

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 197**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2012 PCT/EP2012/002778**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13013758**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2012 E 12732980 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2737320**

54 Título: **Péptido natriurético pro-auricular en la región media (MR-proANP) para la identificación de pacientes con fibrilación auricular con un inicio de menos de 48 horas**

30 Prioridad:

28.07.2011 EP 11352009

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

24.02.2017

73 Titular/es:

**B.R.A.H.M.S GMBH (33.3%)
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE;
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(33.3%) y
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.3%)**

72 Inventor/es:

MEUNE, CHRISTOPHE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 603 197 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

Péptido natriurético pro-auricular en la región media (MR-proANP) para la identificación de pacientes con fibrilación auricular con un inicio de menos de 48 horas

Campo de la invención

- 5 La presente invención está en el campo del diagnóstico clínico. En particular, la presente invención se refiere a la determinación del nivel de péptido natriurético pro-auricular en la región media (MR-proANP) en una muestra derivada de un fluido corporal de un paciente con fibrilación auricular.

Antecedentes de la invención

- 10 La Fibrilación Auricular (FA) es la arritmia cardiaca más frecuente que requiere tratamiento e involucra a las dos cámaras superiores (aurículas) del corazón. Aproximadamente 2,2 millones de personas en Estados Unidos y 4,5 millones en la Unión Europea tienen FA (Camm y col., 2010. Eur Heart J. 31: 2369-2429; Go y col., 2001. JAMA 285: 2370-2375). También representa 1/3 de los ingresos hospitalarios por alteraciones del ritmo cardiaco (Fuster y col., 2006. Circulation 114: e257-354), y la tasa de hospitalizaciones por AF ha aumentado en los últimos años (Friberg y col., 2004. Epidemiology 14: 666-672). La prevalencia de FA aumenta con la edad, de un 0,5 % a los 40-50 años, a un 5-15 % a los 80 años (Camm y col., 2010. Eur Heart J. 31: 2369-2429). La incidencia de fibrilación auricular también aumenta con la edad. En los países desarrollados, es probable que el número de pacientes con fibrilación auricular aumente durante los próximos 50 años, debido al aumento de la proporción de personas de edad avanzada (Go y col., 2001. JAMA 285: 2370-2375).

- 20 Su nombre proviene de la fibrilación (es decir, agitación) de los músculos cardiacos de las aurículas, en lugar de una contracción coordinada. A menudo se puede identificar tomando un pulso y observando que los latidos del corazón no se producen a intervalos regulares. Sin embargo, un indicador más fuerte de la FA es la ausencia de ondas P en un electrocardiograma (ECG o EKG), que normalmente están presentes cuando hay una contracción auricular coordinada al comienzo de cada latido del corazón.

- 25 La FA se asocia con la alteración de la tolerancia y aumento del riesgo de muerte, independientemente de otros factores de riesgo cardiaco (Benjamin y col., 1998. Circulation 98: 946-952). La consecuencia más frecuente y devastadora de la FA es la apoplejía. Las apoplejías por la FA representan un 6-24 % de las apoplejías isquémicas (Narumiya y col., 2003. Circulation Journal 67 (1): 68-72). La cardioversión eléctrica y farmacológica de la FA se puede complicar con la apoplejía después del restablecimiento de una actividad mecánica auricular (Camm y col., 2010. Eur Heart J. 31: 2369-2429; Halperin y col., 1988. Stroke 19: 937-941).

- 30 El American College of Cardiology (ACC), la American Heart Association (AHA), y la European Society of Cardiology (ESC) recomiendan en sus directrices el siguiente sistema de clasificación basado en la simplicidad y la relevancia clínica (Fuster y col., 2006. Circulation 114: e257-354). Inicialmente, todos los pacientes con fibrilación auricular están en la categoría denominada primera FA detectada. Estos pacientes pueden o no haber tenido episodios previos no detectados. Si un primer episodio detectado auto-termina en menos de 7 días y a continuación otro episodio comienza más tarde, el caso se ha desplazado a la categoría de FA paroxística. Aunque los pacientes de esta categoría tienen episodios que duran hasta 7 días, en la mayoría de los casos de FA paroxística los episodios se auto-terminan en menos de 24 horas. Si por el contrario el episodio tiene una duración de más de 7 días, la auto-terminación es poco probable (Levy 2000 Curr Opin Cardiol. 15: 54-57) y se denomina FA persistente. En este caso, el episodio se puede terminar mediante la cardioversión. Si la cardioversión no se realiza de forma satisfactoria o no se intenta, y el episodio está en curso desde hace mucho tiempo (por ejemplo, un año o más), la FA del paciente se denomina permanente.

- Además de las cuatro categorías de FA mencionadas anteriormente, que se definen principalmente por el tiempo y la terminación del episodio, las directrices de ACC/AHA/ESC describen categorías de FA adicionales en función de otras características del paciente (Fuster y col., 2006. Circulation 114: e257-354): Fibrilación auricular solitaria (LAF) - ausencia de hallazgos clínicos o ecocardiográficos de otra enfermedad cardiovascular (incluyendo hipertensión), enfermedad pulmonar relacionada, o anomalías cardiacas tales como agrandamiento de la aurícula izquierda, y edad inferior a 60 años; FA no valvular - ausencia de enfermedad reumática de la válvula mitral, una válvula cardiaca protésica, o reparación de la válvula mitral; FA secundaria - se produce en el contexto de una afección primaria que puede ser la causa de la AF, tales como infarto agudo de miocardio, cirugía cardiaca, pericarditis, miocarditis, hipertiroidismo, embolia pulmonar, neumonía u otra enfermedad pulmonar aguda.

- La fibrilación auricular normalmente va acompañada por síntomas relacionados con un ritmo cardiaco rápido. Los ritmos cardiacos rápidos e irregulares se pueden percibir como palpitaciones, intolerancia al ejercicio, y en ocasiones producen angina de pecho (si la tasa es más rápida y pone al corazón en tensión) y síntomas congestivos de falta de respiración o edema. En ocasiones, la arritmia se identificara solamente con la aparición de una apoplejía o un ataque isquémico transitorio (TIA). No es raro que un paciente sea consciente de la FA por primera vez a partir de un examen físico de rutina o ECG, ya que puede ser asintomática en muchos casos (Fuster y col., 2006. Circulation 114: e257-354).

Como la mayoría de los casos de fibrilación auricular son secundarios a otros problemas médicos, la presencia de dolor en el pecho o angina de pecho, síntomas de hipertiroidismo (una glándula tiroides hiperactiva) tales como pérdida de peso y diarrea y síntomas sugestivos de enfermedad pulmonar podría indicar una causa subyacente. Una historia previa de apoplejía o TIA, así como hipertensión (presión arterial elevada), diabetes, insuficiencia cardíaca y fiebre reumática, puede indicar si alguien con FA está en un riesgo más elevado de complicaciones (Fuster y col., 2006. *Circulation* 114: e257-354).

La fibrilación auricular se puede tratar con medicamentos que, o bien disminuyen la frecuencia cardíaca o revierten el ritmo cardíaco a la normalidad. La cardioversión es una conversión no invasiva de un latido irregular del corazón a un latido cardíaco normal usando medios eléctricos o químicos (Fuster y col., 2006. *Circulation* 114: e257-354). También se pueden usar terapias quirúrgicas y basadas en catéter para prevenir la recurrencia de la FA en ciertos individuos. A menudo, a las personas con FA se les administran anticoagulantes tales como aspirina, heparina, warfarina o dabigatrán para protegerlos de apoplejía.

