

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 028**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2012 PCT/EP2012/070553**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057135**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2012 E 12775484 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2769227**

54 Título: **Diagnóstico basado en Troponina y BNP de pacientes en riesgo y causa de ictus**

30 Prioridad:

17.10.2011 EP 11185421

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

27.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HESS, GEORG;
ZDUNEK, DIETMAR y
HORSCH, ANDREA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 595 028 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

Diagnóstico basado en Troponina y BNP de pacientes en riesgo y causa de ictus

5 Después de la enfermedad cardíaca isquémica el ictus ocupa el segundo lugar como causa de pérdida de esperanza de vida ajustada por discapacidad en países con altos ingresos y como causa de muerte en todo el mundo. Si las consecuencias adversas precoces que se presentan a consecuencia de un ictus pueden aliviarse usando trombolisis, en el caso de prevención secundaria de presentación tardía (para evitar ictus posteriores) el uso de aspirina y anticoagulación parece ser el único método apropiado para evitar la progresión de enfermedad (van der Worp B y van Gijn J., NEJM 2007: 357: 572 - 578).

15 Para evitar o tratar el ictus es importante la identificación de la causa subyacente del ictus. Los criterios TOAST (Adams H.P. *et al* Stroke 1993: 24: 35 - 41) han abordado dicha identificación. Los criterios de TOAST diseccionan las causas del ictus en aterotrombóticas (ateroesclerosis de vasos grandes), cardioembólicas, lacunares (que implican vasos pequeños) e indeterminadas (Adams H.P. *et al*). Para evaluar esos criterios se requieren ultrasonidos carótidos y transcraneales, así como ecocardiografía y un electrocardiograma (Rodríguez-Yanez *et al*, Disease Markers 2009: 26: 189 - 195). Hasta la fecha, el NT-pro BNP se ha asociado con ictus cardioembólico, pero no con ictus aterotrombótico, lacunar e indeterminado (Rodríguez-Yanez *et al*). Una desventaja principal de este método es que el BNP o NT-pro BNP podrían liberarse del cerebro en ictus isquémico y de este modo limitar el posible diagnóstico de péptidos natriuréticos de tipo cerebral. Resulta interesante que, en el contexto de los estudios llevados a cabo por los inventores, se ha mostrado que el nivel medio en suero de NT-pro BNP en pacientes con ictus aumentó desde 331 pg/ml de presentación hasta 24h de seguimiento (437 pg/ml) en aproximadamente 30 %. Por lo tanto, el diagnóstico del ictus cardioembólico basado en la determinación de un péptido natriurético se basa en el punto temporal en el que se obtiene la muestra para ensayar. Por lo tanto, es necesario identificar marcadores de riesgo que no se liberan del cerebro.

30 Las troponinas cardíacas T e I son los biomarcadores preferidos para el diagnóstico de infarto de miocardio agudo (Anderson JL, ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2007;50(7): e1-e157). Se ha reconocido que pueden detectarse niveles elevados de troponina en varias patologías crónicas no agudas, incluyendo enfermedad de las arterias coronarias, insuficiencia cardíaca y enfermedad renal crónica (véase, por ejemplo, Omland *et al.*, N Engl J Med. 2009;361(26):2538-2547). También se ha mostrado que las Troponinas T e I son detectables en individuos de la población general (véase, por ejemplo, Wallace *et al.*, Prevalence and determinants of troponin T elevation in the general population. Circulation. 2006;113(16):1958-1965).

35 Ustrell *et al.* desvela (Current Cardiology Reviews, Bentham Science Publishers, Países Bajos, vol. 6. no. 3, 2010, páginas 175-183).

40 Trooyen *et al.* desvela que la lesión miocárdica puede evaluarse mediante Troponina I (Tidsskrift for den Norske Laege-forening - Journal of the Norwegian Medical Association. Lysaker, n.º vo. 1, 121. N.º 4, 10 de febrero de 2001 (10-02-2001), páginas 421-425).

45 Song *et al.* (Journal of Clinical Neurology, Volumen 4, 2006, páginas 75 a 83) describe un estudio que incluyó 455 pacientes con ictus isquémico. La Troponina T en suero se elevó en aproximadamente 10 % de los pacientes y se asoció con mayor gravedad de ictus, en particular con déficits neurológicos más graves y daños al lóbulo insular. Los autores del estudio concluyen que los niveles de Troponina en suero elevados pueden ser indicativos de menor tolerancia cardíaca a la tensión provocada por el ictus isquémico agudo. Por lo tanto, de acuerdo con Song *et al.* el aumento de la Troponina estaría provocado por ictus agudo, es decir, seguiría al acontecimiento agudo.

50 En el contexto de la presente invención, se ha mostrado sorprendentemente que los niveles de Troponina cardíaca elevados en pacientes con ictus cardioembólico son detectables ya al comienzo del ictus cardioembólico. Por lo tanto, a diferencia de las enseñanzas de Song *et al.*, el aumento del nivel de Troponinas cardíacas no está provocado por el acontecimiento de ictus. En su lugar, los estudios de la presente invención sugieren que los niveles de troponinas cardíacas ya han aumentado antes de la aparición de síntomas de ictus. Por lo tanto, la determinación de Troponinas cardíacas permite una diferenciación precoz entre ictus isquémico cardioembólico e ictus isquémico no cardioembólico en el sujeto. Esto es ventajoso porque la evaluación precoz de la causa de ictus es crucial para tratar suficientemente a un sujeto que padece el ictus, en particular un sujeto que padece ictus cardioembólico. Además, los ictus debidos a cardioembolia son en general graves y propensos a reaparición precoz.

60 Las técnicas de diagnóstico convencionales habitualmente no permiten una evaluación precoz, fiable de la causa de ictus. En consecuencia, un régimen de tratamiento personalizado no puede determinarse con suficiente precisión. Como consecuencia, muchos pacientes recibirán un régimen de tratamiento que es insuficiente o que puede tener efectos secundarios adversos. Por lo tanto, se requieren medios y métodos para diferenciar con fiabilidad entre las causas del ictus.

65

El problema técnico subyacente a la presente invención puede verse como la provisión de medios y métodos para cumplir con la necesidad anteriormente mencionada.

El problema técnico se resuelve por la materia objeto de las reivindicaciones 1 a 7.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para la diferenciación precoz de si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, que comprende determinar la cantidad de Troponina cardíaca en una muestra de un sujeto que padece ictus isquémico, en el que la muestra se ha obtenido no más de 6 horas después de la aparición de síntomas de ictus isquémico.

En una realización preferida el método comprende además la etapa de

a) comparar la cantidad de dicha Troponina cardíaca como se determina en la etapa a con una cantidad de referencia, diferenciando de este modo si dicho sujeto padece ictus cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico.

La divulgación se refiere a un método para la diferenciación precoz de si un sujeto padece ictus cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, que comprende

a) determinar la cantidad de una Troponina cardíaca en una muestra del sujeto que padece ictus isquémico, obtenida inmediatamente después de la aparición de síntomas de ictus isquémico, y
b) comparar la cantidad de dicha Troponina cardíaca como se ha determinado en la etapa a) con una cantidad de referencia, por lo que se diferencia si dicho sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico.

Preferentemente, se diferencia si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico llevando a cabo la etapa adicional de c) diagnosticar si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, basándose en los resultados de la comparación llevada a cabo en la etapa b).

En una realización preferida del método de la presente invención, la etapa a) comprende además la determinación de la cantidad de un péptido natriurético en la muestra del sujeto obtenida inmediatamente después de la aparición de ictus isquémico. Preferentemente, la cantidad determinada de este modo del péptido natriurético se compara en la etapa b) con una cantidad de referencia para un péptido natriurético.

La divulgación también se refiere a un método para la diferenciación precoz de si un sujeto padece ictus cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, que comprende

a) determinar la cantidad de una Troponina cardíaca y de péptido natriurético en una muestra de un sujeto que padece ictus isquémico, obtenida inmediatamente después de la aparición de síntoma de ictus isquémico, y
b) comparar la cantidad de dicha Troponina cardíaca como se ha determinado en la etapa a) con una cantidad de referencia de la Troponina cardíaca y la cantidad de dicho péptido natriurético con una cantidad de referencia del péptido natriurético, de modo que se diferencia si dicho sujeto padece ictus cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico.

El método de la presente invención es, preferentemente, un método *ex vivo*. Además, puede comprender etapas además de las mencionadas explícitamente anteriormente. Por ejemplo, etapas adicionales pueden referirse a pretratamientos de muestra o evaluación de los resultados obtenidos por el método. El método puede llevarse a cabo manualmente o con ayuda de automatización. Preferentemente las etapas (a) y/o (b) pueden estar total o parcialmente asistidas por automatización, por ejemplo, mediante un equipamiento robótico y sensorial adecuado para la determinación de la etapa (a) o para una comparación implementada por ordenador y/o diferenciación basada en dicha comparación en la etapa (b).

