteriormente mencionadas enfermedades o trastornos mediante una comparación como se ha referido anteriormente. De acuerdo con esto, la referencia puede derivar de un sujeto conocidos que padece un embolismo pulmonar único o embolismo pulmonar múltiple. Debe entenderse que si se utiliza una referencia de un sujeto que padece un embolismo pulmonar único, una cantidad de NT-proBNP en una muestra de un sujeto prueba que es esencialmente idéntica a dicha cantidad de referencia será indicativa de un embolismo pulmonar único. De forma similar, si se utiliza una referencia de un sujeto conocido que padece un embolismo pulmonar múltiple, una cantidad de NT-proBNP en una muestra de un sujeto prueba que es esencialmente idéntica a dicha cantidad de referencia será indicativa de un embolismo pulmonar múltiple. La cantidad de referencia aplicable para un sujeto individual puede variar dependiendo de varios parámetros fisiológicos como la edad, género, o subpoblación. Así, una cantidad de referencia adecuada puede determinarse mediante el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia a analizar en conjunto, es decir, de forma simultánea o posteriormente, con la muestra prueba. Se ha encontrado que una cantidad de un NT-proBNP superior que un umbral (es decir, una cantidad de referencia) de 6 a 12 veces el límite superior de lo normal (ULN), es indicativo de un embolismo pulmonar múltiple. Una cantidad inferior al umbral es indicativa de un embolismo pulmonar único. Preferiblemente, el ULN es de 80 a 150 pg/ml y, más preferiblemente, de 125 pg/ml. Más preferiblemente, la cantidad de referencia es 1000 pg/ml. Debe entenderse que las cantidades anteriormente mencionadas pueden variar debido a la estadística y a los errores de medición.

De forma ventajosa, se ha detectado que la cantidad de NT-proBNP presente en la muestra de un sujeto que muestra los síntomas clínicos indicativos de un episodio de embolismo pulmonar agudo permite el diagnóstico diferencial respecto a la causa de dichos síntomas, es decir, puede diagnosticarse tanto si el embolismo pulmonar es único como si es un embolismo pulmonar múltiple. Gracias a la presente invención, los sujetos y, en particular, los pacientes de urgencia pueden diagnosticarse de forma más fácil y segura y, en consecuencia, pueden tratarse de acuerdo con el resultado de dicho diagnóstico diferencial.

Las explicaciones y definiciones de los términos que se han mencionado anteriormente y a continuación, se aplican por igual en todas las realizaciones caracterizadas en esta especificación y en las reivindicaciones.

Las siguientes realizaciones son realizaciones particularmente preferibles del método de la presente invención.

En una realización preferible del método de la presente invención, dicha cantidad de referencia está entre 6 y 12 veces el límite superior de normalidad (LSN) de NT-proBNP. Más preferiblemente, dicho LSN es de 125 pg/ml.

En otra realización preferible del método de la presente invención dicha cantidad de referencia es de 1000 pg/ml.

En una realización preferible del método de la presente invención, dicho método además comprende los pasos de:

c) determinar la cantidad de NT-proANP en dicha muestra de forma simultánea a la cantidad de NT-proBNP del paso a);

d) determinar la cantidad de NT-proANP en otra muestra de dicho sujeto, siendo esta muestra adicional de un momento posterior en el tiempo;

e) comparar la cantidad de NT-proANP determinada en el paso d) con la cantidad de NT-proANP determinada en el paso c), siendo indicativa de un embolismo pulmonar agudo una disminución de NT-proANP.

Por “simultáneamente”, tal como se utiliza aquí, debe entenderse que la cantidad de NT-proANP debe determinarse al mismo tiempo que la cantidad de NT-proBNP. La cantidad de NT-proANP puede determinarse en la misma muestra

que la cantidad de NT-proBNP. Alternativamente, puede determinarse en una muestra diferente. No obstante, dicha muestra diferente puede obtenerse del mismo sujeto al mismo tiempo que la muestra utilizada para la determinación de NT-proBNP.