La duración de la FA se vuelve importante cuando se está considerando la cardioversión, y en general se acepta que los pacientes con un episodio de FA de menos de 48 horas pueden experimentar una cardioversión inmediata de forma segura mientras que los pacientes con una FA > 48 horas se tienen que tratar con anticoagulantes durante más de 3 semanas o se tienen que someter a un ecocardiograma transesofágico (TEE) antes de la cardioversión (Camm y col., 2010. *Eur Heart J*. 31: 2369-2429; Fuster y col., 2006. *Circulation* 114: e257-354; Page y col., 2004. *NEJM* 351:2408-2416; Klein y col., 2001. *NEJM* 344:1411-1420; Jessup y col., 2009. *Circulation* 119:1977-2016). La duración de la FA se puede determinar en pacientes que informan de palpitaciones agudas, disnea o síncope. Sin embargo, la FA asintomática o silenciosa se produce con frecuencia (Savelieva y col., 2000. *Pacing clin Electrophysiol* 23: 145-148): en el registro canadiense de FA, un 21 % de los pacientes con diagnóstico de FA reciente eran asintomáticos (Kerr y col., 1996. *Eur Heart J* 17 Supl C: 48-51). En otro estudio, un 17 % de los pacientes tenían episodios asintomáticos de FA antes de que observaran síntomas relacionados con la FA (Page y col., 2003. *Circulation* 107: 1141-5). En general, la determinación clínica de la duración de la FA, inferior o superior a 48 h, a menudo podría ser peligrosa en la práctica clínica señalando la necesidad de nuevas herramientas para ayudar a los expertos en medicina en la determinación precisa de la duración de la FA antes de su presentación.

Algunos estudios previos han sugerido el posible mérito de algunos biomarcadores, principalmente péptidos natriuréticos de tipo B, en la estratificación del riesgo de los pacientes con FA o la predicción de aparición de FA (Deffereos y col., 2010. *Heart* 96: 1033-1036; Jourdain y col., 2002. *Eur J Heart Fail* 4: 263-267; Maisel y col., 2002. *NEJM* 347: 161-167; Thejus y col., 2009. *Indian Pacing Electrophysiol J* 9: 1-4). Deffereos y colaboradores informaron que algunos pacientes con AF de menos de 24 h y sin insuficiencia cardíaca tienen un patrón particular de fluctuaciones de NT-proBNP que se caracteriza por un aumento progresivo en las primeras 24 h seguido de un rápido descenso (Deffereos y col., 2010. *Heart* 96: 1033-1036). Éstos llegaron a la conclusión de que la obtención de dos a tres niveles de NT-proBNP en plasma dentro de las 24 horas de presentación en pacientes con FA sin insuficiencia cardíaca, que no pueden determinar de forma satisfactoria el tiempo de inicio, puede ayudar a determinar si la aparición de la arritmia era reciente, y que una información de este tipo podría ser relevante para las decisiones con respecto a anticoagulación y cardioversión. Sin embargo, la clasificación de los pacientes basándose en tales fluctuaciones de NT-proBNP puede ser peligrosa en la práctica clínica y necesitan una vigilancia prolongada de los pacientes antes de llegar a una decisión. Por el contrario, Tsuchida y Tanabe demostraron que el BNP ya era elevado inmediatamente dentro de las 4 horas después de la aparición de FA y que el nivel de BNP no se correlacionada de forma significativa con el tiempo transcurrido después de la aparición de FA (Tsuchida y Tanabe 2004. *J Cardiol* 44:1-11). También se ha informado que los niveles de ANP disminuyen durante la FA de larga duración (van den Berg y col., 2004. *Europace* 6: 433-437).

Sumario de la invención

Un objeto de la invención es un procedimiento para la determinación del tiempo desde el comienzo de la fibrilación auricular hasta su presentación en un paciente de acuerdo con la reivindicación 1.

En las reivindicaciones dependientes se describen variantes preferentes del procedimiento.

Descripción detallada de la invención

La fibrilación auricular (FA) se define como ritmo cardíaco irregular anómalo con generación irregular de señales eléctricas en las aurículas del corazón que se pueden identificar tomando un pulso y observando que los latidos del corazón no se producen a intervalos regulares y/o realizando un electrocardiograma (ECG o EKG) en el que la ausencia de ondas P, que normalmente están presentes cuando hay una contracción auricular coordinada al comienzo de cada latido del corazón, es indicativa de FA.

La cardioversión es un procedimiento médico mediante el que un ritmo cardíaco anormalmente elevado o arritmia cardíaca se convierte en un ritmo normal, usando electricidad. Profármacos (Shea y col., 2002. *Circulation* 106: e176-178). La cardioversión eléctrica sincronizada usa una dosis terapéutica de corriente eléctrica en el corazón, en un tiempo específico o en el ciclo cardíaco. La cardioversión farmacológica, también denominada cardioversión química, usa medicación antiarritmia en lugar de shock eléctrico.

Para realizar la cardioversión eléctrica sincronizada, se usaron dos almohadillas de electrodo (o, como alternativa, las tradicionales "palas" portátiles), cada una comprendiendo una placa metálica que se enfrenta a un gel conductor con base de solución salina. Las almohadillas se colocan en el pecho del paciente, o una se coloca en el pecho y una en la espalda. Estas están conectadas por cables a una máquina que tiene las funciones combinadas de una pantalla de visualización de ECG y la función eléctrica de un desfibrilador. Una función de sincronización (ya sea operado de forma manual o automática) permite que el cardioversor administre una descarga de reversión, por medio de las almohadillas, de una cantidad seleccionada de corriente eléctrica durante un número de milisegundos definido previamente en el tiempo óptimo en el ciclo cardiaco que corresponde a la onda R del complejo QRS en el ECG. El tiempo desde la descarga hasta la onda R impide la administración de la descarga durante el periodo vulnerable (o periodo refractario relativo) del ciclo cardiaco, lo que podría inducir fibrilación ventricular. Si el paciente está consciente, a menudo se usa diversos medicamentos para ayudar a sedar al paciente y hacer el procedimiento más tolerable. Sin embargo, si el paciente está hemodinámicamente inestable o inconsciente, la descarga se da inmediatamente después de la confirmación de la arritmia. Cuando la cardioversión eléctrica sincronizada se realiza como un procedimiento de elección, las descargas se pueden realizar en combinación con la terapia farmacológica hasta que se alcanza el ritmo sinusal. Después del procedimiento, se vigila al paciente para asegurar la estabilidad del ritmo sinusal. La cardioversión eléctrica sincronizada se usa para tratar taquicardias supraventriculares hemodinámicamente significativas (o de complejo estrecho), incluyendo fibrilación auricular y aleteo auricular. También se usa en el tratamiento emergente de taquicardias complejas amplias, incluyendo taquicardia ventricular, cuando un pulso está presente. La taquicardia ventricular sin pulso y la fibrilación ventricular se tratan con descargas no sincronizadas denominadas desfibrilación. La terapia eléctrica no es apropiada para la taquicardia sinusal, que siempre debería ser una parte del diagnóstico diferencial.

