

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 082**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2012 PCT/EP2012/073897**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079567**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2012 E 12794941 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2786154**

54 Título: **NT-proANP y NT-proBNP para el diagnóstico del accidente cerebrovascular**

30 Prioridad:

01.12.2011 EP 11191579

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

23.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 656 082 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

NT-proANP y NT-proBNP para el diagnóstico del accidente cerebrovascular

5 El accidente cerebrovascular ocupa el segundo lugar tras la cardiopatía isquémica como causa de pérdida de años de vida por discapacidad en países de altos ingresos y como causa de muerte en todo el mundo. Cuando ocurren de forma precoz, las consecuencias adversas del accidente cerebrovascular se pueden mejorar por trombólisis; en caso de aparición tardía, la prevención secundaria (prevención del accidente cerebrovascular secundario) con aspirina y anticoagulación parece ser el único método apropiado para evitar la progresión de la enfermedad (van der Worp B y van Gijn J. NEJM 2007; 357: 572. 578).

15 Los ataques isquémicos transitorios (AIT) son episodios sintomáticos de accidentes cerebrovasculares de breve duración; la definición estándar se refiere a menos de 24 h, pero la mayoría de los AIT duran menos de 1 h. Las causas del AIT son análogas a las causas del accidente cerebrovascular isquémico, pero como los AIT pueden ser el preludeo de un accidente cerebrovascular, deberían ser considerados por separado (véase WE Smith y otros, Enfermedades cerebrovasculares, capítulo 364, en Harrison, Principios de medicina interna, 17ª edición).

20 El diagnóstico de los ataques isquémicos transitorios (AIT) supone un desafío específico, pues los síntomas rara vez duran horas y luego desaparecen, dejando al médico tratante en la incertidumbre sobre el diagnóstico y el estudio requerido. Además los síntomas dependen de la región afectada (y del vaso acompañante). Con frecuencia se ve afectada la arteria cerebral media; los síntomas relacionados incluyen afasia, debilidad contralateral de brazos o piernas. El AIT del cerebro anterior podría estar relacionado con afasia, apraxia, confusión, alexia, etc., si se afecta la parte central del cerebro inferior; los síntomas pueden ser temblor intencional, disestesia, ataxia, etc. Las lesiones de la médula pueden incluir vértigo, diplopía, náuseas y vómitos. Por lo tanto muchos síntomas pueden ser inespecíficos. Además no se pueden verificar porque solo aparecen temporalmente. Por consiguiente el diagnóstico del AIT puede resultar difícil y no puede distinguirse fácilmente de otras enfermedades.

30 El AIT es causado por la hipoperfusión e isquemia temporal de regiones localizadas del cerebro y la disfunción es debida a anomalías funcionales reversibles del cerebro, provocadas por un edema local, que producen alteraciones metabólicas e iónicas. El diagnóstico del AIT es importante, ya que las personas que lo padecieron tienen un riesgo significativamente mayor de accidente cerebrovascular en comparación con las que no han sufrido estos episodios de AIT. El riesgo de accidente cerebrovascular es del 4-5% después de dos días y del 11% después de siete días de un AIT. Los pacientes que en las últimas 48 horas han tenido un AIT con una duración > 10 minutos, con fibrilación auricular y con estenosis carotídea progresiva, y AIT que aparecen más de una vez siguiendo un patrón de aumento progresivo tienen el máximo riesgo de accidente cerebrovascular.

40 El NT-proBNP y el NT-proANP son marcadores cardíacos bien conocidos. El NT-proBNP pertenece al grupo de los péptidos natriuréticos cerebrales, de los cuales es sabido que se liberan desde el cerebro; sin embargo la mayoría de BNP procede del corazón. Tanto el NT-proBNP como el NT-proANP se han asociado a causas cardioembólicas de accidente cerebrovascular (Rodríguez-Yáñez M. y otros, Disease Markers [Marcadores de enfermedades] 2009; 26: 189 - 195).

45 Estrada y otros, 1994 (Am J Hypertens, 7: 1085-1089), revelan un método basado en la detección de ANP para diagnosticar un accidente cerebrovascular isquémico en un paciente. Según Estrada, los niveles de ANP fueron más altos en pacientes de accidentes cerebrovasculares que en voluntarios normales.

50 Sato y otros, 1995 (Kurume Med J, 42: 71-77), revelan un método basado en la detección de ANP para distinguir entre pacientes con alto riesgo y bajo riesgo de accidente cerebrovascular, y también para diferenciar el accidente cerebrovascular cardioembólico del accidente cerebrovascular lacunar.

55 Mäkikallio y otros, 2005 (Stroke, 36: 1016-1020), revelan que en pacientes con accidente cerebrovascular (agudo) el nivel plasmático de NT-proANP y NT-proBNP era igual o superior al de los pacientes que sufren infarto agudo de miocardio, y que en los pacientes con accidente cerebrovascular estos niveles son mayores que en pacientes sanos. También observan que la magnitud de la lesión cerebral es paralela al nivel de NT-proANP y NT-proBNP.

Shibazaki y otros, 2009 (Int Med 48: 259-264), revelan un método basado en la detección de BNP en plasma para distinguir en los pacientes de accidente cerebrovascular si se trata del tipo cardioembólico o de otro tipo (incluyendo las enfermedades de los vasos pequeños y de los vasos grandes).

60 Rodríguez-Yáñez y otros, 2009 (Disease Markers 26: 189 - 195), revelan un método basado en la detección de NT-proBNP en suero o la distinción en pacientes de accidente cerebrovascular entre los de tipo cardioembólico y los de tipo aterotrombótico, lacunar y otros tipos de accidente cerebrovascular. La respectiva medición con el NT-proANP muestra una utilidad similar, pero con datos menos convincentes.

65 Naruse y otros (Stroke 1991; 22: 61 - 65) describen un estudio durante el cual se bloqueó la arteria cerebral media izquierda en ratas para inducir un edema cerebral. Además se infundió ANP. La infusión de ANP redujo el edema

cerebral. Los resultados se interpretaron como efecto protector. Recientemente, Wiggins A.K. y otros (Neuroscience 2003: 118: 715 - 26) refirieron la expresión de ANP en ratas en un modelo de depresión prolongada y consideraron el ANP como una forma de neuroprotección.

- 5 Magga y otros analizan la cantidad de péptido natriurético auricular después de un infarto de miocardio (Journal of applied physiology (2004), vol. 96 (4), 1306-1311).

10 Los presentes inventores han determinado las proporciones de NT-proANP y NT-proBNP en una gran cohorte de pacientes de AIT y accidente cerebrovascular. La NT-proANP resultó un marcador fiable del AIT. Esta observación es ventajosa, ya que el diagnóstico del AIT es difícil (sobre todo en comparación con el diagnóstico del accidente cerebrovascular). Además se demostró que los niveles de NT-proANP en pacientes de AIT se mantienen elevados durante un tiempo considerable tras el AIT. Esto permite diagnosticar el AIT, incluso días después del AIT.

15 Existe una necesidad de medios y métodos para diagnosticar un ataque isquémico transitorio en un sujeto. Por lo tanto el problema técnico subyacente a la presente invención se podría considerar como la provisión de medios y métodos para satisfacer la necesidad arriba mencionada.

Dicho problema técnico se resuelve mediante las formas de ejecución caracterizadas en las reivindicaciones 1 a 11.

20 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar un ataque isquémico transitorio (AIT) en un sujeto que supuestamente ha tenido un ataque isquémico transitorio, pero no un accidente cerebrovascular, el cual incluye las etapas de:

- 25 a) determinar la cantidad de NT-proANP en una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de dicho sujeto, para ver si el sujeto sospechoso de haber tenido un ataque isquémico transitorio ha mostrado síntomas de AIT en las 72 horas previas a la obtención de la muestra, en particular si el sujeto ha mostrado síntomas de AIT en las 24 horas previas a la obtención de la muestra y si el sujeto ya no muestra síntomas de AIT en el momento de obtener la muestra, y
- 30 b) comparar la cantidad determinada de NT-proANP con una cantidad de referencia, diagnosticando de esta manera si dicho sujeto ha tenido un ataque isquémico transitorio.

El método de la presente invención es preferiblemente un método ex vivo. Además puede incluir etapas adicionales a las citadas explícitamente arriba. Las etapas adicionales pueden estar relacionadas, por ejemplo, con tratamientos previos de muestra o con la evaluación de los resultados obtenidos mediante el método. El método puede llevarse a cabo manualmente o guiado por automatización. Preferiblemente, las etapas (a) y/o (b) pueden ser guiadas total o parcialmente por automatización, p.ej. mediante un equipo robótico y sensorial adecuado para la determinación en la etapa (a) o para una comparación y/o un diagnóstico implementado por ordenador, basado en dicha comparación del paso (b). El método se lleva a cabo con mayor preferencia de manera completamente automatizada. En tal caso, el resultado del diagnóstico establecido en la etapa b) se genera en un formato de salida adecuado que sirva de ayuda, p.ej. a un profesional médico, para establecer el diagnóstico clínico definitivo.

45 Tal como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y con mayor preferencia a seres humanos. Se supone que el sujeto según la presente invención ha tenido un ataque isquémico transitorio. Se supondrá que dicho sujeto ha tenido un ataque isquémico transitorio en las 72 horas, preferiblemente en las 48 horas y con mayor preferencia en las 24 horas previas a la obtención de la muestra que debe analizarse. Por tanto, según la presente invención, se diagnosticará si el sujeto examinado ha tenido o no un AIT, preferiblemente en las 72 horas, con mayor preferencia en las 48 horas y sobre todo en las 24 horas previas a la obtención de la muestra que debe analizarse.