El término "diferenciar", como se usa en el presente documento, significa distinguir entre ictus cardioembólico e ictus no cardioembólico en un paciente que padece ictus isquémico. El término, como se usa en el presente documento, incluye preferentemente, diagnosticar diferencialmente ictus isquémico cardioembólico e ictus isquémico no cardioembólico en un sujeto. Como entenderán los expertos en la materia, habitualmente no se pretende que dicha evaluación sea correcta en el 100 % de los sujetos para diagnosticar diferencialmente. Sin embargo, el término, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda diagnosticarse correctamente. El que un diagnóstico/diferenciación sea correcto(a) puede confirmarse por métodos bien conocidos en la técnica. Además, si una parte es estadísticamente significativa, el experto en la materia puede determinarlo sin más dilación usando diversas herramientas de evaluación estadística muy conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, ensayo de la t de Student, ensayo de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos 90 %, de al menos 95 %, de al menos 97 %, de al menos 98 % o de al menos 99 %. Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a animales, preferentemente a mamíferos y, más preferentemente, a seres humanos. Preferentemente, el sujeto padece o no infecciones agudas. Además, también se espera que el sujeto no padezca síndrome coronario agudo y/o insuficiencia renal crónica. En particular, el sujeto, en el contexto en relación con el método anteriormente mencionado, tendrá función renal normal. Además, el sujeto es, preferentemente, un sujeto que acude a una unidad de urgencias.

La definición de sujeto proporcionada en el presente documento, preferentemente, se aplica al sujeto que se va a ensayar de acuerdo con el método de la presente invención, así como a uno o más sujetos de los que se obtiene la cantidad de referencia.

El sujeto a ensayar de acuerdo con el método de la presente invención padecerá ictus isquémico. La expresión "ictus isquémico" (también denominada en el presente documento "ictus") es muy conocida por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Adams *et al.*, Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke, A Guideline From the American Heart Association/ American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups in Stroke. 2007; 38:1655; o Stroke Genetics, editado por Hugh S. Markus, Capítulo 1 "An introduction to stroke, Oxford University Press, Incorporated, fecha de publicación 06/03, ambas de las cuales se incorporan en la presente por referencia con respecto a su contenido de divulgación completo). Como se usa en el presente documento, la expresión, preferentemente, se refiere a ictus isquémico cerebral. El ictus isquémico está provocado por flujo sanguíneo reducido al cerebro o partes del mismo lo que conduce a un suministro reducido (desabastecimiento) de oxígeno a células cerebrales. El ictus isquémico puede caracterizarse por anemia tisular provocada por la obstrucción del flujo de entrada de sangre arteria. Puede conducir a daño tisular irreversible debido a la muerte de células cerebrales.

Existen diversos sistemas de clasificación para ictus isquémico. La clasificación del Proyecto de Ictus de la Comunidad de Oxford (OCSP, también conocida como la clasificación de Bamford u Oxford) se basa principalmente en los síntomas iniciales; basándose en el alcance de los síntomas, el episodio de ictus se clasifica como infarto de circulación anterior total (TACI), infarto de circulación anterior parcial (PACI), infarto lacunar (LACI) o infarto de circulación posterior (POCI). Estas cuatro entidades predicen el alcance del ictus, el área del cerebro afectada, la causa subyacente, y el pronóstico.

Preferentemente, los criterios denominados TOAST se aplican en el presente documento. Para los criterios TOAST, véase, por ejemplo, Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (mayo 2008). "Stroke". *Lancet* 371 (9624): 1612-23 o "Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment". *Stroke* 24 (1): 35-41., ambos de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia con respecto al contenido de divulgación completo. La clasificación TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) se basa en síntomas clínicos así como resultados de investigaciones adicionales; basándose en esto, ictus se clasifica como debido a (1) embolia de origen cardíaco (ictus cardioembólico), (2) trombosis o embolia debido a aterosclerosis de una arteria grande (estenosis de arteria grande, ictus aterotrombótico), (3) oclusión de un vaso sanguíneo pequeño (ictus lacunar) o (4) causa indeterminada (dos posibles causas: sin causa identificada o investigación incompleta). Por lo tanto, son ictus isquémicos no cardioembólicos preferidos ictus aterotrombótico (véase 2) e ictus lacunar (véase 3).

Si un sujeto padece ictus, en particular ictus isquémico, puede determinarse por métodos bien conocidos. Además, en la técnica se conocen bien los síntomas del ictus y se describen, por ejemplo, en Adams *et al.* (referencia citada). Por ejemplo, los síntomas de ictus incluyen entumecimiento o debilidad repentinos de cara, brazo o pierna, especialmente en un lado del cuerpo, confusión repentina, problemas en el habla o en el entendimiento, problemas repentinos en la visión de uno o ambos ojos y problema repentino en la deambulación, mareos, pérdida de equilibrio o coordinación.

El término "muestra" se refiere a una muestra de un 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 por técnicas muy conocidas e incluyen, preferentemente, muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferentemente, muestras de sangre, plasma o suero. Pueden obtenerse muestras tisulares u orgánicas de cualquier tejido u órgano, por ejemplo, mediante biopsia. Pueden obtenerse células separadas de los fluidos corporales o los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como centrifugación o separación celular. Preferentemente, se obtienen muestras celulares, tisulares u orgánicas de las células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos indicados en el presente documento.

La muestra para ensayar en el contexto del método de la presente invención se habrá obtenido no más de seis horas después de la aparición de los síntomas de ictus isquémico y, por lo tanto, inmediatamente después de la aparición de síntomas de ictus (así como la muestra de referencia). Preferentemente, se considera que una muestra se ha obtenido inmediatamente después de la aparición de los síntomas de ictus y se ha obtenido de dicho sujeto no más de 24 horas, en particular no más de 12 horas después de la aparición de síntomas de ictus. Más preferentemente, se considera que una muestra se ha obtenido inmediatamente después de la aparición de síntomas de ictus si se ha obtenido de dicho sujeto no más de 6 horas después de la aparición de síntomas de ictus

isquémico. Se desvela además que la muestra se ha obtenido no más de una o dos horas después de la aparición de síntomas de ictus.

La expresión "Troponina cardíaca" se refiere a todas las isoformas de Troponina expresadas en células del corazón y, preferentemente, las células subendocardiales. Estas isoformas se caracterizan bien en la técnica como se describe, por ejemplo, en Anderson 1995, *Circulation Research*, vol. 76, n.º 4: 681-686 y Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493. Preferentemente, la Troponina cardíaca se refiere a Troponina T y/o Troponina I y, más preferentemente, Troponina T. Debe entenderse que pueden determinarse isoformas de Troponinas en el método de la presente invención juntas, es decir, simultáneamente o secuencialmente, o individualmente, es decir, sin determinar la otra isoforma en absoluto. Se desvelan secuencias de aminoácidos para Troponina T humana y Troponina I humana en Anderson, referencia citada y Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493.

La expresión "Troponina cardíaca" abarca también variantes de las Troponinas específicas anteriormente mencionadas, es decir, preferentemente, de Troponina I, y, más preferentemente, de Troponina T. Dichas variantes tiene al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales como las Troponinas cardíacas específicas. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos ensayos específicos indicados en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, mediante ensayos de ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichas Troponinas cardíacas. Además, debe entenderse que una variante tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, supresión y/o adición de aminoácido en la que la secuencia de aminoácidos de la variante aún es, preferentemente, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la Troponina específica. Preferentemente, el grado de identidad debe determinarse comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, en la que el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (por ejemplo, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para alineamiento óptimo. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en el que el resto de aminoácido idéntico aparece en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Add. APL. Math.* 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para comparación, se emplean preferentemente GAP y BESTFIT para determinar su alineamiento óptimo y, por lo tanto, el grado de identidad. Preferentemente, se usan los valores por defecto de 5,00 para peso de hueco y 0,30 para longitud de peso de hueco. Las variantes pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de especie. Además, las variantes indicadas en el presente documento incluyen fragmentos de las Troponinas cardíacas específicas o los tipos anteriormente mencionados de variantes siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales que se han indicado anteriormente. Preferentemente, las variantes de Troponina cardíaca tienen propiedades inmunológicas (es decir, composición epitópica) comparables a las de Troponina T o Troponina I humana. Por lo tanto, las variantes serán reconocibles por los medios o ligandos anteriormente mencionados usados para determinación de la concentración de las troponinas cardíacas. Por lo tanto, las variantes serán reconocibles por los medios o ligandos anteriormente mencionados usados para determinación de la concentración de las troponinas cardíacas. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de las Troponinas. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones posttraduccionales tales como fosforilación o miristilación. Preferentemente la propiedad biológica de troponina I y su variante es la capacidad para inhibir actomiosina ATPasa o para inhibir angiogénesis *in vivo* e *in vitro*, que pueden detectarse, por ejemplo, basándose en el ensayo descrito en Moses *et al.* 1999 *PNAS USA* 96 (6): 2645-2650). Preferentemente, la propiedad biológica de troponina T y su variante es la capacidad para formar un complejo con Troponina C e I, para unir iones de calcio o para unirse con tropomiosina, preferentemente si está presente como un complejo de Troponina C, I y T o un complejo formado por Troponina C, Troponina I y una variante de Troponina T. Se sabe que pueden detectarse bajas concentraciones de Troponina cardíaca en circulación en sujetos en diversas condiciones, pero se requieren estudios adicionales para entender su papel y velocidad respectivos (Masson *et al.*, *Curr Heart Fail Rep* (2010) 7:15-21).