5 El término “NT-proANP” utilizado de acuerdo con la presente invención posee una secuencia de aminoácidos de 98 aminoácidos de longitud que corresponden a la porción N-terminal de la molécula de NT-proANP humana. La estructura de ANP y NT-proANP humanas ya se ha descrito en detalle en anterior bibliografía, por ejemplo, Bonow 1996, New Insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation 93: 1946-1950. Preferiblemente, la NT-proANP humana tal como se utiliza aquí es la NTproANP humana como se describe en el número de registro de GeneBank 10 NP 006163.1; GI:23510319. Estos documentos bibliográficos se incorporan aquí como referencia relacionados con las secuencias específicas de NT-proANP y las variantes de la misma descritas aquí.

La NT-proANP de acuerdo con la presente invención comprende además las variantes alélicas y otras variantes de dicha secuencia específica de NT-proANP humana anteriormente mencionada. Específicamente, quedan incluidas 15 las variantes polipeptídicas a nivel de aminoácido con al menos un 60% de identidad, más preferiblemente con al menos un 70%, con al menos un 80%, con al menos un 90%, con al menos un 95%, con al menos un 98% o con al menos un 99% de identidad con la NT-proANP humana. Son sustancialmente similares y también se incluyen los productos de degradación proteolítica que siguen siendo reconocibles mediante métodos diagnósticos o mediante 20 ligandos dirigidos contra el respectivo péptido completo. También se contemplan las variantes polipeptídicas con deleciones de aminoácidos, sustituciones y/o adiciones comparado con la secuencia de aminoácidos de la NT-proANP humana siempre que dichos polipéptidos posean las propiedades de NT-proANP. Las propiedades de NT-proANP referidas aquí son las propiedades inmunológicas y/o biológicas esenciales. Preferiblemente, las variantes de NT-proANP poseen propiedades inmunológicas (es decir, la composición de epítomos) comparables a las de NT-proANP. Así, las variantes deben ser reconocibles por los anteriormente mencionados métodos o ligandos utilizados para la 25 determinación de la cantidad de las anteriormente mencionadas secuencias específicas de la NT-proANP humana. Las propiedades inmunológicas y/o biológicas de NT-proANP pueden detectarse mediante el ensayo descrito en Ruskoaho, 2003, Endocrine Reviews 24(3): 341-356. Las variantes también incluyen las NT-proANP modificadas a nivel post-traduccional como las variantes glucosiladas, miristiladas o fosforiladas.

30 También es una variante de acuerdo con la presente invención un péptido o polipéptido que se ha modificado tras la recogida de la muestra, por ejemplo mediante la unión covalente o no covalente de un marcaje, particularmente un marcaje radioactivo o fluorescente del péptido.

De acuerdo con el método preferible mencionado anteriormente, debe proporcionarse una muestra adicional del 35 sujeto, habiéndose obtenido esta muestra adicional de dicho sujeto en un momento posterior. El periodo de tiempo debe ser el suficiente como para permitir la degradación de la NT-proANP, que se proporciona en exceso como respuesta a un episodio de embolismo pulmonar agudo. Preferiblemente, dicho periodo de tiempo es al menos de 2 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas.

40 El término “disminución” tal como se utiliza aquí se refiere a una disminución significativa de la cantidad de NT-proANP entre las muestras comparadas. Si una disminución en la cantidad es significativa, puede determinarse mediante las técnicas estadísticas que se indican en otro apartado de esta especificación. Preferiblemente, una dismi- 45 nución tal como se utiliza aquí es una disminución en la cantidad de al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45% o al menos un 50%.

En los estudios que originan la presente invención Se ha detectado que una disminución significativa en la cantidad de NT-proANP en la sangre de un sujeto tras un episodio de embolismo pulmonar agudo es indicativa de un embolismo pulmonar agudo. Si la cantidad de NT-proANP, no obstante, aumenta o permanece aproximadamente en el mismo 50 nivel (es decir, no aparece una reducción significativa), el embolismo pulmonar no debe considerarse agudo y, por lo tanto, debe considerarse crónico. Debe entenderse que la presente invención también está relacionada, en principio, con la utilización de NT-proANP y NT-proBNP o los métodos para la determinación de NT-proANP y los métodos para la determinación de NT-proBNP para la elaboración de una composición diagnóstica para diferenciar entre un embolismo pulmonar agudo o crónico. Dichas composiciones diagnósticas o métodos deben ser útiles para realizar 55 los métodos de acuerdo con la presente invención.