50 Es preferible que el sujeto examinado (así como el sujeto del cual procede la cantidad de referencia) no tenga la función renal alterada. Es bien sabido del estado técnico cómo evaluar si un sujeto tiene la función renal alterada. Los trastornos renales se pueden diagnosticar por cualquier medio conocido y considerado apropiado. En particular, la función renal se puede evaluar mediante la tasa de filtración glomerular (TFG). Por ejemplo, la TFG se puede calcular por la fórmula de Cockcroft-Gault o MDRD (Levey 1999, Annals of Internal Medicine, 461-470). La TFG es el volumen de líquido filtrado desde los capilares glomerulares renales a la cápsula de Bowman por unidad de tiempo, lo cual se usa clínicamente con frecuencia para determinar la función renal. Al principio la TFG se estimó (la TFG no se puede determinar nunca, todos los cálculos derivados de fórmulas como las de Cockcroft Gault o la MDRD solo proporcionan estimaciones y no la TFG "real") inyectando inulina en el plasma. Como la inulina no es reabsorbida por el riñón tras la filtración glomerular, su tasa de excreción es directamente proporcional a la tasa de filtración de agua y solutos a través del filtro glomerular. Sin embargo en la práctica clínica, para medir la TFG se aprovecha la eliminación de creatinina. La creatinina es una molécula endógena, sintetizada en el cuerpo, que se filtra libremente por el glomérulo (pero también es secretada por los túbulos renales en cantidades muy pequeñas). La eliminación de creatinina (ECr) es por lo tanto una aproximación cercana a la TFG. La TFG se registra generalmente en mililitros por minuto (ml/min). El rango normal de la TFG para hombres es de 97 a 137 ml/min, el rango normal de la TFG para mujeres es de 88 a 128 ml/min. Por tanto se considera concretamente que la TFG de un sujeto sin la función renal alterada está comprendida en este rango. Además, dicho sujeto tiene preferiblemente un nivel de creatinina en

sangre (en particular un nivel de creatinina sérica) inferior a 0,9 mg/dl, con mayor preferencia inferior a 1,1 mg/dl y sobre todo inferior a 1,3 mg/dl.

5 Preferiblemente, el sujeto tiene factores de riesgo para un episodio de isquemia cerebral aguda, en particular para un AIT. El término “episodio isquémico cerebral agudo” está descrito en otra parte del presente documento. Los factores de riesgo preferidos incluyen la enfermedad arterial coronaria, la insuficiencia cardíaca, en particular la insuficiencia cardíaca aguda, la disfunción cardíaca sistólica y/o diastólica, la enfermedad cardíaca valvular y la hipertensión arterial. Otros factores de riesgo son la diabetes y la obesidad. Según esto, el sujeto examinado tiene preferiblemente, al menos, uno de estos factores de riesgo. En particular se considera que el sujeto examinado (y el sujeto de referencia, es decir, el sujeto del cual procede la cantidad de referencia) sufre una enfermedad coronaria y/o insuficiencia cardíaca.

15 Con mayor preferencia, el sujeto padece insuficiencia cardíaca. Esto es aplicable en particular, si se calcula una relación de las proporciones de NTproANP y NT-proBNP en el contexto del método de la presente invención (véase en otro lugar del presente documento). El término “insuficiencia cardíaca” es bien conocido en el estado técnico. Tal como se usa aquí, el término, se refiere preferiblemente a una función sistólica y/o diastólica alterada del corazón, que va acompañada de signos manifiestos de insuficiencia cardíaca. Preferiblemente, la insuficiencia cardíaca a la que aquí se hace referencia es una insuficiencia cardíaca crónica. Con mayor preferencia se trata de insuficiencia cardíaca aguda. El término “insuficiencia cardíaca aguda” se refiere preferentemente a un empeoramiento de la función cardíaca en un máximo de 2 semanas con o, en particular, sin insuficiencia cardíaca crónica preexistente.

25 La IC se puede clasificar según varios niveles de gravedad. Según la clasificación de la NYHA (New York Heart Association [Asociación cardíaca de Nueva York]) los pacientes que sufren insuficiencia cardíaca se clasifican como pertenecientes a las clases NYHA I, II, III y IV. Un paciente con insuficiencia cardíaca ya ha experimentado cambios estructurales y funcionales en su pericardio, miocardio, circulación coronaria o válvulas cardíacas. No podrá recobrar completamente su salud y necesita un tratamiento terapéutico. Los pacientes de NYHA clase I no tienen síntomas evidentes de enfermedad cardiovascular, pero ya tienen pruebas objetivas de alteración funcional. Los pacientes de NYHA clase II tienen una ligera limitación de la actividad física. Los pacientes de NYHA clase III presentan una marcada limitación de la actividad física. Los pacientes de NYHA clase IV no pueden realizar ninguna actividad física sin molestias, pues presentan síntomas de insuficiencia cardíaca en reposo.

35 Esta clasificación funcional se complementa con la clasificación más reciente del American College of Cardiology y de la American Heart Association (véase J. Am. Coll. Cardiol. 2001; 38; 2101-2113, actualizada en 2005, véase J. Am. Coll. Cardiol. 2005; 46; e1-e82). Se definen 4 fases A, B, C y D. Las fases A y B no son IC, pero se considera que ayudan a identificar a los pacientes antes de desarrollar “verdaderamente” IC. Los pacientes de las fases A y B se definen mejor como aquellos que tienen factores de riesgo para desarrollar insuficiencia cardíaca. Por ejemplo, los pacientes con cardiopatía arterial coronaria, hipertensión o diabetes mellitus que todavía no presentan alteración funcional del ventrículo izquierdo (VI), hipertrofia o distorsión geométrica de la cámara se considerarían de fase A, mientras que los pacientes que son asintomáticos pero presentan hipertrofia del VI y/o función alterada del VI se denominarían de etapa B. La etapa C se refiere a pacientes con síntomas actuales o pasados de IC relacionada con una cardiopatía estructural subyacente (la mayoría de pacientes con IC) y la etapa D se refiere a pacientes con IC realmente refractaria.

45 Tal como se usa aquí, el término “insuficiencia cardíaca” se refiere preferiblemente a las fases C y D de la anterior clasificación ACC/AHA. En estas fases el sujeto muestra síntomas típicos de insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, un sujeto que sufre de insuficiencia cardíaca, padece insuficiencia cardíaca de fase C o D conforme a la clasificación ACC/AHA. Con mayor preferencia, el término “insuficiencia cardíaca” se clasifica como NYHA III o IV de acuerdo con la clasificación de la NYHA.

50 Además se contempla que el sujeto examinado acuerdo con el método de la presente invención (así como el o los sujetos de referencia) no muestre un síndrome coronario agudo (abreviado “SCA”). Tal como se usa aquí, el término “SCA” incluye preferiblemente IMEST (infarto de miocardio con elevación del segmento ST); IMSEST (infarto de miocardio sin elevación del ST) y angina de pecho inestable. También se contempla preferiblemente que el sujeto examinado no tenga un historial de SCA. Preferentemente el sujeto no deberá haber sufrido SCA la última semana o, con mayor preferencia, el último mes antes de aplicar el método de la presente invención (para ser más precisos, un mes antes de obtener la muestra).

60 Preferiblemente, el sujeto tampoco padece insuficiencia circulatoria cardíaca (en particular al obtener la muestra). El término “insuficiencia circulatoria cardíaca” se refiere preferiblemente a un deterioro repentino de la función cardíaca.

65 Este deterioro es provocado preferentemente por una arritmia cardíaca, un paro cardíaco transitorio o una embolia pulmonar. Puede haber dos formas de arritmia cardíaca: bradiarritmia y taquiarritmia. En el caso de bradiarritmia la frecuencia del latido del corazón disminuye patológicamente en comparación con un sujeto sano; en la bradiarritmia la frecuencia cardíaca es preferiblemente inferior a 60 latidos por minuto. Las formas más frecuentes de bradiarritmia son bradicardia sinusal, bloqueo sinoauricular, paro sinusal, síndrome del seno enfermo y bloqueo atrioventricular.

En la taquiarritmia la frecuencia aumenta patológicamente en comparación con un sujeto sano; en la taquiarritmia, la frecuencia cardíaca es preferiblemente superior a 100 latidos por minuto. La mayoría de los casos de taquiarritmia son taquicardia supraventricular con enfermedad cardiovascular estructural, fibrilación auricular con síndrome de Wolff-Parkinson-White, aleteo auricular con conducción auriculoventricular 1:1 y taquicardia ventricular. La embolia pulmonar es causada por la oclusión de una arteria pulmonar mediante un coágulo de sangre (tromboembolia) o una burbuja de aire (embolia gaseosa). Normalmente los coágulos de sangre se forman en las venas pélvicas o de las extremidades inferiores y migran a las arterias pulmonares, donde se atascan. La embolia gaseosa es provocada preferentemente por un accidente de buceo o por catéteres venosos con fugas. Los síntomas de embolia pulmonar incluyen dolor en el pecho, disnea y hemoptisis (tos sanguinolenta). La presión de la circulación pulmonar puede aumentar y producir insuficiencia ventricular derecha. Los episodios circulatorios cardíacos también pueden ser determinados o confirmados por los métodos hasta ahora conocidos.

El término “ataque isquémico transitorio” (abreviado aquí como AIT) es bien conocido en el estado técnico (véase W.E. Smith y otros, Enfermedades cerebrovasculares, capítulo 364 en Harrison, Principles of Internal Medicine, 17ª edición). Tal como se usa aquí, el término se refiere sobre todo a un episodio transitorio de disfunción neurológica provocada por isquemia sin infarto agudo y, por tanto, sin muerte tisular. Por consiguiente, al contrario del accidente cerebrovascular, un AIT no produce un daño tisular irreversible por muerte de células cerebrales. El AIT comparte la misma etiología subyacente que el accidente cerebrovascular: una interrupción del flujo sanguíneo cerebral (FSC).

Por otra parte, los síntomas de AIT son en general los mismos que los del accidente cerebrovascular. Los síntomas del AIT y del accidente cerebrovascular son bien conocidos del estado técnico. Asimismo, es bien sabido del estado técnico que los síntomas pueden depender de la región del cerebro afectada por la isquemia (véase también más adelante) y variar en cuanto a gravedad. Los síntomas incluyen pérdida temporal de la visión (amaurosis fugax), dificultades para hablar (afasia), debilidad de un lado del cuerpo (hemiparesia) y entumecimiento u hormigueo (parestesia), generalmente en un lado del cuerpo. Otros síntomas son disfasia, disartria, hemianopsia, debilidad, ataxia y descuido. El mareo, la falta de coordinación o un equilibrio deficiente también son síntomas relacionados con el AIT.

Los síntomas de un AIT son de corta duración y generalmente duran unos pocos segundos hasta algunos minutos y la mayoría de los síntomas desaparecen en 60 minutos. Así, los síntomas duran poco, preferiblemente menos de 24 horas, en particular menos de 1 hora.

El sujeto examinado según el método mencionado anteriormente no tuvo una apoplejía, es decir, el sujeto no debe haber tenido una apoplejía. Preferiblemente el sujeto no deberá haber tenido una apoplejía en las 72 horas, con mayor preferencia en las 48 horas y sobre todo en las 24 horas previas a la obtención de la muestra que debe ser analizada. Lo más preferible es que el sujeto no haya tenido una apoplejía una o dos semanas antes de la obtención de la muestra para el análisis.