Se pueden usar diversos agentes antiarrítmicos para devolver el corazón al ritmo sinusal normal. La cardioversión farmacológica es una buena opción, especialmente en pacientes con fibrilación de inicio reciente. Los fármacos que son eficaces para el mantenimiento del ritmo normal después de la cardioversión eléctrica, también se pueden usar para la cardioversión farmacológica. Los fármacos tales como amiodarona, diltiazem, verapamilo y metoprolol se administran frecuentemente antes de la cardioversión para disminuir el ritmo cardiaco, estabilizar al paciente y aumentar la probabilidad de éxito de la cardioversión. Hay dos clases de agentes que son los más eficaces para la cardioversión farmacológica. Los agentes de la Clase I son bloqueantes de canales de sodio (Na) (que disminuyen la conducción mediante el bloqueo del canal de Na⁺) y se dividen en 3 subclases, a, b y c: la Clase Ia ralentiza la despolarización de fase 0 en los ventrículos y aumenta el periodo refractario absoluto. Procainamida, quinidina y disopiramida son agentes de la Clase Ia. Los fármacos de la Clase Ib acortan la repolarización de la fase 3. Éstos incluyen lidocaína, mexiletina y fenitoina y por último los fármacos de la Clase Ic disminuyen en gran medida la despolarización de fase 0 de los ventrículos (sin embargo a diferencia de Ia no tienen ningún efecto en el periodo refractario). Flecainida, moricizina y propafenona son agentes de la Clase Ic. Los agentes de la Clase II son beta bloqueantes que inhiben la despolarización del nodo de SA y AV y disminuyen el ritmo cardiaco. También disminuyen la demanda de oxígeno cardiaco y pueden prevenir la remodelación cardiaca. No todos los beta bloqueantes son iguales, algunos son cardioselectivos (influyendo solamente en los receptores beta 1), otros no son selectivos (influyendo en los receptores beta 1 y 2). Los beta bloqueantes que se dirigen al receptor beta-1 se denominan cardioselectivos porque beta-1 es responsable del aumento del ritmo cardiaco; por lo tanto un beta bloqueante disminuirá el ritmo cardiaco. Los agentes de la Clase III prolongan la repolarización mediante el bloqueo de la corriente de K⁺ hacia el exterior. Amiodarona y sotalol son agentes de la Clase III eficaces. La ibutilida es otro agente de la Clase III, pero tiene un mecanismo de acción diferente (actúa para estimular el flujo de sodio a través de los canales de sodio lentos). Se ha demostrado que es eficaz en la cardioversión aguda de la fibrilación auricular de inicio reciente y en el aleteo auricular. Los fármacos de la Clase IV son bloqueantes de los canales de calcio (Ca). Éstos actúan inhibiendo el potencial de acción de los nodos de SA y AV.

Una estrategia de cardioversión guiada por ecocardiografía transesofágica (TEE) se recomienda como una alternativa a anticoagulación de cardioversión previa de 3 semanas si hay disponibilidad de personal con experiencia e instalaciones adecuadas, y, cuando se necesite una cardioversión temprana, los anticoagulantes orales previos a la cardioversión no están indicados debido a la elección del paciente o riesgos potenciales de sangrado, o cuando existe un riesgo elevado de trombo en la aurícula izquierda/en el apéndice de la aurícula izquierda (Klein y col., 2001. NEJM 344: 1411-1420). Una TEE es una forma alternativa para realizar un ecocardiograma. Una sonda especializada que contiene un transductor de ultrasonidos en su punta se introduce en el esófago del paciente. Esto permite la evaluación de imágenes y Doppler que se pueden registrar.

El aumento del riesgo de tromboembolismo después de cardioversión está bien reconocido. Por lo tanto, la anticoagulación se considera obligatoria antes de una cardioversión electiva para la FA > 48 h o FA de duración desconocida. La trombopprofilaxis se recomienda para la cardioversión eléctrica y farmacológica de la FA > 48 h. En pacientes con un inicio de FA definido < 48 h, la cardioversión se puede realizar de forma conveniente bajo la cobertura de heparina no fraccionada administrada i.v. seguido por heparina de bajo peso molecular en infusión o por vía subcutánea. En los pacientes con factores de riesgo de apoplejía (por ejemplo, insuficiencia cardiaca, hipertensión, edad, diabetes, apoplejía previa o TIA), la terapia con anticoagulantes orales se debería iniciar después de la cardioversión y debería continuar durante toda la vida. En pacientes sin factores de riesgo de tromboembolismo no se requiere ningún anticoagulante oral.

- Un anticoagulante es una sustancia que impide la coagulación; es decir, que evita que la sangre se coagule. Un grupo de agentes farmacéuticos denominados anticoagulantes se puede usar *in vivo* como un medicamento para trastornos tromboticos. Los anticoagulantes orales incluyen cumarinas (antagonistas de la vitamina K), por ejemplo, warfarina acenocumarol y femprocumon o fenindiona. La heparina anticoagulante se puede usar mediante inyección.
- 5 La heparina y sus derivados de bajo peso molecular (por ejemplo, enoxaparina, dalteparina, tinzaparina) son eficaces en la prevención de la trombosis venosa profunda y embolia pulmonar en pacientes de riesgo al evitar la formación de coágulos y la extensión de los coágulos existentes dentro de la sangre. Otro tipo de anticoagulante es el inhibidor directo de la trombina. Los miembros actuales de esta clase incluyen argatrobán, lepirudina, bivalirudina y dabigatrán.
- 10 De acuerdo con la invención, se determina que el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación en un paciente es superior o inferior a un cierto valor límite de tiempo, en el que se determina que el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación en un paciente es de 48 horas o superior o inferior a 48 horas. En una realización preferente de la invención, se determina que el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación en un paciente es de 24 horas o superior o inferior a 24 horas.
- 15 En una realización preferente de la invención, cuando se determina que el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación en dicho paciente es inferior a dicho valor límite de tiempo, éste se toma como indicador de que al paciente se le debería aplicar una cardioversión inmediata.
- En otra realización preferente de la invención, cuando se determina que el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación en dicho paciente está en o por encima de dicho valor límite de tiempo, éste se toma como un indicador de que el paciente se debería tratar con anticoagulantes y/o se debería someter a ecocardiograma transesofágico (TEE) antes de la cardioversión.
- 20 Además, en otra realización preferente de la invención, la cardioversión es preferentemente cardioversión eléctrica y/o farmacológica.
- El péptido natriurético auricular (ANP), un miembro de la familia de péptidos natriuréticos, regula varios parámetros fisiológicos incluyendo diuresis y natriuresis, y presión sanguínea arterial menor (BP). Se produce predominantemente en la aurícula del corazón y comprende un 98 % de los péptidos natriuréticos en la circulación (Vesely DL. *Life* 2002; 53:153-159). El ANP se obtiene a partir de la escisión de su precursor pro-hormona, que es significativamente más estable en la circulación que el péptido maduro. Un fragmento en la región media de la hormona precursora (aminoácidos 53-90 de NT-proANP), denominado región media-proANP (MR-proANP), puede ser relativamente resistente a la degradación por exoproteasas, a diferencia de los epítomos en los extremos N- o C-terminales de proANP usados en inmunoensayos previos (Morgen-thaler NG y col., *Clin Chem* 2004; 50: 234-236; Gerszten RE y col., 2008. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*).
- 25 En una realización preferente de la invención, el nivel de MR-proANP (SEQ ID NO: 4) se determina usando al menos un anticuerpo dirigido contra MR-proANP (SEQ ID NO: 4).
- 30 En una realización en particular de la invención, además se determina al menos un parámetro clínico que puede influir en el nivel de MR-proANP en dicho paciente. Este parámetro clínico se selecciona preferentemente entre el grupo que comprende edad, sexo, comorbilidad e índice de masa corporal (IMC), lo más preferentemente entre edad e IMC. Por ejemplo, se sabe que el nivel de proANP aumenta con el aumento de la edad. Este nivel más elevado se debería tener en cuenta cuando se fijan los valores límite para pacientes de edades más elevadas. En conexión con estos parámetros clínicos se puede hacer referencia a Morgen-thaler y col., *Clin Chem*. 2004, 234; Gegenhuber y col., *Clin Chem*. 2006, 827; Gegenhuber y col., *J Card Fail*. 2007, 42; von Haehling y col., *J Am Coll Cardiol*. 2007, 1973; Khaleghi y col., *Am J Cardiol*. 2009, 1257; Krueger y col., *Intensive Care Med*. 2007, 2069; y Mueller y col., *J Intern Med*. 2006, 568.
- 35 También es posible y puede mejorar la fiabilidad de los resultados para determinar o más biomarcadores además de MR-proANP, especialmente biomarcadores relacionados con la fibrilación auricular o enfermedades cardiovasculares en general. Los ejemplos preferentes de tales biomarcadores adicionales son pro-BNP y fragmentos del mismo, en particular NT-proBNP y/o BNP. En este sentido, se puede hacer referencia a los documentos WO 2008/077396 A1 y WO 2008/106938 A2.
- 40 Como se menciona en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a proteínas o péptidos más pequeños que se pueden obtener a partir de proteínas o péptidos más grandes, que por lo tanto comprenden una secuencia parcial de la proteína o péptido de mayor tamaño. Los fragmentos de este tipo se pueden obtener a partir de las proteínas o tejidos de mayor tamaño mediante la saponificación de uno o más de sus enlaces peptídicos. Dichos fragmentos son cualquier fragmento que se pueda obtener a partir de la prohormona de ANP (proANP; SEQ ID NO: 1). Estos fragmentos de proANP se refieren preferentemente a fragmentos con una longitud de al menos 6
- 45 aminoácidos, lo más preferentemente restos de al menos 12 aminoácidos de longitud. Los fragmentos conocidos de proANP incluyen ANP (SEQ ID NO: 2), NT-proANP (SEQ ID NO: 3) y MR-proANP (SEQ ID NO: 4). Los fragmentos de este tipo se pueden detectar preferentemente con ensayos inmunológicos como se describe en el presente documento.
- 50
- 55