De lo anterior se deriva que la presente invención también incluye un método de diferenciación entre el embolismo pulmonar agudo y el crónico en un sujeto, que comprende: a) determinar la cantidad de NT-proANP en la muestra de un primer punto temporal de un sujeto que padece un embolismo pulmonar; b) determinar la cantidad de NT-proANP 60 en una muestra de un segundo punto temporal tras un periodo de tiempo de un sujeto que padece un embolismo pulmonar; y c) comparar la cantidad de NT-proANP determinada en el paso a) con la cantidad de NT-proANP determinada en el paso b), en el que una disminución de NT-proANP es indicativa de un embolismo pulmonar agudo.

Preferiblemente, dicho periodo de tiempo es de al menos 2 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 65 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas.

En una realización preferible del método de la presente invención, dicho método además comprende la determina- ción simultánea de la cantidad de NT-proBNP en el paso a) y b) junto con la cantidad de NT-proANP y la comparación

de las cantidades de NT-proBNP del paso a) con la cantidad de NT-proBNP determinada en el paso b), en el que un aumento de NT-proBNP es además indicativo de embolismo pulmonar agudo.

5 Específicamente, se ha detectado que un episodio de embolismo agudo puede confirmarse además a nivel bioquímico mediante un aumento de la cantidad de NT-proBNP determinada tras un periodo de tiempo en relación a lo anterior. Así, mientras la cantidad de NT-proBNP tras dicho periodo de tiempo disminuye en los sujetos que padecen un embolismo pulmonar agudo, la cantidad de NT-proBNP aumentará.

10 Además, la presente invención está relacionada con un método para seleccionar una terapia adecuada para el embolismo pulmonar que comprende los pasos del método de la presente invención y el paso adicional de seleccionar una terapia adecuada basada en el diagnóstico obtenido mediante el método anteriormente mencionado.

15 Como se ha discutido anteriormente, las intervenciones terapéuticas que son necesarias difieren según sea un embolismo pulmonar agudo o crónico así como entre un embolismo pulmonar único o múltiple. Específicamente, si el diagnóstico es un embolismo pulmonar único y/o agudo, la terapia adecuada es la lisis del trombo mediante fármacos de acción trombolítica. La eliminación del trombo mediante cirugía es la terapia preferible para el embolismo pulmonar múltiple. Los fármacos de acción trombolítica que pueden ser adecuados en una terapia como la anteriormente mencionada son, preferiblemente, los activadores de plasminógeno tisulares recombinantes (rtPA).

20 Gracias a la presente invención puede distinguirse fácilmente entre embolismo pulmonar agudo y crónico, y entre único y múltiple. Así, puede proporcionarse inmediatamente una terapia adecuada que, en el caso particular de los pacientes de urgencias, puede reducir significativamente la tasa de mortalidad debida al embolismo pulmonar.

25 La presente invención también está relacionada con la utilización de un dispositivo adaptado para realizar el método de la presente invención, que comprende: a) métodos para determinar la cantidad de NT-proBNP; b) métodos para determinar la cantidad de NT-proBNP; y/o c) métodos para comparar las cantidades de NT-proBNP y NT-proBNP.