El término “apoplejía” es bien conocido en el estado técnico. El término comprende preferentemente un accidente cerebrovascular isquémico. El término “accidente cerebrovascular isquémico” también es bien comprendido por el especialista (véase por ejemplo Adams y otros, Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke [Pautas para el tratamiento precoz de adultos con accidente cerebrovascular isquémico], una guía de la American Heart Association/American Stroke Association, Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, y the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups [La enfermedad vascular aterosclerótica periférica y resultados de la calidad de asistencia en grupos de trabajo interdisciplinario de investigación] en Stroke. 2007;38:1655. Tal como se usa aquí, el término se refiere preferentemente al accidente cerebrovascular isquémico cerebral. Además se refiere preferiblemente a una apoplejía causada por un menor flujo sanguíneo al cerebro o a partes del mismo, que reduce el suministro de oxígeno (escasez de aporte) a las células cerebrales. En el contexto de los métodos de la presente invención un accidente cerebrovascular daña irreversiblemente el tejido debido a la muerte de las células cerebrales. Por consiguiente el término “accidente cerebrovascular”, tal como se usa aquí, no incluye los AIT.

Los síntomas de apoplejía son bien conocidos en el estado técnico. Preferentemente son los mismos síntomas antes citados para los AIT.

El accidente cerebrovascular isquémico puede ser causado por aterotrombosis o embolia de una arteria cerebral importante, por trastornos de coagulación, por enfermedad vascular no ateromatosa o por una isquemia cardíaca que disminuye el flujo sanguíneo total. La apoplejía isquémica se selecciona preferiblemente del grupo formado por apoplejía aterotrombótica, apoplejía cardioembólica y apoplejía lacunar. La determinación del tipo de accidente cerebrovascular es conocida del personal experto e incluye diversas técnicas de captación de imágenes tales como ecocardiografía, electrocardiograma y ecografía Doppler. Preferiblemente, el accidente cerebrovascular isquémico es un accidente cerebrovascular isquémico agudo.

El AIT y el accidente cerebrovascular son el resultado de la isquemia y/o hipoperfusión de partes específicas del cerebro o de todas las partes del mismo. Los síntomas dependen de la región afectada (y del vaso acompañante). A menudo se ve afectada la arteria cerebral media; los síntomas relacionados incluyen afasia, debilidad contralateral

de brazos o piernas. El AIT del cerebro anterior puede relacionarse con afasia, apractognosia, confusión, alexia, etc.; cuando está afectada la parte central del cerebro inferior, los síntomas pueden ser temblor intencional, disestesia, ataxia, etc. Las lesiones de la médula pueden incluir vértigo, diplopía, náuseas y vómitos.

5 Preferiblemente, el término “accidente cerebrovascular isquémico” no incluye la apoplejía hemorrágica.

Si un sujeto sufre o ha sufrido un accidente cerebrovascular, en concreto un accidente cerebrovascular isquémico, se puede determinar por métodos bien conocidos. Los síntomas del accidente cerebrovascular son asimismo bien conocidos en el estado técnico y están descritos, p.ej., en Adams y otros (loc. cit.). P.ej., los síntomas de apoplejía incluyen insensibilidad o debilidad repentina de la cara, brazo o pierna, sobre todo a un lado del cuerpo, confusión repentina, dificultad para hablar o entender, dificultad repentina para ver con uno o ambos ojos y dificultad repentina para caminar, mareos y pérdida de equilibrio o coordinación.

15 Tal como se ha expuesto anteriormente, se supone que el sujeto examinado según el método arriba citado ha tenido un ataque isquémico transitorio. Preferentemente, un sujeto que supuestamente ha padecido un ataque isquémico transitorio es un sujeto que ha mostrado síntomas de un AIT. Preferiblemente, dicho sujeto ha mostrado síntomas de un AIT dentro de un cierto período de ventana antes de obtener la muestra de prueba. Preferiblemente dicho sujeto ha mostrado síntomas de AIT en las 72 horas, con mayor preferencia en las 48 horas y sobre todo en las 24 horas anteriores a la obtención de la muestra. No obstante, es preferible no obtener la muestra de análisis antes de haber pasado 1 hora, en particular 2 horas, desde el final de los síntomas de AIT. También se contempla que la muestra de análisis no se haya obtenido antes de transcurridas 4 horas desde el final de los síntomas de AIT. Igualmente se contempla que la muestra de análisis no se haya obtenido antes de transcurridas 6 horas desde el final de los síntomas de AIT.

25 Asimismo se contempla que el sujeto haya mostrado síntomas de AIT en las 12 horas anteriores a la obtención de la muestra.

Con el método de la presente invención mencionado anteriormente se debe diagnosticar un AIT. Tal como se usa aquí, el término “diagnóstico” significa evaluar si un sujeto como el mencionado según el método de la presente invención ha sufrido un ataque isquémico transitorio, o no. En particular, se debe diagnosticar si el sujeto ha sufrido o no un ataque isquémico transitorio en un determinado intervalo de tiempo anterior a la obtención de la muestra que se va a analizar. Según una forma de ejecución preferida se diagnosticará si el sujeto ha sufrido o no un ataque isquémico transitorio en las 72 horas anteriores a la obtención de la muestra. En otra forma de ejecución preferida se diagnosticará si el sujeto ha sufrido o no un ataque isquémico transitorio en las 48 horas anteriores a la obtención de la muestra. Según otra forma de ejecución más preferida se diagnosticará si el sujeto ha padecido o no un ataque isquémico transitorio en las 24 horas anteriores a la obtención de la muestra. Es preferible que el sujeto ya no tenga síntomas de AIT en el momento de obtener la muestra.

40 Como comprenderán los expertos en la materia, la evaluación de si un sujeto como el aquí mencionado ha tenido o no un AIT no pretende ser generalmente correcto para el 100% de los sujetos que deben diagnosticarse. El término requiere sin embargo que la evaluación sea correcta para una parte estadísticamente significativa de los sujetos (por ejemplo, para una cohorte en un estudio de cohortes). Por lo tanto, aun así, el método de la presente invención al menos sirve de ayuda para establecer un diagnóstico clínico final. El especialista en la materia puede determinar si una porción es estadísticamente significativa, usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, p.ej. determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles pueden encontrarse en Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99 %. Los valores de p son preferiblemente de 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

50 El término “muestra” se refiere a una muestra de sangre, plasma o suero. Dicha muestra se obtiene no más tarde de las 72 horas desde la aparición de los síntomas de un ataque isquémico transitorio. Con mayor preferencia dicha muestra se obtiene no más tarde de las 48 horas y sobre todo no más tarde de las 24 horas desde la aparición de los síntomas de un ataque isquémico transitorio. Preferiblemente, el sujeto ya no presenta síntomas de AIT en el momento en que se obtiene la muestra.

55 El marcador NT-proANP (péptido natriurético pro atrial N-terminal) es bien conocido en el estado técnico (véase por ejemplo Bonow, 1996, Circulation 93: 1946-1950). El NT-proANP pertenece al grupo de péptidos natriuréticos. El NT-proANP se genera por escisión proteolítica a partir de una molécula precursora, el péptido pre-proANP, dando como resultado la hormona activa ANP (péptido natriurético atrial) y el respectivo fragmento N-terminal NT-proANP.

60 La ANP se sintetiza en miocitos auriculares. Al liberarse, la prohormona se divide en proporciones equimolares del proANP muy activo biológicamente (aminoácidos 99 a 126) y NT-proANP (aminoácidos 1 a 98). La hormona activa está involucrada en el control homeostático del agua, sodio, potasio y tejido adiposo corporales. Es liberada por las células musculares de las cámaras superiores del corazón como respuesta a una presión arterial alta. Tal como se utiliza aquí, NT-proANP se refiere preferiblemente al NT-proANP humano. El término “NT-proANP” también engloba preferiblemente variantes polipeptídicas del NT-proANP humano antes citado. Estas variantes tienen al menos las

mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que el polipéptido NT-proANP antes citado. En particular comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables mediante los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en esta descripción, p.ej. mediante ensayos ELISA efectuados con el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichos polipéptidos NT-proANP.

Se conocen ejemplos de variantes particulares de NT-proANP y de NT-proBNP y métodos para su medición (Ala-Kopsala, M., Magga, J., Peuhkurinen, K. y otros (2004): la heterogeneidad molecular tiene un impacto importante en la medición de los fragmentos circulantes N-terminales de los péptidos natriuréticos de tipo A y de tipo B. *Clinical Chemistry*, volumen 50(9), 1576-1588). Además, debe entenderse que una variante considerada conforme a la presente invención tendrá una secuencia de aminoácidos diferente debido al menos a una sustitución, deleción y/o adición de aminoácidos, de modo que la secuencia de aminoácidos de la variante sea todavía, preferiblemente, al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido NT-proANP específico, preferiblemente en toda la longitud del respectivo NT-proANP humano (en particular en toda la longitud). El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante algoritmos bien conocidos del estado técnico, descritos en otra parte de este documento. Las variantes antedichas pueden ser variantes alélicas o cualquier otra especie de homólogos, parálogos u ortólogos específicos.

Además, las variantes aquí citadas incluyen fragmentos o subunidades del polipéptido NT-proANP específico o los tipos de variantes mencionados anteriormente, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales arriba citadas. Dichos fragmentos pueden ser p.ej. productos de degradación del polipéptido NT-proANP. También se incluyen las variantes que difieren a causa de modificaciones post-translacionales tales como fosforilación o miristilación.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido aludido en esta descripción se refiere a la medición de la cantidad o concentración, preferiblemente de forma semicuantitativa o cuantitativa. La medición puede ser directa o indirecta. La medición directa consiste en determinar la cantidad o concentración del péptido o polipéptido basada en una señal obtenida a partir del propio péptido o polipéptido, cuya intensidad se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presente en la muestra. Dicha señal - a veces designada aquí como señal de intensidad - se puede obtener p.ej. midiendo el valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta consiste en la determinación de una señal obtenida de un componente secundario (es decir, un componente que no es el propio péptido o polipéptido) o de un sistema de lectura biológica, como p.ej. respuestas celulares medibles, ligandos, marcadores o productos de reacciones enzimáticas.