La expresión "péptido natriurético" comprende péptidos de tipo péptido natriurético auricular (ANP) y péptido natriurético cerebral (BNP) y variantes de los mismos que tienen el mismo potencial predictivo. Los péptidos natriuréticos comprenden péptidos de tipo ANP y de tipo BNP y variantes de los mismos (véase, por ejemplo, Bonow, 1996, *Circulation* 93: 1946-1950). Los péptidos de tipo ANP comprenden pre-proANP, proANP, NT-proANP y ANP. Los péptidos de tipo BNP comprenden pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP y BNP. El pre-pro péptido (134 aminoácidos en el caso de pre-proBNP) comprende un péptido señal corto que se escinde enzimáticamente para

5 liberar el propéptido (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El propéptido se extingue adicionalmente en un
propéptido N terminal (NT propéptido 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32
aminoácidos en el caso de BNP, 28 aminoácidos en el caso de ANP). Preferentemente, los péptidos natriuréticos
son NT proANP, ANP y, más preferentemente, NT-proBNP, BNP y variantes de los mismos. ANP y BNP son las
10 hormonas activas y tiene una semivida más corta que sus homólogos inactivos respectivos, NT-proANP y NT-
proBNP. BNP se metaboliza en la sangre, mientras que NT-proBNP circula en sangre como una molécula intacta y
como tal se elimina por vía renal. La semivida *in vivo* de NT-proBNP es 120 min. más larga que la de BNP, que es
20 min. (Smith 2000, J Endocrinol. 167: 239-46.). La preanalítica es más robusta con NT-proBNP lo que permite fácil
transporte de la muestra a un laboratorio central (Mueller 2004, Clin Chem Lab Med 42: 942-4.). Pueden
15 almacenarse muestras sanguíneas a temperatura ambiente durante varios días o pueden enviarse sin pérdida de
recuperación. Por el contrario, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4 °C
conduce a pérdida de concentración de al menos 20 % (Mueller referencia citada.; Wu 2004, Clin Chem 50: 867-
73.). Por lo tanto, dependiendo del ciclo temporal o propiedades de interés, la medición de las formas activas o las
20 inactivas del péptido natriurético puede ser ventajosa. Los péptidos natriuréticos más preferidos son NT-proBNP o
variantes del mismo. Como se ha analizado brevemente anteriormente, el NT-proBNP humano es un polipéptido que
comprende, preferentemente, 76 aminoácidos de longitud correspondientes a la parte 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, documentos WO 02/089657, WO 02/083913 o Bonow referencia citada. Preferentemente, NT-proBNP
humano como se usa en el presente documento es NT-proBNP humano como se desvela en el documento EP 0 648
25 228 B1. Estos documentos de la técnica anterior se incorporan con la presente por referencia con respecto a las
secuencias específicas de NT-proBNP y variantes de las mismas desveladas en los mismos. El NT-proBNP abarca
además variantes alélicas y otras de dicha secuencia específica para NT-proBNP humano analizado anteriormente.
Específicamente, se prevén polipéptidos variantes que son, en el nivel de aminoácidos preferentemente, al menos
30 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a NT-proBNP humano,
preferentemente sobre la longitud completa de NT-proBNP humano. El grado de identidad entre dos secuencias de
aminoácidos puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el grado de
identidad debe determinarse comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de
comparación, en la que el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede
comprender adiciones o supresiones (por ejemplo, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de
referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para alineamiento óptimo. El porcentaje se calcula
35 determinando el número de posiciones en el que aparece el resto de aminoácido idéntico en ambas secuencias para
producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total
de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de
identidad de secuencia. Puede realizarse un alineamiento óptimo de secuencias para comparación mediante el
algoritmo de homología local de Smith y Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de
alineamiento de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda
de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988), mediante implementaciones
computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el paquete de software de
Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual.
40 Dado que se han identificado dos secuencias para comparación, GAP y BESTFIT se emplean preferentemente para
determinar su alineamiento óptimo y, por lo tanto, el grado de identidad. Preferentemente, se usan los valores por
defecto de 5,00 para peso de hueco y 0,30 para longitud de peso de hueco. Las variantes indicadas anteriormente
pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parólogo u ortólogo específico de especie. También se
prevén y son sustancialmente similares productos de degradación proteolíticos que aún se reconocen por los medios
45 de diagnóstico o por ligandos dirigidos contra el péptido de longitud completa respectivo. También están abarcados
polipéptidos variantes que tienen supresiones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos en comparación con la
secuencia de aminoácidos de NT-proBNP humano siempre que dichos polipéptidos tengan propiedades de NT-
proBNP. Las propiedades de NT-proBNP como se indica en el presente documento son propiedades inmunológicas
y/o biológicas. Preferentemente, las variantes de NT-proBNP tienen propiedades inmunológicas (es decir,
50 composiciones epitópicas) comparables a las de NT-proBNP humano. Por lo tanto, las variantes serán reconocibles
por los medios o ligandos anteriormente mencionados usados para la determinación de la cantidad de los péptidos
natriuréticos. Pueden detectarse propiedades biológicas y/o inmunológicas de NT-proBNP mediante el ensayo
descrito en Karl *et al.* (Karl 1999, Scand J Clin Lab Invest 230:177-181), Yeo *et al.* (Yeo 2003, Clinica Chimica Acta
338:107-115). Las variantes también incluyen péptidos modificados posttraduccionalmente tales como péptidos
55 glucosilados. Además, una variante de acuerdo con la presente invención también es un péptido o polipéptido que
se ha modificado después de la recogida de la muestra, por ejemplo, mediante unión covalente o no covalente de un
marcador, particularmente un marcador radioactivo o fluorescente, con el péptido.

60 La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido indicado en la presente memoria descriptiva se refiere a
medir la cantidad o concentración, preferentemente de forma semicuantitativa o cuantitativa. La medición puede
realizarse directa o indirectamente. La medición directa se refiere a medir la cantidad o concentración del péptido o
polipéptido basándose en una señal que se obtiene del péptido o polipéptido en sí mismo y la intensidad de la cual
se correlaciona directamente con el número de moléculas de péptido presente en la muestra. Dicha señal,
denominada en ocasiones en el presente documento señal de intensidad, puede obtenerse, por ejemplo, midiendo
65 un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta
incluye la medición de una señal obtenida de un componente secundario (es decir, un componente que no es el

péptido o polipéptido en sí mismo) o un sistema de lectura biológica, por ejemplo, respuestas celulares medibles, ligandos, marcadores o productos de reacción enzimática.

De acuerdo con la presente invención, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido puede 5 conseguirse por todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden inmunoensayo y métodos que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo de tipo sándwich, competición u otros. Dichos ensayos se basan, preferentemente, en agentes de detección 10 tales como anticuerpos que reconocen específicamente el péptido o polipéptido para determinar. Los agentes de detección deberían ser capaces directa o indirectamente de generar una señal que indica la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la fuerza de señal puede, preferentemente, correlacionarse directamente o indirectamente (por ejemplo inversamente proporcional) con la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Los métodos adecuados adicionales comprenden medir una propiedad física o química específica para el péptido o polipéptido tal como su masa molecular precisa o espectro de RMN. Dichos métodos comprenden, preferentemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biomicroplacas, dispositivos analíticos tales como 15 espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos de cromatografía. Además, los métodos incluyen métodos basados en ELISA de microplacas, inmunoensayos completamente automatizados o robóticos (disponibles por ejemplo en analizadores Elecsys™), CBA (un Ensayo de Unión a Cobalto enzimático, disponible por ejemplo en analizadores Roche-Hitachi™), y ensayos de aglutinación de látex (disponibles por ejemplo en analizadores Roche-Hitachi™).

Preferentemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende las etapas de (a) poner en 20 contacto una célula capaz de inducir una respuesta celular cuya intensidad es indicativa de la cantidad del péptido o polipéptido con dicho péptido o polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular. Para medir respuestas celulares, la muestra o muestra procesada, preferentemente, se añade a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión medible de un gen 25 indicador o la secreción de una sustancia, por ejemplo, un péptido, polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia generará una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad del péptido o polipéptido.

También preferentemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende la etapa de medir 30 una señal de intensidad específica que puede obtenerse del péptido o polipéptido en la muestra. Como se ha descrito anteriormente, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada a una variable de m/z específica para el péptido o polipéptido observado en espectros de masas o un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido puede comprender, preferentemente, las etapas de (a) 35 poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) retirar ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido.

De acuerdo con una realización preferida, dichas etapas de puesta en contacto, retirada y medida pueden realizarse 40 por una unidad analizadora del sistema desvelado en el presente documento. De acuerdo con algunas realizaciones, dichas etapas pueden realizarse mediante una única unidad analizadora de dicho sistema o mediante más de una unidad analizadora en comunicación operativa entre sí. Por ejemplo, de acuerdo con una realización específica, dicho sistema desvelado en el presente documento puede incluir una primera unidad analizadora para realizar 45 dichas etapas de puesta en contacto y retirada y una segunda unidad analizadora, conectada operativamente con dicha primera unidad analizadora mediante una unidad de transporte (por ejemplo, un brazo robótico), que realiza dicha etapa de medición.

El ligando unido, en particular el ligando y/o complejo de ligando/vertido, generará una señal de intensidad. La unión 50 incluye unión tanto covalente como no covalente. Un ligando puede ser cualquier compuesto, por ejemplo, un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña, que se une con el péptido o polipéptido descrito en el presente documento. Los ligandos preferidos incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos tales como receptores o compañeros de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos que comprenden los dominios de unión para los péptidos, y aptámeros, por ejemplo aptámeros de ácido nucleico o péptido. Se 55 conocen bien en la técnica métodos para preparar dichos ligandos. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también se ofrece por proveedores comerciales. El experto en la materia está familiarizado con métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Estos derivados pueden después ensayarse con respecto a unión de acuerdo con procedimientos de exploración conocidos en la 60 técnica, por ejemplo, presentación en fagos. Los anticuerpos como se indica en el presente documento incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos F_v, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unir antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos monocatenarios y anticuerpos híbridos humanizados en los que se combinan secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que muestra una especificidad de antígeno deseada con secuencias de un anticuerpo 65 aceptor humano. Las secuencias donantes habitualmente incluirán al menos los restos de aminoácidos de unión a antígeno del donante pero también pueden comprender otros restos de aminoácidos estructural y/o

funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos pueden prepararse por varios métodos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el ligando o agente se une específicamente con el péptido o polipéptido. La unión específica significa que el ligando o agente no debería unirse sustancialmente con ("reacción de forma cruzada" con) otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra para analizar. Preferentemente, el péptido o polipéptido unido específicamente debería unirse con al menos 3 veces más, más preferentemente al menos 10 veces más y aún más preferentemente al menos 50 veces más afinidad que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable, si aún pueden distinguirse y medirse de forma inequívoca, por ejemplo de acuerdo con su tamaño en una Transferencia de Western, o mediante su abundancia en la muestra relativamente mayor. La unión del ligando puede medirse por cualquier método conocido en la técnica. Preferentemente, dicho método es semi-cuantitativo o cuantitativo. Se describen a continuación técnicas adecuadas adicionales para la determinación de un polipéptido o péptido.

En primer lugar, la unión de un ligando puede medirse directamente, por ejemplo mediante RMN o resonancia de plasmón superficial. La medición de la unión de un ligando, de acuerdo con realizaciones preferidas, se realiza mediante una unidad analizadora de un sistema desvelado en el presente documento. A continuación, puede calcularse una cantidad de la unión medida por un dispositivo de cálculo de un sistema desvelado en el presente documento. En segundo lugar, si el ligando también actúa como un sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse un producto de reacción enzimática (por ejemplo la cantidad de una proteasa puede medirse midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo en una Transferencia de Western). Como alternativa, el ligando puede mostrar propiedades enzimáticas en sí mismo y el complejo de "ligando/péptido o polipéptido" o el ligando que se unió con el péptido o polipéptido, respectivamente, puede ponerse en contacto con un sustrato adecuado que permite la detección o la generación de una señal de intensidad. Para medición de productos de reacción enzimática, preferentemente la cantidad de sustrato es de saturación. El sustrato también puede marcarse con un marcador detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para producir una cantidad detectable, preferentemente medible, de producto. En lugar de medir la cantidad de producto, puede medirse el tiempo necesario para la aparición de una cantidad de producto dada (por ejemplo detectable). En tercer lugar, el ligando puede acoplarse covalente o no covalentemente con un marcador lo que permite la detección y medición del ligando. El marcaje puede realizarse mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo implica acoplamiento del marcador directamente (de forma covalente o no covalente) con el ligando. El marcaje indirecto implica la unión (de forma covalente o no covalente) de un ligando secundario con el primer ligando. El ligando secundario debería unirse específicamente con el primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con un marcador adecuado y/o ser la diana (receptor) de unión de ligando terciario con el ligando secundario. El uso de ligando secundario, terciario o incluso de mayor orden se usa con frecuencia para aumentar la señal. Los ligandos secundario y de mayor orden adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios y el sistema de estreptavidina-biotina bien conocido (Vectro Laboratories). El ligando o sustrato también puede "etiquetarse" con una o más etiquetas como se conoce en la técnica. Dichas etiquetas pueden ser entonces dianas para ligandos de mayor orden. Las etiquetas adecuadas incluyen biotina, digoxigenina, Etiqueta de His, Glutación-S-Transferasa, FLAG, GFP, etiqueta de myc, hemaglutinina de virus de la gripe A (HA), proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta está preferentemente en el extremo N terminal y/o C terminal. Los marcadores adecuados son cualquier marcador detectable por un método de detección apropiado. Los marcadores típicos incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridano, luminol, rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radiactivos, marcadores magnéticos (por ejemplo "perlas magnéticas", que incluyen perlas paramagnéticas y superparamagnéticas), y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, beta-Galactosidasa, Luciferasa, y derivados de las mismas. Los sustratos adecuados para detección incluyen di-amino-benzidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro azul tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como una solución de reserva lista para su uso de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación de enzima-sustrato adecuada puede dar como resultado un producto de reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que puede medirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo usando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). Como para la medición de la reacción enzimática, los criterios proporcionados anteriormente se aplican de forma análoga. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Texas Red, Fluoresceína y los colorantes de Alexa (por ejemplo Alexa 568). Están disponibles marcadores fluorescentes adicionales, por ejemplo de Molecular Probes (Oregon). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Los marcadores radiactivos típicos incluyen 35S, 125I, 32P, 33P y similares. Un marcador radiactivo puede detectarse por cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo, una película sensible a la luz o un captador de imágenes de fósforo. Los métodos de medición adecuados de acuerdo con la presente invención también incluyen precipitación (particularmente inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), ensayos inmunitarios enzimáticos de tipo sándwich, inmunoensayos de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoro inmunoensayo de lantánido potenciado por disociación (DELFI), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría potenciada por látex, o ensayos inmunitarios de fase sólida. Pueden usarse métodos adicionales conocidos en la técnica (tales como electroforesis en gel, electroforesis en gel bidimensional,

electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), Transferencia de Western y espectrometría de masas), solos o en combinación con marcaje u otros métodos de detección como se ha descrito anteriormente.

5 La cantidad de un péptido o polipéptido puede determinarse, también preferentemente, de la siguiente manera: (a)
poniendo en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el péptido o polipéptido como se ha
especificado anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) midiendo la cantidad de
péptido o polipéptido que se une al soporte. El ligando, preferentemente elegido del grupo que consiste en ácidos
nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está preferentemente presente en un soporte sólido en
10 forma inmovilizada. Se conocen bien en la técnica materiales para la fabricación de soportes sólidos e incluyen,
entre otros, materiales de columna disponibles en el mercado, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas
magnéticas, partículas de metales coloidales, microplacas y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa,
membranas, láminas, duracytes, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o
agente puede unirse con muchos vehículos diferentes. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio,
15 poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas
naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o
insoluble para los fines de la invención. Se conocen bien métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando e
incluyen, pero sin limitación, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. También se contempla el uso
de "matrices de suspensión" como matrices (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1): 9-12). En dichas matrices de
20 suspensión, el vehículo, por ejemplo, una microperla o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consiste
en diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que aportan diferentes ligandos. Se conocen en
general métodos para producir dichas matrices, por ejemplo basándose en química de fase sólida y grupos
protectores fotolábiles, (documento US 5.744.305).