30 El término “dispositivo” tal como se utiliza aquí está relacionado con un sistema de métodos que comprenden al menos los métodos anteriormente mencionados unidos de forma operativa entre ellos para dar lugar a la predicción. Los métodos preferibles para determinar la cantidad de dichos polipéptidos y los métodos para realizar la comparación se han descrito anteriormente en relación con el método de la invención. Como ligar los métodos de forma operativa dependerá del tipo de métodos incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, en el caso de que se apliquen métodos para la determinación automática de la cantidad de péptidos, los datos obtenidos mediante tales métodos que operan automáticamente pueden procesarse mediante, por ejemplo, un programa informático para diagnosticar o distinguir entre las enfermedades aquí tratadas. Preferiblemente, en tal caso los métodos están incluidos en un solo dispositivo. Tal dispositivo, de acuerdo con esto, puede incluir una unidad de análisis para la medida de la cantidad de péptidos en una muestra y una unidad de computerización para procesar los datos resultantes para el diagnóstico diferencial. Alternativamente, si se utilizan métodos como las tiras analíticas para la determinación de la cantidad de péptidos, los métodos para el diagnóstico pueden comprender las tiras o tablas control que sitúan la cantidad determinada en relación a una cantidad conocida como (i) un embolismo pulmonar agudo o crónico y (ii) como un embolismo pulmonar único o múltiple. Las tiras analíticas, preferiblemente, se acoplan a un ligando que se une específicamente al péptido natriurético o la proteína surfactante pulmonar. La tira o dispositivo, preferiblemente, comprende los métodos para la detección de la unión de dichos péptidos a dicho ligando. Los métodos preferibles para la detección se describen en relación con las realizaciones relacionadas con el método de la invención anterior. En tal caso, los métodos están ligados de forma operativa de forma que el usuario del sistema relaciona el resultado de la determinación de la cantidad y el valor diagnóstico de la misma gracias a las instrucciones e interpretaciones que se proporcionan en un manual. Los métodos pueden aparecer como dispositivos separados en esta realización y, preferiblemente, se empaquetan juntos como un equipo. El experto en la materia sabrá como relacionar los métodos sin mayores problemas. Los dispositivos preferibles son aquellos que pueden utilizarse sin el conocimiento concreto de un clínico especializado, por ejemplo, los dispositivos electrónicos o de tiras analíticas que simplemente requieren la carga de una muestra. Los resultados pueden proporcionarse como una salida de datos brutos del parámetro de diagnóstico, preferiblemente, en cantidades absolutas o relativas. Debe entenderse que estos datos necesitarán de la interpretación del clínico. No obstante, también se incluyen los dispositivos con sistemas para expertos en los que los datos de salida comprenden los datos brutos de diagnóstico procesados, cuya interpretación no requiere un clínico especializado. Otros dispositivos preferibles comprenden las unidades/dispositivos de análisis (por ejemplo, biosensores, chips, soportes sólidos acoplados a ligandos que reconocen específicamente los polipéptidos, dispositivos de resonancia de plasmón en superficie, espectrómetros de NMR, espectrómetros de masas, etc.) o unidades/dispositivos de evaluación mencionados anteriormente de acuerdo con el método de la invención.

60 Por “escogido para realizar” debe entenderse que el dispositivo es capaz de realizar automáticamente los métodos anteriormente mencionados. De tal elección, se deriva que el dispositivo comprende las reglas implementadas para realizar la comparación entre la cantidad determinada de NT-proBNP y una cantidad de referencia que puede haberse determinado también mediante el dispositivo a partir de una muestra de referencia o que puede existir virtualmente como un valor almacenado. Además, el dispositivo puede comprender reglas implementadas para la determinación de una disminución significativa de la cantidad de NT-proBNP entre al menos dos muestras diferentes (es decir la muestra de un primer y de un segundo momento temporal). La implementación de tales reglas en el dispositivo, preferiblemente, se consigue mediante un algoritmo proporcionado en forma de código de programa informático almacenable que se ejecuta en un computador o unidad de procesamiento de datos.

Finalmente, la presente invención está relacionada con la utilización de un equipo para realizar el método de la presente invención que comprende: a) métodos para determinar la cantidad de NT-proANP; b) métodos para determinar la cantidad de NT-proBNP; y/o c) métodos para comparar las cantidades de NT-proANP y NT-proBNP; y d) instrucciones para realizar los métodos anteriormente mencionados.