De acuerdo con la presente invención, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido se puede realizar por todos los medios conocidos para medir la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden inmunoensayos y métodos en los cuales se pueden utilizar moléculas marcadas para diversos formatos de ensayo de tipo sándwich, competitivo u otros. Estos ensayos están basados preferiblemente en agentes de detección tales como anticuerpos que reconocen específicamente el péptido o polipéptido que debe determinarse. Los agentes de detección deben ser directa o indirectamente capaces de generar una señal que indique la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la intensidad de la señal se puede correlacionar preferiblemente de forma directa o indirecta (p.ej. inversamente proporcional) con la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Otros métodos adecuados consisten en medir una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido, tal como su masa molecular precisa o su espectro RMN. Dichos métodos incluyen, preferiblemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o aparatos cromatográficos. Los métodos también incluyen métodos basados en microplacas ELISA, ensayos inmunológicos completamente automatizados o robotizados (disponibles por ejemplo en analizadores Elecsys[®]), CBA (un ensayo enzimático de unión a cobalto, disponible por ejemplo en analizadores Roche-Hitachi[®]) y ensayos de aglutinación con látex (disponibles por ejemplo en los analizadores Roche-Hitachi[®]).

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende preferiblemente las etapas de (a) poner en contacto con dicho péptido o polipéptido, durante un período adecuado de tiempo, una célula capaz de inducir una respuesta celular cuya intensidad sea indicativa de la cantidad del péptido o polipéptido, y (b) medir la respuesta celular. Para medir las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se agrega preferiblemente a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión medible de un gen reportero o la secreción de una sustancia, p.ej. de un péptido, polipéptido o molécula pequeña. La expresión o la sustancia generarán una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad del péptido o polipéptido.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido también comprende preferiblemente la etapa de medir una señal de intensidad específica obtenible a partir del péptido o polipéptido contenido en la muestra. Como se ha descrito arriba, esta señal puede ser la intensidad observada a una m/z variable, específica del péptido o polipéptido en los espectros de masas, o un espectro RMN específico del péptido o polipéptido.

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

Según una forma de ejecución preferida, dichos pasos de puesta en contacto, eliminación y medición se pueden llevar a cabo mediante una unidad analizadora del sistema descrito en este documento. Según algunas formas de ejecución, dichos pasos pueden ser efectuados por una sola unidad analizadora de dicho sistema o por más de una unidad analizadora en comunicación mutuamente operativa. Por ejemplo, según una forma de ejecución concreta, el sistema aquí descrito puede constar de una primera unidad analizadora para realizar dichos pasos de contacto y eliminación y una segunda unidad analizadora, conectada operativamente a dicha primera unidad analizadora por una unidad de transporte (por ejemplo, un brazo robot), que realiza dicho paso de medición.

El ligando unido, en particular el ligando o el complejo ligando/péptido, generará una señal de intensidad. Según la presente invención, la unión incluye tanto un enlace covalente como no covalente. Según la presente invención, un ligando puede ser cualquier compuesto, p.ej. un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña, que se una al péptido o polipéptido aquí descrito.

Los ligandos preferidos comprenden anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos tales como receptores o componentes de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos, incluyendo los dominios de unión para los péptidos y aptámeros, p.ej. aptámeros de ácido nucleico o peptídicos. Los métodos para preparar estos ligandos son bien conocidos del estado técnico. Por ejemplo, los proveedores comerciales también proporcionan la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados. El especialista en la materia está familiarizado con los métodos de desarrollo de derivados de dichos ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Luego estos derivados se pueden someter a ensayos de unión según los procedimientos de selección conocidos del estado técnico, p.ej. la expresión fágica. Los anticuerpos aquí citados incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como los fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂, que son capaces de unirse al antígeno o al hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena simple y anticuerpos híbridos humanizados, en los cuales se combinan secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano - que presenta una especificidad de antígeno deseada - con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donantes incluirán normalmente al menos los restos de aminoácidos de unión al antígeno del donante, pero también pueden comprender otros restos de aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos se pueden preparar mediante varios métodos bien conocidos del estado técnico. Preferiblemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido. Unión específica según la presente invención significa que el ligando o agente no debe unirse sustancialmente (por "reacción cruzada") a otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra analizada. Preferiblemente, el péptido o polipéptido fijado específicamente debería estar unido con una afinidad al menos 3 veces superior, con mayor preferencia al menos 10 veces superior y sobre todo al menos 50 veces superior a la de cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión inespecífica puede ser tolerable, si aún se puede distinguir y medir de forma inequívoca, p.ej. según su tamaño en un ensayo Western Blot, o por su abundancia comparativamente mayor en la muestra. La unión del ligando se puede medir por cualquier método conocido del estado técnico. Tal método es preferiblemente semicuantitativo o cuantitativo. A continuación se describen otras técnicas adecuadas para la determinación de un polipéptido o péptido.

En primer lugar, la unión de un ligando se puede medir directamente, p.ej. por RMN o resonancia de plasmones superficiales. Según las formas de ejecución preferidas, la medición de la unión de un ligando, se realiza mediante una unidad analizadora de un sistema descrito en este documento. Después, una cantidad de la unión medida se puede calcular mediante un dispositivo informático de un sistema descrito en este documento. En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, se puede medir un producto de reacción enzimática (p.ej., se puede medir la cantidad de una proteasa determinando la cantidad de sustrato escindido, p.ej. en un ensayo Western Blot). Alternativamente el propio ligando puede tener propiedades enzimáticas y el complejo "ligando/péptido o polipéptido" o el ligando fijado por el péptido o polipéptido, respectivamente, se pueden poner en contacto con un sustrato adecuado que permita la detección mediante la generación de una señal de intensidad. Para medir los productos de reacción enzimática es preferible que haya saturación de sustrato. El sustrato también se puede marcar antes de la reacción con un marcador detectable. La muestra se pone preferiblemente en contacto con el sustrato durante un período de tiempo adecuado. Un período de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para la formación de una cantidad de producto detectable, preferiblemente medible. En lugar de determinar la cantidad de producto se puede medir el tiempo necesario para la aparición de una cantidad definida (p.ej. detectable) de producto. En tercer lugar, el ligando se puede acoplar por enlace covalente o no covalente a un marcador que permita la detección y medición del ligando. La marcación se puede realizar por métodos directos o indirectos. La marcación directa implica el acoplamiento directo del marcador (covalentemente o no) al ligando. La marcación indirecta implica la unión (covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario se puede acoplar a un marcador adecuado y/o puede ser la diana (receptor) de un ligando terciario que se una al ligando secundario. El uso de ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior tiene la finalidad de incrementar la señal. Los ligandos adecuados de orden secundario y superior pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios y el sistema bien conocido de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o el sustrato también se pueden "marcar" con uno o más marcadores, tal como se conoce en el estado técnico. Tales marcadores pueden ser dianas para ligandos de orden superior. Como marcadores adecuados cabe citar: biotina, digoxigenina, His-Tag, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, myc-tag, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A, proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, el marcador está preferiblemente en

el extremo N y/o en el extremo C. Como marcadores son adecuados aquellos que pueden detectarse mediante un método 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", incluyendo marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos comprenden, p.ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y sus derivados. Los sustratos adecuados para la detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitro azul tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como solución estándar lista para usar, de Roche Diagnostics), CDP-Star[®] (Amersham Biosciences), ECF[®] (Amersham Biosciences). Una combinación adecuada de enzima-sustrato puede dar lugar a un producto de reacción coloreado, fluorescente o quimioluminiscente, que puede medirse de acuerdo con métodos conocidos del estado técnico (p.ej. empleando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). Para medir la reacción enzimática se aplican análogamente los criterios antes indicados. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo Texas, fluoresceína y los colorantes Alexa (p.ej. Alexa 568). Otros marcadores fluorescentes pueden obtenerse, p.ej. de Molecular Probes (Oregon). También se contempla el empleo de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Los marcadores radiactivos típicos incluyen S³⁵, I¹²⁵, P³², P³³ y similares. Un marcador radioactivo se puede detectar por cualquier método conocido y apropiado, p.ej. con una película sensible a la luz o una cámara de fósforo. Los métodos de medición adecuados según la presente invención también incluyen precipitación (en concreto inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), ensayos inmunológicos enzimáticos de tipo sándwich, inmunoensayos de tipo sándwich electroquimioluminiscentes (ECLIA), ensayo inmunológico de fluorolantánido potenciado por disociación (DELFLIA), ensayo de centelleo por proximidad (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría mejorada con látex, o ensayos inmunológicos en fase sólida. Otros métodos conocidos del estado técnico (tales como electroforesis en gel, electroforesis en gel 2D, electroforesis en gel de poli(acrilamida) SDS (SDS-PAGE), Western Blot y espectrometría de masas) pueden usarse solos o combinados con la marcación u otros métodos de detección descritos anteriormente.

La cantidad de un péptido o polipéptido también se puede determinar preferiblemente, como sigue: (a) poner en contacto un soporte sólido que lleva un ligando para el péptido o polipéptido, tal como se ha especificado antes, con una muestra que contenga el péptido o polipéptido y (b) medir la cantidad de péptido o polipéptido unido al soporte.

El ligando, escogido preferiblemente del grupo formado por ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está preferiblemente inmovilizado sobre un soporte sólido. Los materiales para fabricar soportes sólidos son bien conocidos del estado técnico e incluyen, entre otros, materiales de columna comercialmente disponibles, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracyte[®], pocillos y paredes de cubetas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede ir unido a muchos vehículos diferentes. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas), agarosas y magnetita. Para los propósitos de la presente invención el vehículo puede ser soluble o insoluble. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, sin limitarse a ellos, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares.

También se contempla el uso de "matrices de suspensión" como matrices según la presente invención (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1): 9-12). En estas matrices el vehículo, p.ej. una microperla o microesfera, se encuentra en suspensión. La matriz consta de diferentes microesferas o microesferas, que pueden estar marcadas y transportan distintos ligandos. Los métodos para producir dichas matrices, basadas por ejemplo en la química de fase sólida y grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (patente US 5.744.305).

Tal como se usa aquí, el término "cantidad" engloba la cantidad absoluta de un polipéptido o péptido, la cantidad o concentración relativa de dicho polipéptido o péptido, así como cualquier valor o parámetro correlacionado con ellas o derivable de las mismas. Dichos valores o parámetros incluyen los valores de señales de intensidad procedentes de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas a partir de dichos péptidos mediante mediciones directas, p.ej. valores de intensidad en espectros de masas o espectros RMN. Además engloba todos los valores o parámetros obtenidos mediante mediciones indirectas especificadas en otra parte de esta descripción, p.ej. niveles de respuesta determinados a partir de sistemas de lectura biológica como respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidas de los ligandos unidos específicamente. Debe entenderse que los valores correlacionados con las cantidades o parámetros antes citados también se pueden obtener mediante todas las operaciones matemáticas comunes. Según formas de ejecución preferidas de la presente invención, la determinación de una "cantidad" se realiza mediante el sistema revelado, de tal modo que un dispositivo informático determina la "cantidad" en función de las etapas de contacto y medición efectuadas por una o más unidades analizadoras de dicho sistema.