25 El término "cantidad" como se usa en el presente documento abarca la cantidad absoluta de un polipéptido o
péptido, la cantidad o concentración relativa de dicho polipéptido o péptido así como cualquier valor o parámetro que
se correlaciona con las mismas o pueda derivarse de las mismas. Dichos valores o parámetros comprenden valores
de señal de intensidad de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas de dichos péptidos por
mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en espectros de masas o espectros de RMN. Además, se
30 abarcan todos los valores o parámetros que se obtienen por mediciones indirectas especificadas en otra parte en la
presente descripción, por ejemplo, cantidades de respuesta determinadas a partir de sistemas de lectura biológica
en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidas de ligandos unidos específicamente. Debe
entenderse que también pueden obtenerse valores que se correlacionan con las cantidades o los parámetros
anteriormente mencionados mediante todas las operaciones matemáticas convencionales. De acuerdo con
35 realizaciones preferidas de la presente invención, la determinación de una "cantidad" se realiza mediante el sistema
desvelado, por lo que un dispositivo de cálculo determina la "cantidad" basada en etapas de contacto y medición
realizadas por una o más unidades analizadoras de dicho sistema.

40 El término "comparar" como se usa en el presente documento abarca comparar la cantidad del péptido o polipéptido
comprendida por la muestra para analizar con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada en
otra parte en la presente memoria descriptiva. Debe entenderse que la comparación como se usa en el presente
documento se refiere a una comparación de parámetros o valores correspondientes, 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 señal de intensidad obtenida de una muestra de ensayo se compara con el mismo
45 tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación indicada en la etapa (b) del método de la
presente invención puede llevarse a cabo manualmente o asistida por ordenador. Por lo tanto, la comparación
indicada en la etapa (b) del método de la presente invención puede llevarse a cabo mediante un dispositivo de
cálculo (por ejemplo, de un sistema desvelado en el presente documento). El valor de la cantidad y la referencia
pueden, por ejemplo, compararse entre sí y dicha comparación puede llevarse a cabo automáticamente por un
50 programa informático ejecutando un algoritmo para la comparación. El programa informático que porta dicha
evaluación proporcionará la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Para una comparación asistida
por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse con valores correspondientes a referencias
adecuadas que se almacenan en una base de datos por un programa informático. El programa informático puede
evaluar adicionalmente el resultado de la comparación, es decir proporcionar automáticamente la evaluación
55 deseada en un formato de salida adecuado.

60 Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse con valores
correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos por un programa informático. El
programa informático puede evaluar adicionalmente el resultado de la comparación, es decir proporciona
automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Dicho resultado puede actuar,
preferentemente, como una ayuda en la diferenciación entre ictus isquémico cardioembólico y no cardioembólico.

65 Por ejemplo, puede proporcionarse un resultado de una comparación como datos sin procesar (cantidades absolutas
o relativas), y en algunos casos como un indicador en forma de una palabra, frase, símbolo o valor numérico que
puede ser indicativo de un diagnóstico particular.

La expresión “cantidad de referencia” como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad que permite la localización de un sujeto en el grupo de sujetos que padecen ictus isquémico cardioembólico o en un grupo de sujetos que padecen ictus isquémico no cardioembólico. Dicha cantidad de referencia puede ser una cantidad de umbral que separa estos grupos entre sí. En consecuencia, la cantidad de referencia para una Troponina biomarcadora será una cantidad que permita la localización de un sujeto en un grupo de sujetos que padecen ictus isquémico cardioembólico o en un grupo de sujetos que padecen ictus isquémico no cardioembólico. Una cantidad de umbral adecuada que separa los dos grupos puede calcularse sin más dilación por los ensayos estadísticos indicados en el presente documento en otra parte basándose en cantidades de una Troponina cardíaca de un sujeto o grupo de sujetos que padecen ictus isquémico cardioembólico o un sujeto o grupo de sujetos que padecen ictus isquémico no cardioembólico. Se indican en otra parte en el presente documento cantidades de referencia preferidas que pueden derivar de los sujetos o del grupo de sujetos anteriormente mencionados.

Las cantidades de referencia pueden calcularse, en principio, para una cohorte de sujetos como se ha especificado anteriormente basándose en los valores promedio o medios para un biomarcador dado aplicando métodos estadísticos convencionales. En particular, la precisión de un ensayo tal como un método que se dirige a diagnosticar un acontecimiento, o no, se describe mejor por sus características de funcionamiento del receptor (ROC) (véase especialmente Zweig 1993, Clin. Chem. 39: 561-577). La gráfica de ROC es una representación de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua del umbral de decisión sobre el intervalo completo de datos observados. El rendimiento clínico de un método de diagnóstico depende de su precisión, es decir, su capacidad para asignar correctamente sujetos a un cierto pronóstico o diagnóstico. La representación de ROC indica el solapamiento entre las dos distribuciones representando la sensibilidad frente a 1-especificidad para el intervalo completo de umbrales adecuados para realizar una distinción. En el eje y está la sensibilidad, o la fracción de verdadero positivo, que se define como la relación del número de resultados de ensayo verdaderos positivos con respecto al producto del número de resultados de ensayo verdaderos positivos y número de resultados de ensayo falsos negativos. Esto también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula solamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x está la fracción de falso positivo, o 1-especificidad, que se define como la relación del número de resultados falsos positivos con respecto al producto del número de resultados verdaderos negativos y número de resultados falsos positivos. Es un índice de la especificidad y se calcula totalmente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de verdaderos y falsos positivos se calculan totalmente por separado, usando los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, la representación de ROC es independiente de la prevalencia del acontecimiento en la cohorte. Cada punto en la representación de ROC representa un par de sensibilidad/-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con diferenciación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene una representación de ROC que pasa a través de la esquina izquierda superior, en la que la fracción de verdaderos positivos es de 1,0 o 100 % (sensibilidad perfecta), y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). La representación teórica para un ensayo sin diferenciación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha. La mayoría de las representaciones quedan entre estos dos extremos. Si la representación de ROC queda completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio para “positividad” de “mayor de” a “menor de” o viceversa. Cualitativamente, cuanto más cercana esté la representación a la esquina superior izquierda, mayor será la precisión general del ensayo. Dependiendo de un intervalo de confianza deseado, un umbral puede derivar de la curva de ROC permitiendo el diagnóstico o predicción para un acontecimiento dado con un equilibrio apropiado de sensibilidad y especificidad, respectivamente. En consecuencia, la referencia para usar para el método anteriormente mencionado de la presente invención puede ser, por ejemplo, un umbral o cantidad de punto de corte y puede generarse, preferentemente, estableciendo un ROC para dicha cohorte como se ha descrito anteriormente y derivando una cantidad de umbral de la misma. Dependiendo de una sensibilidad y especificidad deseadas para un método de diagnóstico, la representación de ROC permite derivar umbrales adecuados.

El diagnóstico/diferenciación indicados en el presente documento pueden proporcionarse por el dispositivo de cálculo de un sistema desvelado en el presente documento basándose en dicha comparación de la “cantidad” calculada con una referencia o un umbral. Por ejemplo, un dispositivo de cálculo de un sistema puede proporcionar un indicador, en forma de una palabra, símbolo, o valor numérico que es indicativo de un ictus cardioembólico o un ictus no cardioembólico.

Preferentemente, la cantidad o las cantidades de referencia derivan de un sujeto un grupo de sujetos que se sabe que padecen ictus isquémico cardioembólico. En este caso, una cantidad esencialmente idéntica o una cantidad aumentada de una Troponina cardíaca en la muestra de ensayo en comparación con la cantidad de referencia es, preferentemente, indicativa de ictus isquémico cardioembólico. Si también se determina un péptido natriurético, una cantidad esencialmente idéntica o una cantidad aumentada de una Troponina cardíaca y del péptido natriurético en la muestra de ensayo en comparación con la cantidad de referencia para la Troponina cardíaca y la cantidad de referencia para el péptido natriurético es, preferentemente, indicativa de ictus isquémico cardioembólico.

También preferentemente, la cantidad de referencia para una Troponina cardíaca (y, opcionalmente, del péptido natriurético) puede derivar de un sujeto o un grupo de sujetos que se sabe que padecen ictus isquémico no cardioembólico. En este caso, una cantidad esencialmente idéntica o una cantidad reducida de la Troponina cardíaca (y, opcionalmente, del péptido natriurético) en la muestra de ensayo en comparación con la cantidad de

referencia es indicativa de ictus isquémico no cardioembólico. Si también se determina un péptido natriurético, una cantidad esencialmente idéntica o una cantidad reducida de la Troponina cardíaca del péptido natriurético en la muestra de ensayo en comparación con la cantidad de referencia para la Troponina cardíaca y la cantidad de referencia para el péptido natriurético es indicativa de ictus isquémico no cardioembólico.

La cantidad de referencia aplicable para un sujeto individual puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos tales como edad, sexo o subpoblación, así como de los medios usados para la determinación del polipéptido o péptido indicado en el presente documento. Una cantidad de referencia adecuada puede determinarse a partir de una muestra de referencia para analizar junto, es decir, simultáneamente o posteriormente, con la muestra de ensayo.