5 El término “equipo” tal y como se utiliza aquí se refiere a la recogida de los métodos anteriormente mencionados, preferiblemente, proporcionados por separado o en un único contenedor. El contenedor, preferiblemente, también comprende instrucciones para realizar el método de la presente invención. La invención, así, está relacionada con la utilización de un equipo que comprende un método o un agente para la medida de un péptido tipo BNP (es decir, 10 NT-proANP o NT-proBNP). Tales métodos o agentes pueden ser cualquier método o agente adecuado conocido por el experto en la materia. Ejemplos de tales métodos o agentes, así como los métodos para su utilización se han proporcionado en esta especificación. Por ejemplo, un agente adecuado puede ser cualquier tipo de ligando o anticuerpo capaz de unirse específicamente a un polipéptido como los descritos aquí anteriormente. El equipo también puede comprender cualquier otro componente que se considere apropiado en el contexto de la determinación de la(s) cantidad(es) de los 15 respectivos biomarcadores, como los tampones, filtros, etc. adecuados. Preferiblemente, el equipo puede comprender adicionalmente unas instrucciones, por ejemplo, un manual del usuario para la interpretación de los resultados de cualquier determinación respecto al diagnóstico proporcionado por los métodos de la presente invención. En particular, tal manual puede incluir la información para relacionar las cantidades determinadas de los polipéptidos y el tipo de diagnóstico, es decir, con un embolismo pulmonar único o múltiple, o con un embolismo pulmonar agudo o crónico. 20 Los detalles pueden encontrarse en otro lugar en esta especificación. Adicionalmente, tal manual del usuario puede proporcionar instrucciones sobre la utilización correcta de los componentes del equipo para la determinación de la(s) cantidad(es) del respectivo biomarcador. Un manual del usuario puede proporcionarse en formato papel o electrónico, por ejemplo, almacenado en un CD o CD ROM. La presente invención está relacionada con la utilización de dicho equipo en cualquiera de los métodos de acuerdo con la presente invención.

25 La Figura muestra: se muestran gráficos de cajas de las cantidades de NT-proBNP y NT-proANP en muestras de sangre de pacientes tomadas en el momento de la admisión (0 horas, línea basal), ocho horas y 24 horas tras la admisión. También se indican la mediana y los percentiles 95, 75, 25 y 5. Las cantidades correspondientes (pg/ml) se encuentran bajo los gráficos de cajas.

30 Los siguientes Ejemplos son meramente ilustrativos de la invención. En ningún caso debe considerarse como limitante del alcance de la invención.

Ejemplo

35 *Determinación de niveles de NT-proBNP y NT-proANP en pacientes que presentan embolismo pulmonar agudo*

Se incluyó en el estudio un total de 34 pacientes con sospecha de embolismo pulmonar. Se realizó a todos los pacientes una tomografía axial computerizada a las 4 horas tras la presentación a la sala de emergencias.

40 Los paciente con embolismo pulmonar agudo pero sin embolismo pulmonar previo (es decir, embolismo pulmonar único) se encontró en la tomografía axial computerizada de los grupos 1 y 2 (véase Tabla 1). En el grupo 3 de pacientes se detectó embolismo pulmonar múltiple mediante tomografía axial computerizada incluyendo enfermedad de arterias pulmonares de diferentes tamaños (véase Tabla 1). El grupo 1 y el grupo 2 difieren de los asignados al grupo 3 en que 45 tienen niveles de NT-proBNP por debajo de 1000 pg/ml.

En el grupo 1, un descenso en los valores de NT-proANP en más de un 10% se asoció con un aumento significativo de los niveles de NT-proBNP. En el grupo 2, un aumento de NT-proANP se asoció con un aumento de los niveles de NT-proBNP.

50 Por lo tanto en el grupo 1 los pacientes tienen un embolismo pulmonar agudo como lo indica el descenso de NT-proANP seguido del aumento significativo en NT-proBNP que está de acuerdo con el resultado de la tomografía axial computerizada. En el grupo 2, los niveles de NTproANP y NT-proBNP aumentaron, lo que indica una evolución prolongada del embolismo pulmonar que fue de nuevo consistente con el resultado de la tomografía axial computerizada. 55 El grupo 2 de pacientes no mejoró en lo referente a los síntomas.