La cantidad de NT-proANP se determina preferiblemente con los ensayos descritos en la sección de los ejemplos. Por ejemplo, la cantidad de NT-proANP se puede determinar detectando los aminoácidos 1 hasta 98 del péptido pre-pro ANP.

65

Tal como usa aquí, el término “comparar” se refiere a la comparación de la cantidad del péptido o polipéptido contenido en la muestra analizada con una cantidad de una fuente adecuada de referencia especificada en otra parte de esta descripción. Debe entenderse que dicha comparación se lleva a cabo entre parámetros o valores correspondientes, p.ej., una cantidad absoluta se compara con una cantidad de referencia absoluta, mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia, o bien una señal de intensidad obtenida de una muestra de ensayo se compara con el mismo tipo de señal de intensidad procedente de una muestra de referencia.

La comparación mencionada en la etapa (b) del método de la presente invención se puede llevar a cabo de forma manual o asistida por ordenador, p.ej. mediante un dispositivo informático (p.ej. de un sistema aquí descrito). Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada se puede comparar con los valores adecuados correspondientes a las referencias almacenadas en una base de datos por un programa informático. El programa informático puede evaluar asimismo el resultado de la comparación, es decir, facilitar automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida conveniente, es decir, como resultado del diagnóstico. Dicho resultado diagnóstico puede servir preferiblemente de ayuda para el establecimiento del diagnóstico clínico final, p.ej. por parte de un médico.

Basándose en la comparación entre la cantidad determinada y la cantidad de referencia se podrá evaluar si el sujeto examinado ha tenido un AIT o no. Por ejemplo, el resultado de una comparación se puede indicar en forma de datos primarios (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. Por tanto la cantidad de referencia debe elegirse de modo que una diferencia o una igualdad entre las cantidades comparadas permitan identificar a los sujetos examinados como pertenecientes al grupo de sujetos que hayan sufrido o no un AIT. El método permite descartar (excluir) o identificar (incluir) un sujeto que haya sufrido o no un AIT. Tal como se interpretan aquí, las diferencias entre las cantidades, es decir, los aumentos o las disminuciones, son preferiblemente diferencias que tienen significación estadística. Se puede determinar si una diferencia es estadísticamente significativa, utilizando las técnicas estadísticas mencionadas en otra parte del presente documento. De manera similar, una igualdad entre las cantidades de un parámetro medido incluye tanto las cantidades idénticas, como aquellas diferencias de cantidades que no son estadísticamente significativas y que están dentro de las desviaciones estándar.

Tal como se usa aquí, el término “cantidad de referencia” se refiere a una cantidad que permite la asignación de un sujeto (i) al grupo de sujetos que han sufrido un AIT o (ii) al grupo de sujetos que no han sufrido un AIT. Dicho diagnóstico de inclusión y/o exclusión puede ser facilitado por el dispositivo informático de un sistema descrito en el presente documento, basándose en dicha comparación de la “cantidad” calculada con una referencia o un umbral.

Por ejemplo, un dispositivo informático de un sistema puede facilitar un indicador en forma de una palabra, símbolo o valor numérico que sea indicativo de uno de los diagnósticos de inclusión o exclusión. La cantidad de referencia aplicable para un sujeto individual puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos tales como la edad, el sexo o la subpoblación, así como de los medios utilizados para la determinación del polipéptido o péptido al que se hace referencia en este documento. Se puede determinar una cantidad de referencia adecuada a partir de una muestra de referencia, para analizarla simultánea o posteriormente junto con la muestra de ensayo.

En principio las cantidades de referencia se pueden calcular para una cohorte de sujetos, como se ha especificado arriba, basándose en los valores promedio de un determinado biomarcador y en el empleo de métodos estadísticos estándar. En concreto, la exactitud de un ensayo tal como un método que pretende diagnosticar un episodio, o no, se describe mejor por sus características de receptor-operador (CRO) (véase en particular Zweig 1993, Clin. Chem. 39:561-577). El gráfico CRO es una representación de todos los pares de sensibilidad frente a todos los pares de especificidad resultante de la variación continua del umbral de decisión en todo el rango de datos observados. El rendimiento clínico de un método de diagnosis depende de su precisión, es decir, de su capacidad para asignar correctamente los sujetos a un determinado pronóstico o diagnóstico. El gráfico CRO indica la superposición entre las dos distribuciones, representando la sensibilidad frente a la 1-especificidad para el rango completo de umbrales adecuados para hacer una distinción. El eje y es el de la sensibilidad, o de la fracción de positivos verdaderos, que se define como la relación entre el número de resultados positivos verdaderos del ensayo y el producto del número de resultados positivos verdaderos por el número de falsos negativos. Esto también se conoce como positividad en presencia de una enfermedad o problema. Se calcula únicamente del subgrupo afectado. En el eje x se encuentra la fracción de falsos positivos, o 1-especificidad, que se define como la relación entre el número de resultados positivos falsos y el producto del número de resultados negativos verdaderos por el número de resultados positivos falsos. Es un índice de especificidad y se calcula completamente del subgrupo no afectado. Como las fracciones de positivos verdaderos y falsos se calculan completamente por separado, utilizando los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, el gráfico CRO es independiente de la prevalencia del episodio en la cohorte. Cada punto del gráfico CRO representa un par de sensibilidad/especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamientos de las dos distribuciones de resultados) tiene un diagrama CRO que pasa por la esquina superior izquierda, donde la fracción de positivos verdaderos es del 1,0 o 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción positivos falsos es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico de un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados en los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda hasta la esquina superior derecha. La mayoría de representaciones gráficas cae entre estos dos extremos.

Si la curva CRO cae completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se remedia fácilmente invirtiendo el criterio de “positividad” de “mayor que” a “menor que” o viceversa. Cualitativamente, cuando más cerca esté la curva de la esquina superior izquierda, mayor será la precisión general del ensayo. En función de un intervalo de confianza deseado se puede deducir un umbral de la curva CRO que permita el diagnóstico o la predicción de un determinado suceso, con un equilibrio apropiado de sensibilidad y especificidad, respectivamente. Por consiguiente, la referencia que debe emplearse para el método anteriormente mencionado de la presente invención, es decir, un umbral que permita discriminar entre sujetos que han sufrido un AIT y aquellos que no han sufrido un AIT se puede generar, preferiblemente, estableciendo una CRO para dicha cohorte, tal como se ha descrito anteriormente, y deduciendo de ella una cantidad umbral. El gráfico CRO permite deducir los umbrales adecuados en función de la sensibilidad y la especificidad deseadas para un método diagnóstico. Se entenderá que se desea una sensibilidad óptima para poder excluir un AIT (es decir, descartarlo), mientras que, para valorar si un sujeto ha sufrido un AIT (es decir, incluirlo), se prevé una especificidad óptima. También se prefiere que las cantidades determinadas en la etapa a) del método de la presente invención se comparen con más de una cantidad de referencia, p.ej. con una cantidad de referencia para incluir el AIT y otra cantidad de referencia para descartar el AIT.

Preferiblemente, la cantidad o cantidades de referencia proceden de una muestra de un sujeto (o grupo de sujetos) que haya sufrido un AIT (en particular, dentro de los periodos de tiempo especificados en otra parte del presente documento) y/o de un sujeto (o grupo de sujetos) que haya sufrido un AIT (en particular, dentro de los periodos de tiempo especificados en otra parte del presente documento).

Es preferible que el sujeto que no ha sufrido un AIT sea un sujeto sano. También es preferible que el sujeto que no ha sufrido un AIT no haya tenido una apoplejía, en particular dentro de los periodos de tiempo a los que se ha hecho referencia arriba.

También se prefiere que el sujeto de referencia (es decir, el sujeto que haya sufrido un AIT o un sujeto que no haya sufrido un AIT) tenga factores de riesgo para sufrir un episodio isquémico cerebral agudo, en particular un AIT. Los factores de riesgo dominantes para sufrir un episodio isquémico cerebral agudo, en particular un AIT, comprenden enfermedad arterial coronaria, fallo cardíaco, disfunción cardíaca sistólica y/o diastólica, enfermedad cardíaca valvular e hipertensión arterial. Otros factores de riesgo son la diabetes y la obesidad. De acuerdo con ello, el sujeto de referencia tiene preferentemente, como mínimo, uno de estos factores de riesgo. El sujeto de referencia sufre preferiblemente de enfermedad arterial coronaria. Con mayor preferencia el sujeto de referencia sufre insuficiencia cardíaca. Sobre todo, tanto el sujeto de referencia como el sujeto examinado sufren insuficiencia cardíaca. También preferiblemente, el sujeto de referencia y el sujeto examinado sufren de insuficiencia cardíaca. Esto es válido en particular, cuando se determinan las cantidades de NT-proANP y NT-proBNP y si la relación entre las cantidades de NT-proANP y NT-proBNP está calculada en el contexto del método de la presente invención (véase en otra parte de este documento).

Si solo se determina la cantidad de NT-proANP, también es preferible que ni el sujeto de referencia ni el sujeto examinado sufran de insuficiencia cardíaca o enfermedad arterial coronaria.

Lo siguiente tiene validez como algoritmos diagnósticos.

La cantidad de referencia procede preferiblemente de

- a. una muestra de un sujeto (o de un grupo de sujetos) que haya padecido un AIT, de manera que una cantidad de NT-proANP en la muestra del sujeto examinado que sea básicamente idéntica a la cantidad de referencia o superior a ella indicará que el sujeto ha tenido un ataque isquémico transitorio, y/o
- b. una muestra de un sujeto conocido que no haya sufrido un AIT, de manera que una cantidad de NT-proANP en la muestra del sujeto examinado que sea básicamente idéntica a la cantidad de referencia o inferior a ella indicará que el sujeto no ha tenido un ataque isquémico transitorio.

Una cantidad de referencia preferida procedente de una muestra de un sujeto (o grupo de sujetos) que haya tenido un AIT es de aproximadamente 54500 pg/ml hasta 150000 pg/ml y, con mayor preferencia, de aproximadamente 54500 hasta 137800 pg/ml. Aun con mayor preferencia, una cantidad de referencia procedente de una muestra de un sujeto (o de un grupo de sujetos) que haya tenido un AIT es aproximadamente de 137500 o 94800, o sobre todo de 54500 pg/ml.