Además, la cantidad de referencia puede definir una cantidad umbral, en particular una cantidad de referencia calculada, para la Troponina cardíaca (y, opcionalmente, para el péptido natriurético), por lo que una cantidad de Troponina (y, opcionalmente, del péptido natriurético) en la muestra del sujeto de ensayo mayor que el umbral respectivo sería indicativa de ictus isquémico cardioembólico, mientras que una cantidad de Troponina (y, opcionalmente, del péptido natriurético) en la muestra del sujeto de ensayo menor que el umbral respectivo sería indicativa de ictus no cardioembólico.

Se indican a continuación en el presente documento cantidades de referencia preferidas:

Una cantidad de referencia preferida que indica ictus isquémico cardioembólico es una cantidad de troponina cardíaca, en particular de Troponina T de aproximadamente 8 pg/ml a aproximadamente 40 pg/ml y, más preferentemente, 10 a 30 pg/ml, aproximadamente 11,6 a aproximadamente 20 pg/ml, aún más preferentemente de aproximadamente 15 a 20 pg/ml. Aún más preferentemente, la referencia es una cantidad de aproximadamente 8, 10 u 11,6 pg/ml. Una cantidad de ensayo que es esencialmente idéntica o aumentada sería indicativa de ictus isquémico cardioembólico mientras que una cantidad reducida en la muestra de ensayo en comparación con la cantidad de referencia será indicativa de ictus isquémico no cardioembólico. Preferentemente, las cantidades de referencia anteriormente mencionadas derivan de un sujeto o un grupo de sujetos que se sabe que padecen ictus isquémico cardioembólico.

La presente invención es, particularmente, útil para descartar ictus cardioembólico. En particular, una cantidad de ensayo de una Troponina cardíaca, preferentemente, de Troponina T que es menor de 5 pg/ml, en particular menor de 3 o menor de 2 pg/mg indica que el sujeto no padece ictus cardioembólico (y, por lo tanto, preferentemente, padece ictus no cardioembólico).

Una cantidad de referencia preferida que indica ictus isquémico cardioembólico es una cantidad de un péptido natriurético, en particular, de NT-proBNP de aproximadamente 500 pg/ml a aproximadamente 1500 pg/ml y, más preferentemente, 700 a 1300 pg/ml, aún más preferentemente de aproximadamente 800 a 1000 pg/ml. Aún más preferentemente, la referencia es una cantidad de aproximadamente 700, 800 o más preferentemente 900 pg/ml. Una cantidad de ensayo que es esencialmente idéntica o aumentada será indicativa de ictus isquémico cardioembólico mientras que una cantidad reducida en la muestra de ensayo en comparación con la cantidad de referencia será indicativa de ictus isquémico no cardioembólico. Preferentemente, las cantidades de referencia anteriormente mencionadas derivan de un sujeto o un grupo de sujetos que se sabe que padecen ictus isquémico cardioembólico (además de la cantidad de la Troponina cardíaca).

Como se ha expuesto anteriormente, el método desvelado es, particularmente, útil para descartar ictus cardioembólico. En particular, una cantidad de ensayo de un péptido natriurético, en particular de NT-proBNT que es menor de 250 pg/ml, en particular menor de 200 o menor de 150 pg/mg indica que el sujeto no padece ictus cardioembólico (y, por lo tanto, preferentemente, padece ictus no cardioembólico).

El término "aproximadamente" significa +/- 20 %, +/- 10 %, +/- 5 %, +/- 2 % o +/- 1 % de dichos valores. Esto también tiene en cuenta desviaciones habituales provocadas por técnicas de medición, estadística y similares.

El método desvelado puede comprender además recomendar una terapia para dicho sujeto, en particular, si se ha diagnosticado que el sujeto padece ictus cardioembólico. Una terapia que puede recomendarse en un sujeto que padece ictus cardioembólico es terapia lítica y/o terapia de anticoagulación (véase por ejemplo Cairns J.A. *et al*/ Canadian J of Cardiology 2011: 27: 74 - 90 o Camm A.J. *et al*/ Eur Heart Journal 2010: 31: 2369 - 429 que se incorporan ambas en el presente documento por referencia).

Un agente de detección adecuado puede ser, en un aspecto, un anticuerpo que se une específicamente con la troponina cardíaca, en una muestra de un sujeto para investigar por el método de la invención. Otro agente de detección que puede aplicarse, en un aspecto, puede ser un aptámero que se une específicamente con el marcador en la muestra. En un aspecto más, la muestra se retira del complejo formado entre el agente de detección y el marcador antes de la medición de la cantidad de complejo formado. En consecuencia, en un aspecto, el agente de detección puede inmovilizarse en un soporte sólido. En un aspecto más, la muestra puede retirarse del complejo formado en el soporte sólido aplicando una solución de lavado. El complejo formado será proporcional a la cantidad

del marcador presente en la muestra. Se entenderá que la especificidad y/o sensibilidad del agente de detección para aplicar define el grado de proporción de al menos un marcador comprendido en la muestra que es capaz de unirse específicamente. Se encuentran también en otra parte del presente documento detalles adicionales sobre cómo la determinación puede llevarse a cabo. La cantidad de complejo formado se transformará en una cantidad del marcador que refleja la cantidad de hecho presente en la muestra. Dicha cantidad, en un aspecto, puede ser esencialmente la cantidad presente en la muestra o puede ser, en otro aspecto, una cantidad que es una cierta proporción de la misma debido a la relación entre el complejo formado y la cantidad presente en la muestra original.

En un aspecto del método de la invención, la cantidad determinada en la etapa a) se compara con una referencia. En un aspecto, la referencia es una referencia como se ha definido en otra parte en el presente documento. En otro aspecto más, la referencia tiene en cuenta la relación proporcional entre la cantidad medida de complejo y la cantidad presente en la muestra original. Por lo tanto, las referencias aplicadas en un aspecto del método de la invención son referencias artificiales que se adoptan para reflejar las limitaciones del agente de detección que se ha usado. En otro aspecto, dicha relación también puede tenerse en cuenta cuando se lleva a cabo la comparación, por ejemplo incluyendo una etapa de cálculo de normalización y/o corrección para la cantidad determinada antes de comparar de hecho el valor de la cantidad determinada y la referencia. De nuevo, la etapa de cálculo de normalización y/o corrección para la cantidad determinada adopta la etapa de comparación de modo que las limitaciones del agente de detección que se han usado se reflejan apropiadamente. En un aspecto, la comparación se llevó a cabo automáticamente, por ejemplo, asistida por un sistema informático o similar.

La ayuda para diferenciar si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico se establece basándose en la comparación llevada a cabo en la etapa b) asignando el sujeto a (i) el grupo de sujetos que padecen ictus cardioembólico o (ii) el grupo que padece ictus no cardioembólico como se expone en el presente documento en otra parte. Como ya se ha analizado en otra parte del presente documento, la asignación del sujeto investigado no debe ser correcta en el 100 % de los casos investigados. Además, los grupos de sujetos en los que el sujeto investigado se asigna son grupos artificiales porque se establecen basándose en consideraciones estadísticas, es decir un cierto grado preseleccionado de probabilidad basado en el cual actuará el método de la invención. En un aspecto de la invención, la ayuda para la diferenciación se establece automáticamente, por ejemplo, asistida por un dispositivo informático o similar, como se describe y desvela en el presente documento.

En un aspecto del método de la invención, dicho método comprende además una etapa de recomendar y/o controlar al sujeto de acuerdo con el resultado establecido en la etapa c) como se expone en otra parte en el presente documento en detalle.

En un aspecto del método anteriormente mencionado, las etapas b) y/o c) se llevan a cabo por una o más unidades analizadoras como se expone en otra parte en el presente documento.

Además, la presente invención se refiere al uso de una troponina cardíaca y/o de un agente de detección, que se une específicamente a la misma (y opcionalmente de un péptido natriurético y/o de un agente de detección, que se une específicamente al mismo) en una muestra de un sujeto que padece ictus isquémico para la diferenciación precoz de si el sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, en el que la muestra se ha obtenido no más de 6 horas después de la aparición de síntomas de ictus.

La expresión "agente de detección" como se usa en el presente documento se refiere a un agente que es capaz de reconocer específicamente y unirse con el biomarcador indicado en el presente documento (una troponina cardíaca, o un péptido natriurético) cuando está presente en una muestra. Además, dicho agente permitirá la detección directa o indirecta del complejo formado por dicho agente y el biomarcador. La detección directa puede conseguirse incluyendo en el agente un marcador detectable. El marcaje indirecto puede conseguirse por un agente adicional que se une específicamente con el complejo que comprende el biomarcador y el agente de detección en el que dicho agente adicional es entonces capaz de generar una señal detectable. Se conocen bien en la técnica compuestos adecuados que pueden usarse como agentes de detección. Preferentemente, el agente de detección es un anticuerpo o aptámero que se une específicamente con el biomarcador. Los anticuerpos como se indica en el presente documento incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unirse con antígeno o hapteno. También se prevén anticuerpos monocatenarios y anticuerpos híbridos humanizados en los que se combinan secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que muestra una especificidad de antígeno deseada con secuencias de un anticuerpo aceptor humano.