60 Los pacientes del grupo 3 mostraron respuestas variables, un embolismo pulmonar prolongado se vio en cinco pacientes lo que se asoció con un aumento de los niveles de NT-proANP y NT-proBNP. En 10 pacientes, el episodio agudo no pudo verificarse, los embolismos pulmonares previos se diagnosticaron mediante tomografía axial computerizada. Esto se asoció con tan solo pequeños cambios en los niveles de proANP y NT-proBNP.

El descenso de proANP se advirtió en 11 pacientes. En este grupo de pacientes variable se reconocieron respuestas variables que incluyen un episodio pulmonar agudo menor así como la resolución de la enfermedad bajo una terapia de heparina.

65 En el presente estudio, los niveles de NT-proBNP y NT-proANP se midieron en muestras de sangre. Para la determinación de NT-proBNP, se utilizó el test de Elecsys™ (Roche Diagnostics, Alemania). Los niveles de NT-proANP se determinaron utilizando el ELISA de proANP (Biomedica, Austria).

ES 2 334 155 T3

Los resultados del estudio se muestran también en las siguientes tablas:

TABLA 1

Línea basal (0 horas) parámetros bioquímicos de pacientes admitidos en el estudio y distribución en los tres grupos referidos anteriormente

Grupo 1 (N=6)						
Paciente	Tiempo	TnT	CK-MB	Myo	NT-proBNP	NT-proANP
16	0	0,208	2,510	35,01	163,3	4311,92
22	0	0,285	4,780	69,84	973,3	5328,56
27	0	0,206	5,42	154,1	352,7	5433,7
37	0	0,160	6,360	265,90	66,6	5468,78
40	0	0,082	5,77	47,76	376,8	3358,4
45	0	0,087	2,010	122,90	533,4	10341,61
Mediana					364,8	5381,1
Máx					973,3	10341,6
75					533,4	5468,8
25					163,3	4311,9
Min					66,6	3358,4
Grupo 2 (N=6)						
Paciente	Tiempo	TnT	CK-MB	Myo	NT-proBNP	NT-proANP
7	0	0,227	6,18	59,02	465,8	1794,9
28	0	<0,010	1,400	36,21	128,30	1528,45
6	0	0,012	6,58	872,1	867,5	17808,6
11	0	0,455	6,53	419,6	479,8	12900,7
17	0	0,01	2,43	383,9	160,7	21314,2
32	0	<0,010	1,090	<21,00	341,40	3786,08
Mediana					341,4	15354,7
Máx					867,5	21314,2
75					479,8	17808,6
25					341,4	12900,7
Min					160,7	3786,1
Grupo 3 (N=22)						
Paciente	Tiempo	TnT	CK-MB	Myo	NT-	NT-proANP

ES 2 334 155 T3

					proBNP	
5	2	0	0,011	2,500	46,33	6653,0 6275,08
	4	0	0,170	3,760	91,58	5568,0 3393,45
	8	0	0,036	1,960	35,42	5912,00 3221,67
10	14	0	0,021	4,110	91,91	23999,0 11218,02
	15	0	0,114	3,910	45,96	1472,0 2801,00
15	19	0	0,010	0,937	27,53	5210,00 2871,11
	20	0	0,440	10,440	67,77	12450,0 12409,93
20	10	0	0,054	2.640	41,23	3377,0 3751,02
	1	0	0,219	3,950	49,48	1623,00 6520,47
25	13	0	0,077	3,620	66,89	4740,00 4697,54
	21	0	0,010	1,590	38,33	15522,00 13707,01
30	24	0	3,300	68,780	396,700	16032,00 13847,24
	25	0	<0,010	0,610	34,15	2162,00 10516,89
35	29	0	<0,010	2,320	39,78	1059,00 3610,80
	30	0	<0,010	0,998	24,93	12478,0 7887,67
40	33	0	0,161	9,000	132,40	4990,0 8378,46
	34	0	0,088	3,910	50,09	8287,00 4662,49
45	38	0	0,023	2,560	58,49	4674,0 4662,49
	39	0	0,042	6,970	82,79	3526,00 4907,88
50	41	0	0,031	3,300	79,81	5816,00 11042,73
	42	0	0,151	2,580	35,08	5538,00 9114,64
55	43	0	<0,010	1,240	27,34	1292,00 1914,07
	Mediana					5374,0 5591,5
60	95					16032,00 13707,01
	75					8287,00 10516,89
65	25					2162,00 3393,45
	5					1059,00 1914,07