Una cantidad de referencia preferida procedente de una muestra de un sujeto (o grupo de sujetos) que no haya tenido un AIT es de aproximadamente 1000 pg/ml hasta 33600 pg/ml y, con mayor preferencia, de aproximadamente 1000 hasta 12570 pg/ml. Aun con mayor preferencia, una cantidad de referencia procedente de una muestra de un sujeto (o de un grupo de sujetos) que no haya tenido un AIT es aproximadamente de 33600 o 15000, o sobre todo de 12570 pg/ml. Se prefiere también que la cantidad de referencia sea de 4662 pg/ml.

Además, la cantidad de referencia puede definir una cantidad umbral, en particular una cantidad de referencia calculada de manera que una cantidad NT-proANP en la muestra del sujeto examinado superior al correspondiente umbral indique un AIT, mientras que una cantidad de NT-proANP en la muestra del sujeto examinado inferior a la

cantidad de referencia calculada indicará que el sujeto no ha tenido un AIT. Una cantidad umbral particularmente preferida, calculada como cantidad de referencia, es aproximadamente de 54500 pg/ml o, con mayor preferencia, de 45000 pg/ml.

5 Tal como se emplea aquí, el término “aproximadamente” significa $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$ o $\pm 1\%$ de los valores concretos indicados.

En una forma de ejecución preferida del método de la presente invención se incluirá un AIT. En este caso la cantidad de referencia procede de una muestra de un sujeto (o de muestras de un grupo de sujetos) que haya tenido un AIT.

10 Por consiguiente, esta revelación contempla un método para admitir un ataque isquémico transitorio (AIT) en un sujeto que supuestamente ha sufrido un ataque isquémico transitorio, pero no un accidente cerebrovascular; dicho método comprende las etapas de

15 a. determinar la cantidad de NT-proANP en una muestra de dicho sujeto, y
b. comparar la cantidad de NT-proANP así determinada con una cantidad de referencia, por lo cual se reconoce un ataque isquémico transitorio,

20 de modo que la cantidad de referencia procede de una muestra de un sujeto (o de muestras de un grupo de sujetos) que ha tenido un AIT, de manera que una cantidad de NT-proANP en la muestra del sujeto examinado que sea básicamente idéntica a la cantidad de referencia o superior a ella indica que el sujeto ha sufrido un ataque isquémico transitorio.

25 En una forma de ejecución preferida del método de esta revelación se incluirá un AIT. En este caso, la cantidad de referencia procede de una muestra del sujeto (o de muestras de un grupo de sujetos) que no haya tenido un AIT.

30 Por consiguiente, esta revelación contempla un método para descartar un ataque isquémico transitorio (AIT) en un sujeto que supuestamente ha sufrido un ataque isquémico transitorio, pero no un accidente cerebrovascular; dicho método comprende las etapas de

a. determinar la cantidad de NT-proANP en una muestra de dicho sujeto, y
b. comparar la cantidad de NT-proANP así determinada con una cantidad de referencia, por lo cual se descarta un ataque isquémico transitorio,

35 de modo que la cantidad de referencia procede de una muestra de un sujeto (o de muestras de un grupo de sujetos) que ha tenido un AIT, de manera que una cantidad de NT-proANP en la muestra del sujeto examinado que sea básicamente igual a la cantidad de referencia o inferior a ella indica que el sujeto no ha sufrido un ataque isquémico transitorio.

40 De acuerdo con esta revelación, el método mencionado anteriormente comprende además las etapas de determinar la cantidad de NT-proBNP en una muestra del sujeto y calcular la relación entre la cantidad de NT-proANP y la cantidad de NT-proBNP. La determinación de ambos marcadores es útil, ya que la relación entre las cantidades de ambos marcadores permite diagnosticar de modo particularmente fiable el AIT en sujetos con insuficiencia cardíaca (véanse los Ejemplos).

45 Se revela un método para diagnosticar un ataque isquémico transitorio (AIT) en un sujeto que supuestamente ha sufrido un ataque isquémico transitorio, pero no un accidente cerebrovascular, que consiste en

50 a. determinar la cantidad de NT-proANP en una muestra de dicho sujeto,
b. determinar la cantidad de NT-proBNP en una muestra de dicho sujeto, y
c. calcular la relación entre las cantidades de NT-proANP y NT-proBNP.

Las cantidades determinadas en las anteriores etapas a) y b) se miden preferiblemente en la misma muestra. Sin embargo, también está contemplado determinar las cantidades en muestras diferentes.

55 El método puede comprender además la comparación de la relación así calculada con una relación de referencia, diagnosticando de este modo el AIT en dicho sujeto.

60 Esta revelación también se refiere a un método para diagnosticar un ataque isquémico transitorio (AIT) en un sujeto que supuestamente ha sufrido un ataque isquémico transitorio, pero no un accidente cerebrovascular, que consiste en,

65 a. determinar la cantidad de NT-proANP en una muestra de dicho sujeto,
b. determinar la cantidad de NT-proBNP en una muestra de dicho sujeto,
c. calcular la relación entre las cantidades de NT-proANP y NT-proBNP, y
d. comparar dicha relación con una relación de referencia, diagnosticando así el AIT en dicho sujeto.

El método puede incluir además el paso de recomendar una terapia idónea, cuando se haya diagnosticado un AIT.

En un aspecto, un agente detector adecuado puede ser un anticuerpo que se une específicamente al marcador en una muestra de un sujeto investigado mediante el método de la invención. Según un aspecto, otro agente detector utilizable puede ser un aptámero que se une específicamente al marcador en la muestra. En otro aspecto más, la muestra se elimina del complejo formado entre el agente de detección y el marcador, antes de medir la cantidad de complejo formado. Por consiguiente, en un aspecto, el agente detector puede inmovilizarse sobre un soporte sólido.

En otro aspecto, la muestra puede eliminarse del complejo formado sobre el soporte sólido aplicando una solución de lavado. El complejo formado debe ser proporcional a la cantidad de marcador presente en la muestra. Debe entenderse que la especificidad y/o la sensibilidad del agente detector aplicable define el grado de proporción de al menos un marcador contenido en la muestra, capaz de ser fijado específicamente. En otra parte de este documento hay detalles adicionales de sobre cómo puede llevarse a cabo la determinación. La cantidad de complejo formado se transformará en una cantidad de al menos un marcador, que refleje la cantidad realmente presente en la muestra.

En un aspecto, dicha cantidad puede ser esencialmente la cantidad presente en la muestra o, según otro aspecto, una cantidad que sea igual a una cierta proporción de la misma, según la relación entre el complejo formado y la cantidad presente en la muestra original.

Además, la presente invención se refiere al uso del polipéptido NT-proANP como biomarcador en una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de un sujeto que supuestamente ha sufrido un ataque isquémico transitorio (AIT), para diagnosticar el ataque isquémico transitorio (AIT), cuando el sujeto sospechoso de haber sufrido un ataque isquémico transitorio ha presentado síntomas de AIT en las 72 horas previas a la obtención de la muestra, en particular cuando el sujeto ha presentado síntomas de AIT en las 24 horas anteriores a la obtención de la muestra, y cuando el sujeto ya no presenta síntomas de AIT en el momento de la obtención de la muestra.

Además la presente invención se refiere al uso de un agente detector que se une específicamente a NT-proANP en una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de un sujeto que supuestamente ha sufrido un ataque isquémico transitorio (AIT), para diagnosticar un ataque isquémico transitorio (AIT), cuando el sujeto sospechoso de haber sufrido un ataque isquémico transitorio ha presentado síntomas de AIT en las 72 horas previas a la obtención de la muestra, en particular cuando el sujeto ha presentado síntomas de AIT en las 24 horas anteriores a la obtención de la muestra, y cuando el sujeto ya no presenta síntomas de AIT en el momento de la obtención de la muestra.

Tal como se emplea aquí, el término “agente detector” se refiere a un agente capaz de reconocer específicamente y fijar el biomarcador aludido en esta descripción (NT-proANP o NT-proBNP), cuando está contenido en una muestra.

Además, dicho agente deberá permitir la detección directa o indirecta del complejo formado por dicho agente y el biomarcador. La detección directa se puede lograr incluyendo un marcador detectable en el agente. La marcación indirecta se puede lograr mediante un agente adicional que se une específicamente al complejo que comprende el biomarcador y el agente de detección, en el cual dicho agente adicional sea capaz de generar después una señal detectable. Los compuestos adecuados utilizables como agentes detectores son bien conocidos del estado técnico.

Preferentemente, el agente detector es un anticuerpo o aptámero que se une específicamente al biomarcador. Los anticuerpos aquí mencionados incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como Fv, Fab y F(ab)₂, capaces de unirse al antígeno o al hapteno. Asimismo se contemplan anticuerpos de cadena simple y anticuerpos híbridos humanizados, en los cuales se combinan secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano - que presenta una especificidad de antígeno deseada - con secuencias de un anticuerpo receptor humano.

La presente invención se refiere también a un dispositivo para diagnosticar un ataque isquémico transitorio, que consta de:

- a) una unidad de análisis que incluye un agente detector del polipéptido NT-proANP para poder determinar la cantidad de dicho polipéptido NT-proANP; y
- b) una unidad de evaluación con un procesador de datos que tiene implementado un algoritmo para comparar la cantidad determinada por la unidad de análisis con la cantidad de referencia almacenada en una base de datos, a fin de establecer el diagnóstico, de manera que la cantidad de referencia procede de una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto, tal como se define en la reivindicación 5, y el algoritmo es como se define en la reivindicación 5, y de manera que el sujeto sospechoso de haber sufrido un ataque isquémico transitorio ha presentado síntomas de AIT en las 72 horas previas a la obtención de la muestra, en particular que el sujeto ha presentado síntomas de AIT en las 24 horas previas a la obtención de la muestra, y que el sujeto ya no muestra síntomas de AIT en el momento de la obtención de la muestra.

Tal como se usa aquí, el término “dispositivo” se refiere a un sistema que comprende las unidades antes citadas, conectadas operativamente entre sí para permitir el diagnóstico conforme a los métodos de la presente invención.