La presente invención también se refiere a un dispositivo para la diferenciación precoz de si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus no cardioembólico en un sujeto que padece ictus isquémico, comprendiendo dicho dispositivo:

- a) una unidad analizadora que comprende un agente de detección para una troponina cardíaca que permite la determinación de la cantidad de dicha troponina cardíaca (y, opcionalmente, un agente de detección para un péptido natriurético que permite la determinación de la cantidad de dicho péptido natriurético); y

b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementado un algoritmo para comparar la cantidad o las cantidades determinadas por la unidad de análisis con cantidad o cantidades de referencia almacenadas en una base de datos para diferenciar si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, en el que la cantidad de referencia procede de una muestra de un sujeto que se sabe que padece ictus cardioembólico y/o de una muestra de un sujeto que se sabe que padece ictus isquémico no cardioembólico, en el que dicha muestra se ha obtenido no más de 6 horas después de la aparición de síntomas de ictus isquémico, y en el que el algoritmo es el siguiente:

i) una cantidad idéntica de la troponina cardíaca, o una cantidad de la troponina cardíaca que aumenta en comparación con la cantidad de referencia, es indicativa de que un sujeto padece ictus cardioembólico, si la cantidad de referencia procede de un sujeto que se sabe que padece ictus cardioembólico y/o

ii) una cantidad idéntica de la troponina cardíaca, o una cantidad de la troponina cardíaca que se reduce en comparación con la cantidad de referencia, es indicativa de que un sujeto padece ictus isquémico no cardioembólico, si la cantidad de referencia procede de un sujeto que se sabe que padece ictus isquémico no cardioembólico.

La presente divulgación se refiere además a un dispositivo para la diferenciación precoz de si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico en un sujeto que padece ictus isquémico, comprendiendo dicho dispositivo:

a) una unidad de análisis (o una unidad analizadora) que comprende un agente de detección para una troponina cardíaca que permite la determinación de la cantidad de dicha troponina cardíaca (y, opcionalmente un agente de detección para un péptido natriurético que permite la determinación de la cantidad de dicho péptido natriurético); y

b) una unidad de evaluación (o una unidad analizadora) que comprende un procesador de datos que tiene implementado un algoritmo para comparar la cantidad o las cantidades determinadas por la unidad de análisis con cantidad o cantidades de referencia almacenadas en una base de datos para diferenciar si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, en el que la cantidad de referencia procede de una muestra de un sujeto de referencia, como se describe en otra parte en el presente documento en el contexto del método, para diferenciar si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, y el algoritmo es un algoritmo como se ha definido en el contexto de dicho método.

El término "dispositivo" como se usa en el presente documento se refiere a un sistema que comprende las unidades anteriormente mencionados unidas operativamente entre sí para permitir el diagnóstico de acuerdo con los métodos de la invención. Se desvelan en otra parte del presente documento agentes de detección preferidos que pueden usarse para la unidad de análisis. La unidad de análisis, preferentemente, comprende dichos agentes de detección en forma inmovilizada en un soporte sólido que va a ponerse en contacto con la muestra que comprende los biomarcadores cuya cantidad va a determinarse. Además, la unidad de análisis también puede comprender un detector que determina la cantidad de agente de detección que se une específicamente al biomarcador o los biomarcadores. La cantidad determinada puede transmitirse a la unidad de evaluación. Dicha unidad de evaluación comprende un elemento de procesamiento de datos, tal como un ordenador, con un algoritmo implementado para llevar a cabo una comparación entre la cantidad determinada y una referencia adecuada. Las referencias adecuadas pueden derivar de muestras de sujetos para usar para la generación de cantidades de referencia como se describe en otra parte en el presente documento anteriormente. Los resultados de diagnóstico pueden proporcionarse como resultado de datos sin procesar de diagnóstico paramétricos, preferentemente, como cantidades absolutas o relativas. Debe entenderse que estos datos pueden necesitar interpretación por el médico. Sin embargo, también se prevén dispositivos de sistemas expertos en los que el resultado comprende datos sin procesar de diagnóstico procesado cuya interpretación no requiere un especialista clínico. Preferentemente, el dispositivo de la presente invención puede usarse para llevar a cabo el método anteriormente mencionado de la presente invención de una manera automática.

Los siguientes ejemplos únicamente ilustrarán la invención. No debe interpretarse de ninguna manera que limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1: determinación de troponina T, GDF-15 y NT-proBNP

Se determinó troponina T usando prueba de tipo sándwich de ELISA de electroquimioluminiscencia de Roche ensayo Elecsys de Troponina T hs (alta sensibilidad) STAT (de tiempo de respuesta corto). El ensayo emplea dos anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra troponina T cardíaca humana. Los anticuerpos reconocen dos epítomos (posición de aminoácido 125-131 y 136-147) localizados en la parte central de la proteína T de troponina cardíaca, que consiste en 288 aminoácidos (sensibilidad analítica por debajo de 1,0).

Se determinó NT-proBNP usando la prueba de tipo sándwich de ELISA de electroquimioluminiscencia de Roche ensayo Elecsys proBNP II STAT (tiempo de respuesta corto). El ensayo emplea dos anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos localizados en la parte N terminal (1-76) de proBNP (1-108).

Para determinar la concentración de GDF-15 en muestras de suero y plasma, se empleó un ensayo prototípico Elecsys, usando un anticuerpo IgG de cabra anti GDF-15 humano, purificado por cromatografía de afinidad GDF-15, policlonal, de R&D Systems (AF957). En cada experimento, se generó una curva patrón con GDF-15 humano recombinante de R&D Systems (957-GD/CF). Los resultados con nuevos lotes o proteína GDF-15 recombinante se ensayaron en muestras de plasma convencionales y se corrigió cualquier desviación por encima del 10 % introduciendo un factor de ajuste para este ensayo. Las mediciones de GDF-15 en muestras de suero y plasma del mismo paciente produjeron resultados prácticamente idénticos después de corrección con respecto a factores de dilución eventuales. El límite de detección del ensayo fue de 200 pg/ml.

10 Ejemplo 2: Cohorte de pacientes

Se ensayó un total de 255 pacientes con ictus isquémico (edad media 70 años) con respecto a NT pro BNP, troponina T y GDF 15. Estaba presente ataque isquémico transitorio en 23 pacientes, se diagnosticó ictus menor en 61 pacientes y se encontró ictus mayor en 108 pacientes. Además como se ha descrito anteriormente se realizaron ultrasonidos carótidos y transcraneales así como electro y ecocardiografía y los pacientes se clasificaron según los criterios de COAST. Además se realizó un HOLTER ECG de 7 días para identificar fibrilación auricular no detectada en el electrocardiograma rutinario.

20 Ejemplo 3: Resultados

Se obtuvieron los siguientes resultados (se indican los valores medianos, el percentil 25 y el percentil 75):

	Troponina T pg/ml	NT-pro BNP pg/ml	GDF 15 pg/ml
Estenosis de Arteria Grande N=46	4,9 0,0 - 16,3	262 110 - 611	1146 801 - 1404
Ictus cardioembólico N=66	11,6 3,8 - 29	868 365 - 1863	1393 1005 - 2481
Vaso pequeño N=32	6,3 0,0 - 9,3	222 79 - 412	1188 822 - 2025
No determinado N=97	5,3 0,0 - 10,8	152 63 - 371	1106 805 - 1522

25 Como se ha descrito anteriormente se asoció ictus cardioembólico con niveles de NT-pro BNP aumentados, GDF 15 no contribuyó significativamente a la clasificación de ictus, sin embargo la troponina T sensible sí y excluyendo de este modo las dificultades de separar péptidos natriuréticos de tipo B cardíaco y cerebral.

30 Estos datos están apoyados adicionalmente por la clasificación relacionada con la presencia o ausencia de fibrilación auricular. Los resultados son los siguientes:

	Troponina T Pg/ml	NT-pro BNP pg/ml	GDF 15 pg/ml
Fibrilación Auricular N=44	15,8 8 - 35	1773 996 - 2667	2220 1288 - 3069
AF Intermitente N=28	9,2 4,9 - 24	448 321 - 802	1364 1120 - 2214
Sin AF N = 101	4,3 0 - 10,6	137 62 - 386	1069 765 - 1480

35 Los datos demuestran de nuevo la asociación de AF con NT-pro BNP y troponina T pero en un grado mucho menor con GDF 15. Las limitaciones de NT-pro BNP para usar en la clasificación también se vieron apoyadas por el hecho de que la mediana de los niveles de NT-pro BNP aumentó desde la presentación (331 pg/ml) hasta 24 h después hasta 437 pg/ml, que está en el intervalo de 30 % de aumento. En la medida en que este aumento se debió a causas cardíacas o se liberó del cerebro no está claro. Por el contrario, no hubo ningún aumento significativo de Troponina T en el seguimiento. Por lo tanto, los niveles de Troponina T permanecieron estables.