ES 2 334 155 T3

TABLA 2

Cambios de NT-proBNP en el grupo 3 para pacientes con niveles de NT-proANP aumentados, sin cambios y disminuidos

5	Grupo	3	Δ NT-proBNP	Δ NT-proBNP	Δ NT-proBNP
10	pacientes		[%] Media NT-	[%] Media NT-	[%] Media NT-
	N=22		proBNP	proBNP	proBNP
15	Tiempo		0 basal	8h	24h
20	NT-proANP, Media		8145,8 pg/ml	6276,8 pg/ml	6875,9 pg/ml
25	Aumento > 10%; (23%)	N=6	Δ 0% 5987,6 pg/ml	Δ - 38% 3696,0 pg/ml	Δ + 82%: 10877 pg/ml
30	Δ + 10%: N= 6 (23%)		Δ 0% 1545,0 pg/ml	Δ + 273% 5770,3 pg/ml	Δ - 74% 407,0 pg/ml
35	Descenso > 10%; N=14 (54%)		Δ 0% 4117,1 pg/ml	Δ -54% 1877,3 pg/ml	Δ - 8% 3796,9 pg/ml
40	Aumento > 20%; (19%)	N=5	Δ 0% 3699,6 pg/ml	Δ + 16% 4306,4 pg/ml	Δ + 314% 11617,6 pg/ml
45	Δ 20%; N=10 (38%)		Δ 0% 5113,8 pg/ml	Δ - 3% 4970,8 pg/ml	Δ - 14% 4401,8 pg/ml
50	Descenso > 20%; (42%)	N=11	Δ 0% 2635,7 pg/ml	Δ -35% 1701,1 pg/ml	Δ + 24% 3261,3 pg/ml
55					
60					
65					

ES 2 334 155 T3

TABLA 3

Cambios de NT-proBNP en el grupo 2 para pacientes con niveles de NT-proANP aumentados, sin cambios y disminuidos

Grupo 2 pacientes N=6 ANP: aumento BNP: aumento	Δ NT-proBNP [%] Media NT- proBNP	Δ NT-proBNP [%] Media NT- proBNP	Δ NT-proBNP [%] Media NT- proBNP
Tiempo	0 basal	8h	24h
NT-proANP, Media	14303 pg/ml	19351 pg/ml	19912,3 pg/ml
Aumento > 10%	Δ 0% 456,6 pg/ml	Δ + 68% 766,0 pg/ml	Δ + 969%: 4882 pg/ml
Δ + 10%	0	0	0
Descenso > 10%	0	0	0

TABLA 4

Cambios de NT-proBNP en el grupo 1 para pacientes con niveles de NT-proANP aumentados, sin cambios y disminuidos

Grupo 1 pacientes N=6 ANP: descenso BNP: aumento	Δ NT-proBNP [%] Media NT- proBNP	Δ NT-proBNP [%] Media NT- proBNP	Δ NT-proBNP [%] Media NT- proBNP
Tiempo	0 basal	8h	24h
NT-proANP, Media	6177,2 pg/ml	3312,8 pg/ml	3386,4 pg/ml
Aumento > 10%	0	0	0
Δ + 10%	0	0	0
Descenso > 10%	Δ 0% 417,8 pg/ml	Δ + 159% 1081,0 pg/ml	Δ + 347%: 1868,4 pg/ml

REIVINDICACIONES

1. Un método para diferenciar entre un embolismo pulmonar múltiple y uno único en un sujeto del que se sospecha que padece un embolismo pulmonar agudo y que muestra una falta aguda de aliento, condiciones similares al colapso y/o dolor de pecho que comprende a) determinar la cantidad de NT-pro BNP en una muestra del sujeto del que se sospecha que padece un embolismo pulmonar agudo y que muestra una falta aguda de aliento, condiciones similares al colapso y/o dolor de pecho; y b) comparar la cantidad determinada en el paso a) con una cantidad de referencia, en el que una cantidad inferior a la cantidad de referencia es indicativa de un embolismo pulmonar único y una cantidad superior a la cantidad de referencia es indicativa de un embolismo pulmonar múltiple.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha cantidad de referencia está entre 6 y 12 veces el límite superior de normalidad (LSN) de NT-pro BNP.