Como se menciona en el presente documento, un "ensayo" o "ensayo de diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Un ensayo de este tipo se puede basar en la unión de un analito a detectar a una o más ondas de captura con una cierta afinidad. Con respecto la interacción entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés, la constante de afinidad es preferentemente superior a 10^8 M^{-1} .

5 En el contexto de la presente invención, las "moléculas de captura" son moléculas que se pueden usar para unirse a moléculas diana o moléculas de interés, es decir, analitos (es decir, en el contexto de la presente invención, el péptido(s) cardiovascular), de una muestra. Por lo tanto, a las moléculas de captura se les debe dar una forma adecuada, tanto ciberespacio como en términos de características de superficie, tal como carga de superficie, hidrofobia, hidrofilia, presencia o ausencia de dadores y/o aceptores de Lewis, para unirse de forma específica a las
10 moléculas diana o moléculas de interés. Por la presente, la unión puede estar mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, van der Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrófobas o enlace de hidrógeno o una combinación de dos o más de las interacciones mencionadas anteriormente entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, las moléculas de captura se pueden seleccionar por ejemplo, entre el grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula
15 de PNA, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glicoproteína. Preferentemente, las moléculas de captura son anticuerpos, incluyendo fragmentos de los mismos por una afinidad suficiente con respecto a una diana o molécula de interés, e incluyen anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo recombinante, así como derivados modificados de forma química y/o bioquímica de dichos anticuerpos o fragmentos obtenidos a partir de la cadena variante con una longitud de al menos 12 aminoácidos de la misma.

20 Los procedimientos de detección preferentes comprenden inmunoensayos en diversos formatos tales como por ejemplo radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, inmunoensayos unidos a enzimas (ELISA), matrices de perlas basadas en Luminex, ensayos de micromatriz de proteína, y formatos de ensayo rápido, tales como por ejemplo ensayos de tira inmunocromatográfica.

Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos competitivos o no competitivos. En una
25 realización particularmente preferente, el ensayo está en forma de un ensayo de tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en el que la molécula a detectar y/o cuantificarse une a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo se puede unir a una fase sólida, por ejemplo una perla, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que está etiquetado, por ejemplo, con un colorante, con un radioisótopo, o un resto reactivo o catalíticamente activo. La cantidad de anticuerpo etiquetado unido al analito se mide a continuación mediante un procedimiento apropiado. La composición y los procedimientos generales involucrados en los " ensayos de tipo sándwich" están bien establecidos y son conocidos por la persona experta (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª ed. (mayor
30 de 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hult-schig C y col., Curr Opin Chem Biol. Febrero de 2006; 10 (1): 4-10, PMID: 16376134).

35 En una realización particularmente preferente, el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferentemente anticuerpos que están presentes tanto como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en la que un primer componente de etiquetado se une a la primera molécula de captura, en la que dicho primer componente de etiquetado forma parte de un sistema de etiquetado basado en inactivación o amplificación por fluorescencia o quimioluminiscencia, como un segundo componente de etiquetado de dicho sistema de etiquetado se une a la
40 segunda molécula de captura, de modo que después de la unión de ambas moléculas de captura al analito se genera una señal que se puede medir que permiten la detección de los complejos de tipo sándwich formados en la solución que comprende la muestra.

Incluso más preferentemente, dicho sistema de etiquetado comprende criptatos de tierras raras o quelatos de tierras raras en combinación con un colorante fluorescente o colorante quimioluminiscente, en particular un colorante del
45 tipo cianina. En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia comprenden el uso de colorantes, que se pueden seleccionar por ejemplo entre el grupo que comprende FAM (5- o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, colorantes de cianina, tales como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G (RG6), rodamina, verde de rodamina, rojo de rodamina, rodamina 110, colorantes BODIPY, tales como BODIPY TMR, Verde Oregon, cumarinas, tales como umbeliferona, benzoimidaz, tales como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como Rojo Texas, Amarillo Yakima, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina, y similares.

55 En el contexto de la presente invención, los ensayos basados quimioluminiscencia comprenden el uso de colorantes, basándose en los principios químicos que se describen para materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4ª ed., director ejecutivo, J. 1. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol. 15, p. 518-562, incluyendo menciones en las páginas 551-562. Los colorantes quimioluminiscentes preferentes son ésteres de acridinio.

60

Incluso más preferentemente, dicho sistema de etiquetado comprende criptatos de tierras raras o relatos de tierras raras en combinación con colorante fluorescente.

5 El término "paciente", como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo humano o no humano vivo que está recibiendo atención médica o que debería recibir atención médica debido a una enfermedad. Este término incluye a personas que no tienen una enfermedad definida que se están investigando en busca de signos de patología.