40 En resumen se descubrió que la troponina T era una herramienta potente en la identificación/separación de causas de ictus. Este método también puede usarse en prevención de ictus en combinación con péptidos natriuréticos de tipo B. GDF 15 proporcionó sorprendentemente poca información adicional a esta cuestión clínica importante.

Ejemplo 4: estudios de casos

Se diagnosticó a un hombre de 68 años de edad TIA (ataque isquémico transitorio) basándose en síntomas clínicos y un IRM posterior. Su ECG es normal. Su troponina T es 10,2 pg/ml, su NT-pro BNP es 520 pg/ml. Un ecocardiograma mostró disfunción ventricular izquierda leve, en la aurícula no hubo ninguna formación de trombo. Basándose en los criterios de TOAST, se diagnosticó al sujeto ictus cardioembólico después de descartar otras posibilidades. Debido a la formación de trombo intraauricular recibe un ECG de Holter durante 3 días que revela fibrilación auricular paroxística. Se le aplica después una terapia anticoagulante ya que no tenía ninguna contraindicación.

Un hombre de 72 años de edad presenta ictus menor confirmado por IRM después de descartar hemorragia intracerebral por exploración de TC. Su troponina T es 4,1 pg/ml y su NT-pro BNP es 245 pg/ml. Un ultrasonido carótido revela una estenosis del 80 % de la bifurcación carótida derecha. ECG y ecocardiografía son normales, excepto una disfunción diastólica menor. Como es poco probable que tenga AF no se llevó a cabo un Holter ECG. Se le recomienda considerar revisión de la carótida obstruida después de evaluación más intensa de arterias intra y extracerebrales.

Una mujer de 52 años de edad presenta mareos y palpitaciones y visita la sala de urgencias. Su troponina T es 3 pg/ml, NT-pro BNP es 115 pg/ml, el ECG y la ecocardiografía están dentro de lo normal. Debido a que los síntomas no se dirigen a un acontecimiento cerebral o fibrilación auricular no se realizan investigaciones adicionales lo que está en concordancia con los resultados de troponina T y NT-pro BNP. Se le dio el alta con un síndrome de ansiedad sospechado.

Un hombre de 58 años de edad se presenta en la sala de urgencias debido a debilidad temporal de su brazo izquierdo. Su ECG es normal, su Troponina T es 11,1 pg/ml y NT-pro BNP es 435 pg/ml. Un IRM descarta el ictus, debido a los resultados de Troponina T y NT-pro BNP se realizó posteriormente un Holter ECG que reveló AF paroxística. Una Eco posterior que incluía TTE reveló trombos intraauriculares. Se le diagnostica fibrilación auricular paroxística y se le administra terapia anticoagulante sin contraindicaciones obvias.

Un hombre de 58 años de edad se presenta en la sala de urgencias con un ictus isquémico 2 horas después del inicio de los síntomas, los síntomas incluyen debilidad repentina del brazo derecho y la pierna, su Troponina T es de 12,5 pg/ml y NT-pro BNP es 920 pg/ml. Se confirma ictus cardioembólico sospechado mediante ecocardiografía esofágica con un trombo visible en la aurícula izquierda. La angiografía asociada con terapia de lisis confirmó el diagnóstico. La terapia de lisis fue exitosa y los síntomas mejoraron, el paciente empieza a tomar anticoagulantes.

Un hombre de 58 años de edad se presenta en su médico con mareos, ha tenido diabetes mellitus durante los últimos 8 años y ha fumado durante la mayor parte de su vida, se ha conocido hipertensión arterial durante los últimos 10 años. La captura de imágenes excluye TIA, en la ecocardiografía tiene una aurícula izquierda dilatada sin formación de trombos, en la presentación su ECG es normal y se registró su ritmo de sinus. Su troponina es de 11 pg/ml, NT-pro BNP es 480 pg/ml. Algunas semanas después, el paciente empieza a tomar Holter ECG y se registra la fibrilación auricular intermitente.

Conclusión:

La identificación de pacientes de ictus con ictus cardioembólico es importante ya que dirige las etapas de diagnóstico adicionales y el tratamiento y lo que es más importante la prevención de futuros ictus. Los péptidos natriuréticos han mostrado utilidad en la detección de candidatos para ictus cardioembólico en pacientes que presentan ictus isquémico. Sin embargo, como se muestra en el presente documento los péptidos natriuréticos pueden cambiar durante el transcurso del ictus limitando su potencial de diagnóstico, lo que no sucede con troponina T que no es objeto de cambio sustancial.

Un razonamiento similar se aplica a la detección de fibrilación auricular intermitente o paroxística. La fibrilación auricular es más frecuente en la población anciana. Ya que los métodos de diagnóstico (Holter ECG y métodos de detección para trombos auriculares resultantes, TEE) tienen disponibilidad limitada es importante la selección de pacientes (inclusión/descarte). Esto puede conseguirse mediante la determinación de troponina T (y NT-pro BNP) y el uso de puntos de corte apropiados.

En conclusión los inventores han identificado troponina T como un método de diagnóstico importante en el ictus isquémico así como en la fibrilación auricular intermitente para dirigir métodos de diagnóstico adicionales y programas de tratamiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diferenciar precozmente si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, que comprende determinar la cantidad de una Troponina cardíaca en una muestra de un sujeto que padece ictus isquémico, en el que la muestra se ha obtenido no más de 6 horas después de la aparición de síntomas de ictus isquémico.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de comparar la cantidad de dicha Troponina cardíaca con una cantidad de referencia, diferenciando de este modo si dicho sujeto padece ictus cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico.
- 15 3. El método de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la muestra se ha obtenido de dicho sujeto no más de 3 horas después de la aparición de síntomas de ictus isquémico.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cantidad de referencia procede de un sujeto que se sabe que padece ictus cardioembólico, y en el que una cantidad idéntica de la Troponina cardíaca, o una cantidad de la Troponina cardíaca que aumenta en comparación con la cantidad de referencia, indica que el sujeto padece ictus cardioembólico, y/o en el que la cantidad de referencia procede de un sujeto que se sabe que padece ictus isquémico no cardioembólico, y en el que una cantidad idéntica de la Troponina cardíaca, o una cantidad de la Troponina cardíaca que se reduce en comparación con la cantidad de referencia, indica que el sujeto padece ictus isquémico no cardioembólico.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la determinación de la cantidad de un péptido natriurético, en particular de un péptido natriurético cerebral, en particular de BNP o NT-proBNP.
- 30 6. El uso de una Troponina cardíaca y/o de un agente de detección, que se une específicamente con la misma en una muestra de un sujeto para diferenciar precozmente si el sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, en el que la muestra se ha obtenido no más de 6 horas después de la aparición de síntomas de ictus isquémico.
- 35 7. Un dispositivo para diferenciar precozmente si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico en un sujeto que padece ictus isquémico, comprendiendo dicho dispositivo:
- 40 a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección para una Troponina cardíaca que permite la determinación de la cantidad de dicha Troponina cardíaca (y, opcionalmente, un agente de detección para un péptido natriurético que permite la determinación de la cantidad de dicho péptido natriurético); y
- 45 b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos que tiene implementado un algoritmo para comparar la cantidad o las cantidades determinadas por la unidad de análisis con cantidad o cantidades de referencia almacenadas en una base de datos para diferenciar si un sujeto padece ictus isquémico cardioembólico o ictus isquémico no cardioembólico, en el que la cantidad de referencia procede de una muestra de un sujeto que se sabe que padece ictus cardioembólico y/o de una muestra de un sujeto que se sabe que padece ictus isquémico no cardioembólico, en el que dicha muestra se ha obtenido no más de 6 horas después de la aparición de síntomas de ictus isquémico, y en el que el algoritmo es el siguiente:
- 50 i) una cantidad idéntica de la Troponina cardíaca, o una cantidad de la Troponina cardíaca que aumenta en comparación con la cantidad de referencia, es indicativa de que un sujeto padece ictus cardioembólico, si la cantidad de referencia procede de un sujeto que se sabe que padece ictus cardioembólico y/o
- ii) una cantidad idéntica de la Troponina cardíaca, o una cantidad de la Troponina cardíaca que se reduce en comparación con la cantidad de referencia, es indicativa de que un sujeto padece ictus isquémico no cardioembólico, si la cantidad de referencia procede de un sujeto que se sabe que padece ictus isquémico no cardioembólico.