Los agentes detectores preferidos que se pueden usar en la unidad de análisis están descritos en otra parte del presente documento. La unidad de análisis lleva preferiblemente dichos agentes detectores en forma inmovilizada sobre un soporte sólido que entrará en contacto con la muestra que contiene los biomarcadores cuya cantidad debe determinarse. Además, la unidad de análisis también puede incluir un detector que determine la cantidad de agente detector unido específicamente al biomarcador o biomarcadores. La cantidad determinada se puede transmitir a la unidad de evaluación. Dicha unidad de evaluación incluye un elemento procesador 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 proceder de muestras de sujetos que se utilizarán para la generación de cantidades de referencia, tal como ha descrito en otra parte anterior del presente documento. Los resultados del diagnóstico se pueden emitir como datos primarios de parámetros diagnósticos, preferiblemente como cantidades absolutas o relativas. Debe entenderse que estos datos pueden necesitar interpretación por parte del médico. No obstante, también se contemplan dispositivos con sistemas expertos que proporcionan de salida datos primarios de diagnóstico ya procesados, cuya interpretación no requiere un médico especialista. Preferiblemente, el dispositivo de la presente invención se puede usar para desarrollar de forma automatizada el método anteriormente mencionado de la presente invención.

Una forma de ejecución preferida de la presente descripción incluye un sistema para diagnosticar AIT o un episodio cerebral agudo, tal como se describe en otra parte del documento. Los ejemplos de sistemas incluyen analizadores de química clínica, analizadores químicos de coagulación, analizadores de inmunquímica, analizadores de orina y analizadores de ácidos nucleicos, los cuales se utilizan para detectar el resultado de las reacciones químicas o biológicas o para controlar el progreso de las reacciones químicas o biológicas. Más concretamente, en los ejemplos de sistemas para la presente divulgación se pueden incluir los analizadores de ensayos inmunológicos Elecsys[®] Systems y Cobas[®] de Roche, Architect[®] y AxSYM[®] de Abbott, Centaur[®] y Immulite[®] de Siemens, UniCel[®] y Acess[®] de Beckman Coulter, o similares.

Las formas de ejecución del sistema pueden comprender una o más unidades analizadoras, utilizadas para poner en práctica lo revelado. Las unidades analizadoras del sistema aquí revelado están conectados operativamente con el dispositivo informático aquí descrito mediante cableado, Bluetooth, LANS o señal inalámbrica, como ya es conocido.

Además, según la presente revelación, una unidad analizadora puede incluir un aparato autónomo o módulo dentro de un instrumento más grande que realiza una o ambas detecciones, p.ej. la evaluación cualitativa y/o cuantitativa de muestras con fines diagnósticos. Por ejemplo, una unidad analizadora puede llevar a cabo o asistir el pipeteo, la dosificación y la mezcla de muestras y/o reactivos. Una unidad de análisis puede incluir una parte que contenga los reactivos para efectuar los ensayos. Los reactivos se pueden disponer, por ejemplo, en recipientes o cartuchos que contengan reactivos individuales o grupos de reactivos, colocados en receptáculos o posiciones apropiadas dentro de un compartimiento de almacenamiento o transportador. Los reactivos detectores también pueden estar en forma inmovilizada sobre un soporte sólido que se pone en contacto con la muestra. Además, una unidad analizadora puede incluir un componente procesador y/o detector optimizable para análisis específicos.

Según algunas formas de ejecución, una unidad analizadora se puede configurar para la detección óptica de un analito, por ejemplo un marcador, en una muestra. Un ejemplo de unidad analizadora configurada para la detección óptica comprende un dispositivo configurado para convertir energía electromagnética en una señal eléctrica, el cual incluye detectores ópticos tanto de un solo elemento como de múltiples elementos. Según la presente descripción, un detector óptico es capaz de controlar una señal óptica electromagnética y emitir una señal eléctrica o una señal de respuesta respecto a una señal de referencia indicativa de la presencia y/o concentración de un analito en una muestra situada en una ruta óptica. Estos dispositivos también pueden incluir, por ejemplo, fotodiodos, incluyendo fotodiodos de avalancha, fototransistores, detectores fotoconductores, matrices de sensores lineales, detectores CCD, detectores CMOS, incluyendo detectores de matriz CMOS, fotomultiplicadores y matrices fotomultiplicadoras.

Según ciertas formas de ejecución, un detector óptico, tal como un fotodiodo o un fotomultiplicador, puede contener un acondicionador de señales o una electrónica de procesamiento adicional. Por ejemplo, un detector óptico puede incluir al menos un preamplificador, un filtro electrónico o un circuito integrado. Los preamplificadores adecuados incluyen, por ejemplo, preamplificadores de integración, de transimpedancia y de ganancia de corriente (espejo de corriente).

Además, una o más unidades analizadoras según la presente descripción pueden incluir una fuente luminica para emitir luz. Por ejemplo, una fuente luminica de una unidad analizadora puede constar, como mínimo, de un elemento emisor de luz (como un diodo emisor de luz, una fuente de radiación eléctrica tal como una lámpara incandescente, una lámpara electroluminiscente, una lámpara de descarga de gas, una lámpara de descarga de intensidad, un láser) para medir las concentraciones de analito en una muestra analizada o para permitir una transferencia de energía (por ejemplo, mediante la transferencia de energía de resonancia fluorescente o catálisis enzimática).

La unidad analizadora del sistema también puede incluir una o más unidades de incubación (por ejemplo, para mantener una muestra o un reactivo a una temperatura especificada o dentro de un intervalo de temperatura). En algunas formas de ejecución la unidad analizadora puede llevar un termociclador, incluyendo un termociclador en

tiempo real, para someter una muestra a ciclos de temperatura repetidos y controlar los cambios cuantitativos de un producto de amplificación con la muestra.

Además, una unidad analizadora del sistema aquí revelado puede incluir un recipiente de reacción o una unidad de alimentación de cubetas o estar conectada operativamente a ellas. Como ejemplos de unidades de alimentación cabe citar unidades de procesamiento de líquidos, tales como una unidad de pipeteo, para suministrar muestras y/o reactivos a los recipientes de reacción. La unidad de pipeteo puede comprender una aguja lavable reutilizable, p.ej. una aguja de acero o puntas de pipeta desechables. La unidad analizadora puede comprender además una o más unidades mezcladoras, por ejemplo, un agitador para remover una cubeta que contenga un líquido, o una pala para mezclar líquidos en una cubeta o agitar recipientes de reactivos.

De lo anterior, según algunas formas de ejecución de la presente revelación, se desprende que algunas etapas de los métodos aquí revelados y descritos pueden ser efectuadas por un dispositivo informático, el cual puede ser por ejemplo un ordenador de tipo general o un dispositivo informático portátil. También debe entenderse que se pueden usar conjuntamente varios dispositivos informáticos para realizar una o más etapas de los métodos aquí descritos, por ejemplo mediante una red u otros métodos de transferencia de datos. Los ejemplos de dispositivos informáticos incluyen ordenadores de sobremesa, ordenadores portátiles, ordenadores personales de bolsillo ("PDA"), tales como los dispositivos de la marca BLACKBERRY, dispositivos celulares, tabletas, servidores y similares. En general, un dispositivo informático consiste en un procesador capaz de ejecutar múltiples instrucciones (tal como un programa informático).

Un dispositivo informático tiene preferiblemente acceso a una memoria. Una memoria es un medio legible mediante ordenador y puede constar de un solo dispositivo de almacenamiento o de varios de ellos, ubicados localmente en el dispositivo informático o accesibles al dispositivo informático a través de una red, por ejemplo. Los medios legibles por ordenador pueden ser cualquier medio disponible al que se pueda acceder mediante el dispositivo informático, incluyendo tanto medios volátiles como no volátiles. Además, los medios legibles por ordenador pueden ser de tipo extraíble y no extraíble o de ambos tipos. A modo de ejemplo, sin limitarse a ellos, los medios legibles por ordenador pueden incluir medios de almacenamiento informático. Como ejemplos de medios de almacenamiento informático cabe mencionar, sin limitarse a ellos, RAM, ROM, EEPROM, memoria flash o cualquier otra tecnología de memoria, CD-ROM, disco digital versátil (DVD) u otro tipo de almacenamiento en disco óptico, casetes magnéticos, cinta magnética, almacenamiento en disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético, o cualquier otro medio utilizable para almacenar una variedad de instrucciones a las que pueda acceder el dispositivo informático y ser ejecutadas por el procesador del dispositivo informático.

Según unas formas de ejecución de la presente descripción, el programa informático puede incluir instrucciones que, al ser ejecutadas por un procesador del dispositivo informático, efectúen una o más etapas de los métodos aquí descritos. Algunas de las instrucciones pueden adaptarse para producir señales que controlen el funcionamiento de otras máquinas y operen por tanto a través de estas señales de control para transformar materiales muy alejados del propio ordenador. Estas descripciones y representaciones son los medios utilizados por los expertos en la técnica del procesamiento de datos, por ejemplo, para transmitir de forma más eficaz el contenido de su trabajo a otros expertos en la materia.

Las diversas instrucciones también pueden incluir un algoritmo concebido en general como una serie coherente de pasos que conducen a un resultado deseado. Se trata de pasos que requieren manipulaciones físicas de cantidades físicas. Por lo general, aunque no necesariamente, estas cantidades toman la forma de pulsos o señales eléctricas o magnéticas capaces de ser almacenadas, transferidas, transformadas, combinadas, comparadas y manipuladas de otro modo. A veces, sobre todo por razones de uso común, conviene representar estas señales en forma de valores, caracteres, datos de visualización, números o similares, como referencia de los elementos físicos o manifestaciones reproducidas o expresadas por tales señales. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que todos estos términos y otros similares deben relacionarse con las cantidades físicas apropiadas y que en este caso se usan meramente como etiquetas convenientes aplicadas a estas cantidades. Según algunas formas de ejecución de la presente revelación, un algoritmo para efectuar una comparación entre una determinada cantidad de uno o más de los marcadores aquí descritos y una referencia adecuada se plasma y se realiza ejecutando las instrucciones. Los resultados pueden salir como datos primarios de los parámetros de diagnóstico o como cantidades absolutas o relativas. Según diversas formas de ejecución del sistema aquí descrito, un "diagnóstico" puede ser transmitido por el dispositivo informático de un sistema descrito en este documento, basándose en dicha comparación de la "cantidad" calculada con una referencia o un umbral. Por ejemplo, un dispositivo informático de un sistema puede proporcionar una indicación, en forma de una palabra, símbolo o valor numérico, reveladora de un diagnóstico particular.

El dispositivo informático también puede tener acceso a un dispositivo de salida. Como ejemplos de dispositivos de salida cabe citar máquinas de fax, pantallas, impresoras y archivos, por ejemplo. Según algunas formas de ejecución de la presente revelación, un dispositivo informático puede realizar una o más etapas de un método aquí descrito y a continuación proporcionar una emisión a través de un dispositivo de salida, relacionada con un resultado, indicación, relación u otro factor del método.