10 El término "muestra" como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra de fluido corporal obtenida con el fin de diagnóstico, pronóstico o evaluación de un sujeto de interés, tal como un paciente. Las muestras de ensayo preferentes incluyen sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, esputo, y efusiones pleurales. Además, un experto en la materia podría darse cuenta de que algunas muestras de ensayo se podrían analizar más fácilmente después de un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo, separación de sangre completa en componentes de suero o plasma.

15 Por lo tanto, en una realización preferente de la invención, la muestra se selecciona entre el grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de saliva y una muestra de orina o un extracto de cualquiera de las muestras mencionadas anteriormente. Preferentemente, la muestra es una muestra de sangre, lo más preferentemente una muestra de suero o una muestra de plasma.

20 Cuando sea apropiado, puede ser necesario homogeneizar la muestra, o extraerla con un disolvente antes de su uso en la presente invención con el fin de obtener una muestra líquida. Por la presente, una muestra líquida puede ser una solución o suspensión. Las muestras líquidas se pueden someter a uno o más tratamientos previos antes de su uso en la presente invención. Tales tratamientos previos incluyen, pero no se limitan a, dilución, filtración, centrifugación, concentración, sedimentación, precipitación, diálisis. Los tratamientos previos también pueden incluir la adición de sustancias químicas o bioquímicas a la solución, tales como ácidos, bases, tampones, sales, disolventes, colorantes reactivos, detergentes, agentes emulgentes, quelantes.

25 La sensibilidad y especificidad de un ensayo de diagnóstico y/o pronóstico depende de algo más que simplemente la "calidad" analítica del ensayo, y además también dependen de la definición de lo que constituye un resultado anómalo. En la práctica, las curvas Características de Funcionamiento del Receptor (curvas ROC), por lo general se calculan representando el valor de una variable en comparación con su frecuencia relativa en poblaciones "normales" (es decir, aparentemente sanas) y "enfermas" (es decir, pacientes que padecen fibrilación auricular).
 30 Para cualquier marcador en particular, una distribución de los niveles de los marcadores para los sujetos con y sin una enfermedad probablemente se superpondrá. En tales condiciones, un ensayo no distingue absolutamente normal de enfermedad con una precisión de un 100 %, y el área de superposición indica cuándo el ensayo no puede distinguir la normalidad de la enfermedad. Se selecciona un umbral, por encima del cual (o por debajo del cual, dependiendo de cómo cambia un marcador con la enfermedad), se considera que el ensayo es anómalo y por debajo del cual se considera que el ensayo es normal. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permitirá la identificación correcta de una afección. Las curvas ROC se pueden usar incluso cuando los resultados del ensayo no proporcionan necesariamente un número exacto. Siempre y cuando se puedan clasificar los resultados, se puede crear una curva ROC. Por ejemplo, los resultados de un ensayo sobre muestras de "enfermedad" se podrían clasificar de acuerdo al grado (por ejemplo, 1 = bajo, 2 = normal, y 3 = elevado). Esta clasificación se puede correlacionar con resultados en la población "normal", y se crea una curva de ROC. Estos procedimientos se conocen bien en la técnica (Véase, por ejemplo, Hanley y col., 1982. Radiology 143: 29-36). Preferentemente, una curva ROC da como resultado un área bajo la curva (AUC) superior a aproximadamente 0,5, más preferentemente superior a aproximadamente 0,7, aún más preferentemente superior a aproximadamente 0,8, incluso más preferentemente superior a aproximadamente 0,85, y lo más preferentemente superior a aproximadamente 0,9. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5 % de una medición dada.

50 El eje horizontal de la curva ROC representa (especificidad 1), que aumenta con la tasa de falsos positivos. El eje vertical de la curva representa la sensibilidad, que aumenta con la tasa de positivos verdaderos. Por lo tanto, para un valor límite en particular seleccionado, el valor de (especificidad 1) se puede determinar, y se puede obtener una sensibilidad correspondiente. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que el nivel del marcador medido permita la identificación correcta de una enfermedad o afección. Por lo tanto, el área bajo la curva ROC se puede usar para determinar la eficacia del ensayo.

55 En ciertas realizaciones, el marcador o combinación de marcadores presenta una sensibilidad de al menos aproximadamente un 70 %, más preferentemente una sensibilidad de al menos aproximadamente un 80 %, incluso más preferentemente una sensibilidad de al menos aproximadamente un 85 %, aún más preferentemente una sensibilidad de al menos aproximadamente un 90 %, y lo más preferentemente una sensibilidad de al menos aproximadamente un 95 %, en combinación con una especificidad de al menos aproximadamente un 70 %, más preferentemente una especificidad de al menos aproximadamente un 80 %, incluso más preferentemente a una especificidad de al menos aproximadamente un 85 %, aún más preferentemente una especificidad de al menos aproximadamente un 90 %, y lo más preferentemente una especificidad de al menos aproximadamente un 95 %. En

realizaciones particularmente preferentes, tanto la sensibilidad, la especificidad son de al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 80 %, incluso más preferentemente al menos un 85 %, aún más preferentemente al menos un 90 %, y lo más preferentemente al menos un 95 %. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5 % de una medición dada.

5 Los niveles umbral se pueden obtener por ejemplo a partir de un análisis de Kaplan-Meier, en el que la aparición de una enfermedad se correlaciona con los cuartiles de los marcadores en la población. De acuerdo con este análisis, los sujetos con los niveles de marcador por encima del percentil 75 tienen una probabilidad significativamente mayor de pertenecer al grupo que tiene un tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación por debajo de un cierto tiempo de valor límite. Este resultado se ve apoyado además por el análisis de regresión de Cox ajuste total de los factores de riesgo clásicos: El cuartil más elevado con respecto a los demás sujetos está asociado de forma altamente significativa con el intervalo de tiempo por debajo de cierto valor límite de tiempo.

10 Otros valores límites preferentes son por ejemplo, el percentil 90, 95 o 99 de una población normal. Mediante el uso de un percentil más elevado que el percentil 75, se reduce el número de sujetos de falso positivo identificados, pero se podía fallar en la identificación de los sujetos, que presentan un riesgo moderado, aunque a un elevado. Por lo tanto, el valor límite se podría adoptar en función de lo que se considera más apropiado para identificar a la mayor parte de los sujetos en riesgo en detrimento de identificar también los "falsos positivos", o si se considera más apropiado para identificar principalmente a los sujetos con un riesgo elevado en detrimento de perder varios sujetos con riesgo moderado.

15 Otras posibilidades matemáticas para calcular el riesgo de un individuo mediante el uso del valor del nivel del marcador del individuo y otros parámetros de laboratorio de y clínicos de pronósticos son, por ejemplo, el NRI (Índice de Reclasificación Neta) o el IDI (Índice de Discriminación Integrada). Los índices se pueden calcular de acuerdo con Pencina (Pencina MJ, y col.: Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. Stat Med. 2008; 27: 157-172).

20 De acuerdo con el procedimiento, en el que se diagnostica que el paciente tiene un tiempo que transcurre desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación < 48 h cuando dicho nivel determinado de proANP o fragmentos del mismo, especialmente el nivel de MR-proANP, es inferior a un nivel umbral determinado previamente. Preferentemente, el nivel umbral determinado previamente está entre 100 y 350 pmol/l, más preferentemente entre 100 pmol/l y 250 pmol/l, incluso más preferentemente entre 100 pmol/l y 190 pmol/l, lo más preferentemente entre 100 pmol/l y 160 pmol/l.