3. El método de la reivindicación 2, en el que el LSN es 125 pg/ml.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, en el que dicha cantidad de referencia es de 1000 pg/ml.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, que además comprende los pasos de: c) determinar la cantidad de NT-pro ANP en dicha muestra de forma simultánea a la cantidad de NT-pro BNP del paso a); d) determinar la cantidad de NT-pro ANP en una muestra adicional de dicho sujeto, siendo dicha muestra adicional de un momento posterior; e) comparar la cantidad de NT-pro ANP determinada en el paso d) con la cantidad de NT-pro ANP determinada en el paso c), en el que una disminución de NT-pro ANP es indicativa de un embolismo pulmonar agudo.

6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho periodo de tiempo es al menos de 2 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas.

7. Un método para diferenciar entre un embolismo pulmonar agudo y crónico en un sujeto que sufre un embolismo pulmonar y muestra una falta aguda de aliento, condiciones similares al colapso y/o dolor de pecho y que comprende: a) determinar la cantidad de NT-pro ANP en la muestra de un sujeto que sufre un embolismo pulmonar, de un primer momento temporal; b) determinar la cantidad de NT-pro ANP en la muestra de un sujeto que sufre un embolismo pulmonar, de un segundo momento temporal tras un periodo de tiempo; y c) comparar la cantidad de NT-pro ANP determinada en el paso a) con la cantidad de NT-pro ANP determinada en el paso b), en el que una disminución de NT-pro ANP es indicativa de un embolismo pulmonar agudo.

8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho periodo de tiempo es de al menos 2 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas.

9. El método de la reivindicación 7 o 8, en el que dicho método además comprende la determinación simultánea de la cantidad de NTpro BNP del paso a) y b) junto con la cantidad de NT-pro ANP y la comparativa de las cantidades de NT-pro ANP del paso a) con la cantidad de NT-pro BNP determinada en el paso b), en el que un aumento de NT-pro BNP es indicativo de un embolismo pulmonar agudo.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, en el que dicha muestra es sangre, suero o plasma.

11. El método de cualquiera de las de reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho sujeto es un humano.

12. Un método para seleccionar una terapia adecuada para el embolismo pulmonar que comprende los pasos del método de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11 y el paso adicional de seleccionar una terapia adecuada basada en el diagnóstico obtenido mediante el método anteriormente mencionado.

13. El método de la reivindicación 12, en el que la terapia adecuada es la lisis del trombo mediante fármacos de acción trombolítica si el diagnóstico es un embolismo pulmonar único y/o agudo.

14. El método de la reivindicación 12, en el que la terapia adecuada es la eliminación del trombo mediante cirugía si el diagnóstico es un embolismo pulmonar múltiple.

15. La utilización de un dispositivo para diferenciar entre embolismo pulmonar único y múltiple o entre crónico y agudo para realizar el método de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 14, que comprende a) métodos para determinar la cantidad de NT-pro ANP; b) métodos para determinar la cantidad de NT-pro BNP; y c) métodos para comparar las cantidades de NT-pro ANP y NT-pro BNP.

16. La utilización de un equipo para diferenciar entre embolismo pulmonar único y múltiple o entre crónico y agudo para realizar el método de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 14 que comprende a) métodos para determinar la cantidad de NT-pro ANP; b) métodos para determinar la cantidad de NT-pro BNP; c) métodos para comparar las cantidades de NT-pro ANP y NT-pro BNP; y d) instrucciones para realizar los métodos anteriormente mencionados.

Figura 1