25 Los valores mencionados anteriormente podrían ser diferentes en otros ensayos que detectan proANP o fragmentos del mismo, si éstos se han calibrado de forma diferente. En consecuencia, los valores mencionados anteriormente se aplicarán para tales ensayos de proANP calibrados de forma diferente, teniendo en cuenta las diferencias de calibración. Una posibilidad de cuantificación de la diferencia de la calibración es un procedimiento de análisis de comparación (correlación) del ensayo de proANP en cuestión con el ensayo de MR-proANP usado en la presente invención midiendo proANP o fragmentos del mismo en muestras usando ambos procedimientos. No hay que iniciar otra posibilidad es determinar, con el ensayo de proANP en cuestión, dado que este ensayo tiene una sensibilidad analítica suficiente, el nivel medio de proANP de una población normal representativa, comparar los resultados con los niveles medios de analito como se describe en el presente documento y volver a calcular la calibración basándose en la diferencia obtenida con esta comparación.

40 **Descripción de las figuras**

La invención se describirá a continuación con más detalle con referencia a las figuras adjuntas y los siguientes ejemplos. En las figuras

45 La Figura 1 muestra una curva de funcionamiento del receptor para MR-proANP y NT-proBNP asociada con el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación inferior a 48 horas, y La Figura 2 muestra una curva de funcionamiento del receptor para MR-proANP y NT-proBNP asociada con el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación inferior a 24 horas.

Ejemplos

Diseño del estudio y población

50 Desde junio de 2010 hasta septiembre de 2010, los pacientes consecutivos que se remitieron al departamento de cardiología del Hospital Cochin para el tratamiento de la FA se consideraron para su inclusión. La FA se definió basándose en el ECG como una arritmia cardíaca irregular con un intervalo RR (el tiempo entre dos ondas R consecutivas en un electrocardiograma), ninguna onda P distinta, y una longitud del ciclo auricular (cuando es visible) variable y < 200 ms. Los criterios de exclusión fueron: 1) FA como una complicación de una afección aguda (es decir, infarto agudo de miocardio, después de cirugía, sepsis, insuficiencia respiratoria aguda), 2) pacientes con insuficiencia renal grave (eliminación de creatinina < 30 ml/min), y 3) pacientes que presentaban FA e insuficiencia cardíaca descompensada aguda simultánea clínicamente sospechosa basándose en la falta de respiración (nueva o empeoramiento) y confirmara necesariamente de acuerdo con las directrices actuales (Jessup y col., 2009).

Circulation 119: 1977-2016). Los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito, y el comité de ética local aprobó el protocolo.

Evaluación y gestión clínica de rutina

5 Además de la historia clínica, examen físico y ECG de 12 derivaciones, todos los pacientes se sometieron a 1) radiografía de tórax, 2) ensayos de sangre convencionales que incluían ensayos serológicos de medición de la función tiroidea y enzimas hepáticas, y 3) ecocardiografía transtorácica (TTE) realizada por un cardiólogo con experiencia usando un sistema de ATL HDI 5000 (ultrasonidos de ATL y Bothell, Washington, DC) de acuerdo con las directrices de la American Society of Echocardiography.

10 La decisión de realizar la TEE y la elección entre una estrategia de control del ritmo con cardioversión o una estrategia de control de la tasa se dejó de acuerdo con el criterio del médico. Los pacientes para los que se consideraba que una cardioversión se tenía que tratar durante al menos 3 semanas con anticoagulantes orales o que tenían que someterse a TEE, de acuerdo con las recomendaciones actuales (Camm y col., 2010. Eur Heart J. 31: 2369-2429; Fuster y col., 2006. Circulation 114: e257-354).

Evaluación del tiempo de inicio hasta la presentación

15 La AF se clasificó como paroxística, persistente o de larga duración y el tiempo de inicio lo determinaron de forma independiente 2 cardiólogos de acuerdo con los siguientes puntos: 1) el inicio de los síntomas informados por el paciente (principalmente palpitaciones), 2) los posibles ECG previos dentro y fuera del hospital y resultados de control de 24 holter, y 3) el último ritmo cardíaco observado por los médicos fuera del hospital a cargo de los pacientes (incluyendo el médico general). Las discrepancias fueron resueltas por un tercer cardiólogo.

Análisis Bioquímico

20 Las muestras de sangre se recogieron en tubos de plástico que contenían Li⁺-heparinato, y el plasma se almacenó a -80 °C antes del análisis. Las muestras de sangre se recogieron en el tiempo de su presentación, en un paciente en posición supina durante al menos 30 min, a partir de una vena antecubital periférica. El MR-proANP se midió usando el analizador Kryptor (B.R.A.H.M.S GmbH, Hennigsdorf, Alemania). Este fluoroinmunoensayo usa la tecnología de Emisión de Criptato Amplificada en Tiempo Resuelto (TRACE), que se basa en una transferencia de energía no radiactiva de una molécula dadora (criptato) a una molécula aceptora (XL665) como resultado de una reacción inmunológica completada. Las características analíticas del procedimiento se han evaluado y descrito en cualquier parte. En el laboratorio de los inventores, se encontró que los coeficientes de variación (CV) eran < 5 %: 3,4 % a 419,0 pmol/l y 3,7 % a 89,2 pmol/l (Chenevier-Gobeaux y col., 2010. Clin Chem 56: 1708-1717).

30 Los niveles de NT-proBNP en plasma se midieron usando un ensayo de inmunofluorescencia disponible en el mercado (Elecsys proBNP, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El ensayo tiene una sensibilidad funcional de 30 pg/ml, con un límite de medición superior de 35000 pg/ml y un coeficiente de variación en el intervalo de 1,0 - 6,0 %.

Análisis estadístico

35 Los valores se expresan como media \pm desviación estándar, medianas con rango intercuartil [IQR], o recuentos y porcentajes si fuera apropiado. La existencia de una correlación entre los péptidos natriuréticos y otra variable se investigó usando la correlación de Spearman. La capacidad de los péptidos natriuréticos y otros parámetros clínicos y de laboratorio para discriminar entre pacientes con inicio reciente (< 48 h) y pacientes con FA más prolongada se investigó en primer lugar con análisis univariado usando ensayo t de Student o ensayo U de Mann-Whitney para variables continuas y Chi cuadrado o ensayo exacto de Fisher para la diferencia de frecuencias, si fuera apropiado. A continuación se realizó una regresión logística multivariante, incluyendo todas las variables que surgían del análisis univariado, para someter a ensayo la posible información de diagnóstico independiente ofrecida por los péptidos natriuréticos. Se construyeron curvas características operativas del receptor (ROC, acrónimo de *Receiver Operator Characteristic*) para evaluar la sensibilidad y especificidad a través de las concentraciones de los péptidos natriuréticos; el valor límite ideal se determinó a partir de la curva ROC y la sensibilidad y la especificidad se informan. Todos los análisis estadísticos se realizaron con la Versión 10.1 de STATA (StataCorp LP, College Station, TX) y un valor p inferior a 0,05 se consideraba estadísticamente significativo.

Resultados

50 Desde junio de 2010 hasta septiembre de 2010, se recomendaron 57 pacientes para el tratamiento de la FA. De éstos, 9 pacientes no se pudieron incluir (4 pacientes presentaban infarto agudo de miocardio, 3 presentaban shock cardiogénico o no cardiogénico, 1 presentaba insuficiencia renal grave y 1 presentaba insuficiencia cardiaca aguda descompensada). Los péptidos natriuréticos no se midieron en un paciente adicional. Por lo tanto, se incluyeron 47 pacientes. Las características de los pacientes para un tiempo de inicio de la FA hasta su presentación \geq 48 h se enumeran en la Tabla 1. La edad media en el momento de la inclusión era de 72 años [61-81] y la proporción de sexos era de 1,9. La FA era paroxística en 22 pacientes, persistente en 6 y de larga duración en 19. Diecinueve pacientes (40,4 %) tenían una FA de inicio dentro de las 48 h; la duración media de la FA era de 5 días [1-120] en

toda la población base.

- 5 Los niveles de MR-proANP variaban de 78,8 a 903,3 pmol/l. El MR-proANP se correlaciona parcialmente pero de forma significativa con el tiempo desde el inicio de FA hasta su presentación, la fracción de eyección de LV (FEVI), hemoglobina, pero no con el ritmo cardiaco o la concentración de creatinina (Tabla 2). Además, MR-proANP y NT-proBNP se correlacionaban de forma significativa (Spearman $r = 0,71$, $p < 0,001$). Las concentraciones de MR-proANP entre los diferentes subgrupos (FA paroxística, persistente y de larga duración, respectivamente) se representan en la Tabla 3.

Momento del análisis desde el inicio de AF hasta su presentación (≤ 48 h)

- 10 Los pacientes con un inicio de la FA < 48 h presentaban una disminución notable de MR-proANP con respecto a los pacientes con un inicio de la FA ≥ 48 h (144,0 [129,2-213,7] pmol/l con respecto a 321,7 [236,4-425,6] pmol/l respectivamente, $p < 0,001$) (Tabla 3). Otras variables asociadas con FA < 48 h eran edad menor, aumento del ritmo cardiaco, LVEF conservada (fracción de eyección del ventrículo izquierdo), hemoglobina conservada (Tabla 1). En el análisis multivariado, MR-proANP fue la única variable que se mantuvo asociada con una FA de menos de 48 h ($p = 0,021$).
- 15 El área bajo la curva ROC para identificar a los pacientes con inicio de FA de menos de 48 horas antes de la admisión era de 0,90 para MR-proANP y 0,82 para NT-proBNP, respectivamente ($p < 0,05$; Figura 1). La retirada de los pacientes con LVEF < 50 % (12 pacientes) no alterará los resultados; en este caso, el MR-proANP era 140,8 [129,2-191,6] pmol/l en pacientes con FA < 48 h con respecto a 321,7 [213,5-422,0] pmol/l en pacientes con FA ≥ 48 h ($p < 0,001$).
- 20 Basándose en el análisis de la curva de ROC, los inventores identificaron dos posibles valores límite para MR-proANP para detectar pacientes con inicio de FA inferior a 48 horas antes de su admisión. Un valor límite de 191,6 pmol/l podría dar como resultado una sensibilidad y especificidad de un 85,7 % y un 73,8 %, respectivamente; un valor límite de 161,9 pmol/l podría dar como resultado una sensibilidad de un 92,9 % y una especificidad de un 63,2 %. Las sensibilidades y especificidades de los valores límite de MR-proANP a modo de ejemplo para diferenciar
- 25 entre pacientes con un tiempo desde el inicio de la FA hasta su presentación < 48 h a partir de pacientes con un tiempo desde el inicio de la FA hasta su presentación ≥ 48 h se proporcionan en la tabla 4.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 (secuencia de aminoácidos de proANP):

```

1      NPMYNAVSNA DLMDFKNLLD HLEEKMPLED EVVPPQVLSE PNEEAGAALS
51     PLPEVPPWTG EVSPAQRDGG ALGRGPWDSS DRSALLKSKL RALLTAPRSL
101    RRSSCFGGRM DRIGAQSGLG CNSFRY

```

- 30 SEQ ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos de ANP):

```
1 SLRRSSCFGG RMDRIGAQSG LGCNSFRY
```

SEQ ID NO: 3 (secuencia de aminoácidos de NT-proANP):

```

1      NPMYNAVSNA DLMDFKNLLD HLEEKMPLED EVVPPQVLSE PNEEAGAALS
51     PLPEVPPWTG EVSPAQRDGG ALGRGPWDSS DRSALLKSKL RALLTAPR

```

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

- 35 1 PEVPPWTGEV SPAQRDGGAL GRGPWDSSDR SALLKSKL

SEQ ID NO: 5 (secuencia de aminoácidos de pro-BNP):

```

1      HPLGSPGSAS DLETSGLQEQ RNHLQGKLSL LQVEQTSLEP LQESPRPTGV
51     WKSREVATEG IRGHRKVMVLY TLRAPRSPKM VQGSCCFGRK MDRISSSSGL
101    GCKVLRRH

```

SEQ ID NO: 6 (secuencia de aminoácidos de BNP):

```
1 SPKMVQSGGC FGRKMDRISS SSGLGCKVLR RH
```

SEQ ID NO: 7 (secuencia de aminoácidos de NT-pro-BNP):

1 HPLGSPGSAS DLETSGLQEQ RNHLQGLSE LQVEQTSLEP LQESPRPTGV
51 WKSREVATEG IRGHRKVMVLY TLRAPR

TABLA 1

Características de los pacientes (tiempo desde el inicio de FA hasta su presentación \leq 48 h)			
	FA < 48 h (n = 19)	FA > 48 h (n = 28)	P
Años de edad	66 [46-74]	75 [66-83]	0,010
Sexo masculino	14 (74)	17 (61)	0,357
Hipertensión	7 (37)	17 (61)	0,108
Hipercolesterolemia	5 (26)	9 (32)	0,668
Diabetes	3 (16)	7 (25)	0,449
Obesidad	8 (42)	10 (36)	0,658
Tabaquismo	4 (21)	3 (11)	0,329
AMI previo	2 (11)	1 (4)	0,338
FA previa	4 (36)	16 (57)	0,243
Dolor en el pecho	2 (11)	1 (4)	0,338
Disnea	4 (21)	10 (36)	0,281
Lipotimia	7 (37)	3 (11)	0,067
Ritmo cardiaco, bpm	135 \pm 31	101 \pm 25	< 0,001
BP sistólica. mm Hg	134 \pm 13	128 \pm 19	0,310
BP diastólica. mm Hg	74 \pm 10	69 \pm 11	0,102
Creatinina, μ mol/l	87 \pm 21	97 \pm 31	0,244
Hemoglobina. g/dl	15,0 \pm 2,1	12,9 \pm 2,0	0,002
Aumento de la concentración de cTn	1 (5)	2 (7)	0,645
Ecocardiografía			
diámetro del extremo diastólico de LV, mm	49 \pm 7	52 \pm 9	0,320
Espesor septal. mm	11 \pm 1	12 \pm 2	0,422
LVEF. %	59 \pm 9	48 \pm 16	0,048
Enfermedad valvular significativa *	2 (20)	11 (46)	0,158
Presión arterial pulmonar. Mm Hg	39 \pm 5	41 \pm 11	0,366
Superficie de la aurícula izquierda, mm ²	18 \pm 5	39 \pm 36	0,153
IMA: infarto del miocardio agudo FA: fibrilación auricular cTn: troponina cardiaca LV: ventrículo izquierdo LVEF: fracción de eyección del ventrículo izquierdo La enfermedad valvular significativa se define como estenosis de las válvulas y/o regurgitación de la válvula media			

TABLA 2

Correlación posible entre la concentración de MR-proANP y variables seleccionadas		
Variable	Rho de Spearman	p
Duración de la fibrilación auricular (días)	0,60	< 0,001
Ritmo cardiaco	- 0,26	0,077
Hemoglobina (g/dl)	- 0,47	0,001
Concentración de creatinina (µmol/l)	0,17	0,268
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo	- 0,40	0,019
Presión arterial sistólica pulmonar	0,39	0,061

TABLA 3

Concentraciones de MR-proANP en plasma de acuerdo con la clasificación de FA y tiempo desde su inicio hasta su presentación		
VARIABLE	MR-proANP (pmol/l)	p
Tiempo desde el inicio de AF hasta su presentación: < 48 h ≥ 48 h	144,0 [129,2-213,7] 321,7 [236,4-425,6]	< 0,001
Tiempo desde el inicio de AF hasta su presentación: < 24 h ≥ 24 h	111,5 [86,0-178,9] 290,4 [218,6-422,0]	< 0,001
Clasificación de la FA: - Paroxística - Persistente - Larga duración	157,8 [133,4-241,7] 380,2 [349,5-490,9] 275,7 [197,9-429,1]	< 0,001

5

TABLA 4

Valores de especificidad y sensibilidad a diferentes niveles límite para MR-proANP para diferenciar pacientes con un tiempo desde el inicio de la FA hasta su presentación < 48 h de pacientes con un tiempo desde el inicio de la FA hasta su presentación ≥ 48 h)		
Valor límite de MR-proANP (pmol/l)	Especificidad (en %)	Sensibilidad (en %)
93,8	15,8	100,0
129,2	21,1	100,0
144,0	47,4	96,4
161,9	63,2	92,9
168,1	68,4	89,3
191,6	73,8	85,7
218,6	79,0	78,6
254,1	89,5	75,0
336,9	94,7	50,0
402,6	100,0	35,7

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación del tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación en un paciente que comprende las etapas de:
- 5 (i) determinar el nivel de MR-proANP (SEQ ID NO: 4) en una muestra de un fluido corporal que se ha obtenido de dicho paciente y
(ii) correlacionar el nivel de MR-proANP (SEQ ID NO: 4) con el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación en dicho paciente, en el que el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación en el paciente se determina para que sea de, o superior a, un cierto valor límite de tiempo o inferior a un cierto valor límite de tiempo, siendo dicho valor límite de tiempo de 48 horas o superior o inferior a 48 horas.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el valor límite de tiempo es de 24 horas o superior o inferior a 24 horas.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha muestra se selecciona entre sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina o saliva, preferentemente entre sangre, suero o plasma.
- 15 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nivel de MR-proANP (SEQ ID NO: 4) se determina usando al menos un anticuerpo dirigido contra MR-proANP (SEQ ID NO: 4).
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cuando se determina que el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación en dicho paciente es inferior a dicho valor límite de tiempo, éste se toma como un indicador de que al paciente se le debería aplicar una cardioversión inmediata.
- 20 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que, cuando se determina que el tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación en dicho paciente está en, o es superior a, dicho valor límite de tiempo, éste se toma como un indicador de que el paciente se debería tratar con anticoagulantes y/o se debería someter a ecocardiograma transesofágico (TEE) antes de la cardioversión.
- 25 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la cardioversión es cardioversión eléctrica y/o farmacológica.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se diagnostica que el paciente tiene un tiempo desde el inicio de la fibrilación auricular hasta su presentación inferior a dicho valor límite de tiempo cuando dicho nivel determinado de MR-proANP (SEQ ID NO: 4) es inferior a un nivel umbral determinado previamente .
- 30 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en que el nivel umbral determinado previamente está entre 100 y 350 pmol/l, más preferentemente entre 100 pmol/l y 250 pmol/l, incluso más preferentemente entre 100 pmol/l y 190 pmol/l, lo más preferentemente entre 100 pmol/l y 160 pmol/l.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se determina al menos un biomarcador además de MR-proANP (SEQ ID NO: 4), preferentemente un biomarcador relacionado con una enfermedad cardiovascular, preferentemente fibrilación auricular, lo más preferentemente pro-BNP y fragmentos del mismo, de forma especialmente preferente NT-proBNP y/o BNP.
- 35 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que adicionalmente se determina al menos un parámetro clínico que puede influir en el nivel de MR-proANP (SEQ ID NO: 4) en dicho paciente.
- 40 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el parámetro clínico se selecciona entre el grupo que comprende edad, sexo, comorbilidad e índice de masa corporal (IMC), preferentemente edad e IMC.

FIG. 1

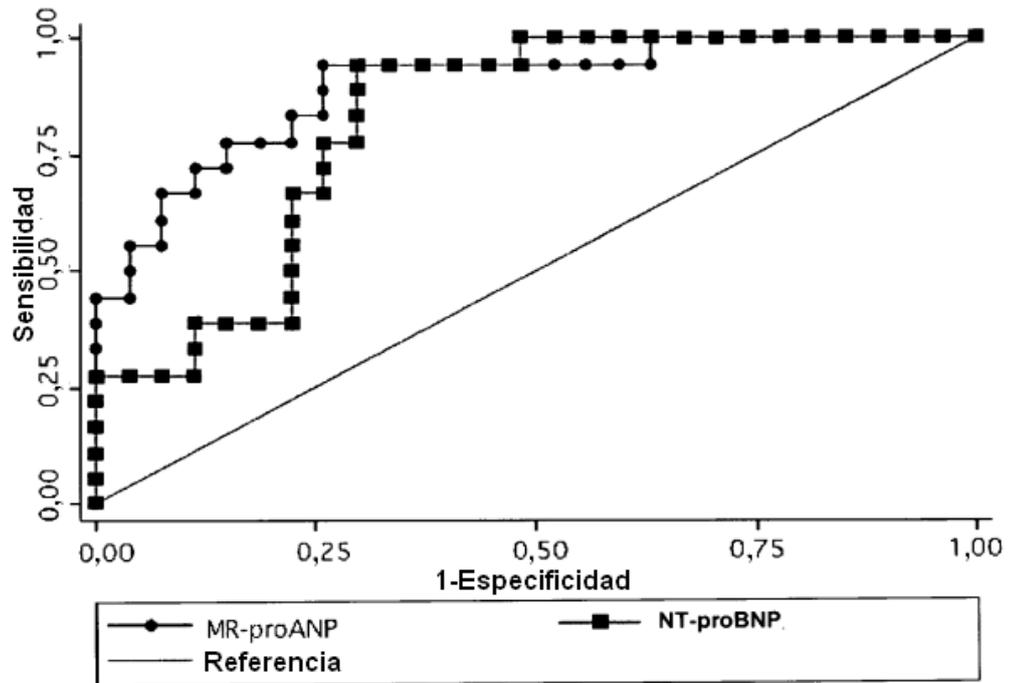


FIG. 2