La presente invención también comprende un kit para diagnosticar AIT en un sujeto. Este kit lleva al menos un agente detector del polipéptido NT-proANP y, preferentemente, patrones que reflejan las cantidades de referencia procedentes de un sujeto que ha tenido un AIT y/o de un sujeto que no ha exhibido un AIT:

- 5 Los siguientes ejemplos solo sirven para ilustrar la presente invención. No deben interpretarse en absoluto como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1: determinación de NT-proBNP y NT-proANP

10 El NT-proBNP se determinó mediante el ensayo ELISA sándwich de electroquimioluminiscencia Elecsys proBNP II STAT (Short Turn Around Time [tiempo de respuesta corto]) de Roche. En el ensayo se emplean dos anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos localizados en la parte N-terminal (1-76) del proBNP (1-108).

15 El NT-proANP (aminoácidos 1 hasta 98 del péptido pre-pro ANP) se determinó mediante el ensayo de NT-pro ANP de Biomedica Medizinprodukte GmbH (Viena, Austria). Número de catálogo BI-20892. El límite de detección es de 0,05 nmol/l. En el ensayo se usan anticuerpos policlonales de oveja anti proANP.

El nivel de los biomarcadores se ensayó en muestras de suero del siguiente grupo de sujetos

- 20
- sujetos sanos (n = 149),
 - pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) estable (es decir, pacientes en los cuales se desarrolla con frecuencia un accidente cerebrovascular, n = 235),
 - pacientes con descompensación cardíaca (n = 64),
 - pacientes con AIT (n = 79),
- 25
- pacientes con accidente cerebrovascular menor y mayor (n = 61 y 108, respectivamente).

Pacientes con EAC: se incluyó en el estudio un total de 235 pacientes con enfermedad arterial crónica, cuya edad media era de 64 años, 141 hombres y 94 mujeres. En todos los pacientes la enfermedad de la arteria coronaria se verificó por angiografía. La clasificación de la enfermedad de los vasos como 1, 2 o 3 se basó en una reducción del 50% del diámetro del vaso. La función cardíaca se evaluó por ecocardiografía y determinación del NT-pro BNP.

30

Insuficiencia cardíaca: otro grupo de 64 pacientes presenta insuficiencia cardíaca descompensada (24 mujeres y 40 hombres, con una edad media de 69 años). Se caracterizaban por una dificultad cada vez mayor para respirar en las 2 semanas anteriores; todos los pacientes se pudieron clasificar como NYHA III o IV conforme a la clasificación de la NYHA.

35

Controles sanos: 149 sujetos humanos clínicamente sanos se incluyeron en el estudio como controles, 52 varones y 97 mujeres (mediana de edad 41 años, rango de 19 hasta 56 años). Estos sujetos no tenían ninguna enfermedad cardíaca según la valoración del historial clínico y un electrocardiograma, sin diabetes mellitus ni factores de riesgo de estas enfermedades. Además tenían una función renal normal, verificada por unos valores normales de creatinina y trastornos malignos.

40

Pacientes de accidente cerebrovascular/AIT: se incluyó en este estudio un total de 255 pacientes de AIT o accidente cerebrovascular isquémico (edad media de 70 años). 23 pacientes tuvieron un ataque isquémico transitorio, el accidente cerebrovascular menor se diagnosticó en 61 pacientes y el accidente cerebrovascular mayor se encontró en 108 pacientes. Además, como se ha descrito anteriormente, se tomaron imágenes transcraneales y de la arteria carótida por ultrasonidos, y se hicieron electro- y ecocardiografías para registrar los pacientes según los criterios de la clasificación TOAST. En los pacientes con accidente cerebrovascular y AIT, los biomarcadores NT-proANP y NT-proBNP se midieron en muestras obtenidas al presentarse y en muestras obtenidas a las seis y 24 horas después de su llegada. El intervalo mediano entre la aparición de los síntomas y el ingreso fue de 4,2 horas (25° percentil: 2,5, 75° percentil: 8 horas).

45

50

Ejemplo 2: resultados

55 Se obtuvieron los siguientes resultados (se indican los niveles de mediana, así como el percentil 25° y 75°):

	NT-pro BNP pg/ml	NT-pro ANP pg/ml
Sujetos sanos N = 149	37 16 – 68	882 635 – 1280
Pacientes con EAC estable N = 236	266 95 – 928	2710 1880 – 4662
Pacientes con descompensación cardíaca N = 64	4477 1971 - 7131	3600 12570 – 57800
AIT, n = 27	331 165 – 473	106000 79000 – 149000
Accidente cerebrovascular menor, n = 60	238 79 – 547	81000 43400 – 125000
Accidente cerebrovascular mayor (n = 108)	412 127 - 1053	107151 70600 - 240000

5 El sorprendente hallazgo indicó que los niveles de NT-pro ANP en el accidente cerebrovascular aumentaron de manera significativa en los pacientes con AIT y accidente cerebrovascular. En particular fueron más altos que en la descompensación cardíaca manifiesta. Por lo tanto el NT-pro ANP separó pacientes cardíacos de pacientes con accidente cerebrovascular. La determinación de NT-proBNP proporciona información adicional.

10 Además, se determinaron las relaciones de NT-proANP a NT-proBNP: las relaciones fueron las siguientes (mediana, 25° percentil/75° percentil):

10	Sanos	74 (14/125)
	EAC	10 (4/25)
	IC descompensada	10 (4/18)
15	Accidente cerebrovascular mayor	249 (128/ 603)
	Accidente cerebrovascular menor	321 (149/ 670)
	AIT	524 (204/905)

20 Como puede verse en la tabla, la determinación de la relación es conveniente porque permite diferenciar entre i) los pacientes que tienen factores de riesgo de accidente cerebrovascular/AIT, es decir los pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) y los pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) que tienen niveles elevados de NT-proANP y NT-proBNP, y ii) los pacientes que han sufrido un accidente cerebrovascular o un AIT.

25 Al hacer el seguimiento de los valores de NT-pro ANP durante el accidente cerebrovascular se obtuvieron los niveles siguientes:

	NT-pro ANP pg/ml
30	Al presentarse 106000 79000 - 149000
	A las 6 horas 95500 54000- 139000
	A las 24 horas 82000 48000 - 139000

35 El seguimiento indicó que este efecto era duradero, lo cual indica que también se podrían reconocer episodios pasados.

Conclusiones:

40 El reconocimiento del AIT es importante porque puede preceder al accidente cerebrovascular que es frecuentemente incapacitante. El AIT suele durar solo unos minutos y la mayoría de los AIT se resuelven en una hora sin causar daño cerebral permanente. El diagnóstico del AIT es difícil porque i) el AIT mimetiza varios trastornos distintos, dependiendo de la localización del AIT, y porque ii) los pacientes se presentan para valorar unos síntomas que ya han desaparecido, lo cual dificulta el diagnóstico final. El AIT aparece a menudo en pacientes con enfermedades cardíacas preexistentes, como la hipertensión sistémica, la enfermedad arterial coronaria y la insuficiencia cardíaca de diferente origen. Un hallazgo sorprendente de este estudio fue que el NT-pro ANP, que como es sabido se libera

en la insuficiencia cardíaca, tiene un aumento muy elevado en el accidente cerebrovascular y, sorprendentemente, también en el AIT excede los niveles hallados en pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada y descompensada.

5 La relación NT-pro ANP/NT-pro BNP también se puede utilizar de manera segura con este propósito, en particular para los pacientes con insuficiencia cardíaca.

10 La importancia clínica de la confirmación de la sospecha de AIT reside en la identificación de la causa subyacente (p.ej., cardioembólica), la intervención adecuada (angioplastia, p.ej. en la estenosis carotídea, anticoagulación en fibrilación auricular) y, por consiguiente, en la prevención del accidente cerebrovascular y en concreto del accidente cerebrovascular mayor.

15 Además, se ha demostrado que la determinación de la relación de NT-pro ANP/NT-pro BNP permite un diagnóstico fiable de accidente cerebrovascular y del AIT, sobre todo en pacientes que sufren insuficiencia cardíaca.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para diagnosticar un ataque isquémico transitorio (AIT) en un sujeto que supuestamente ha tenido un ataque isquémico transitorio, pero no un accidente cerebrovascular, el cual incluye las etapas de:
- 10 a) determinar la cantidad de NT-proANP en una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de dicho sujeto, para ver si el sujeto sospechoso de haber tenido un ataque isquémico transitorio ha mostrado síntomas de AIT en las 72 horas previas a la obtención de la muestra, en particular si el sujeto ha mostrado síntomas de AIT en las 24 horas previas a la obtención de la muestra y si el sujeto ya no muestra síntomas de AIT en el momento de obtener la muestra, y
- 15 b) comparar la cantidad determinada de NT-proANP con una cantidad de referencia, diagnosticando de esta manera si dicho sujeto ha tenido un ataque isquémico transitorio.
2. El método de la reivindicación 1, en que el sujeto sospechoso de haber sufrido un AIT es un sujeto que ha mostrado síntomas de AIT.
3. El método de las reivindicaciones 1 y 2, en el cual se diagnostica si el sujeto ha sufrido o no un AIT en las 72 horas previas a la obtención de la muestra, en particular si el sujeto ha mostrado síntomas de AIT en las 24 horas previas a la obtención de la muestra.
- 20 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual la muestra del sujeto no se ha obtenido antes de una hora después de los síntomas de AIT.
- 25 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual
- 30 a. la cantidad de referencia procede de una muestra de un sujeto que supuestamente ha tenido un AIT, de modo que una cantidad de NT-proANP en la muestra del sujeto examinado que sea esencialmente idéntica a la cantidad de referencia o que sea superior a la cantidad de referencia indica que el sujeto ha tenido un ataque isquémico transitorio, y/o
- 35 b. la cantidad de referencia procede de una muestra de un sujeto que supuestamente no ha tenido un AIT, de modo que una cantidad de NT-proANP en la muestra del sujeto examinado que sea esencialmente idéntica a la cantidad de referencia o que sea inferior a la cantidad de referencia indica que el sujeto no ha tenido un ataque isquémico transitorio.
- 40 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la cantidad de referencia es una cantidad de referencia calculada, de modo que una cantidad de NT-proANP en la muestra del sujeto examinado que sea superior a la cantidad de referencia calculada indica que el sujeto ha tenido un ataque isquémico transitorio, y de modo que una cantidad de NT-proANP en la muestra del sujeto examinado que sea inferior a la cantidad de referencia calculada indica que el sujeto no ha tenido un ataque isquémico transitorio-
- 45 7. El método de las reivindicaciones 1 a 6, en que el sujeto no padece insuficiencia cardíaca y/o enfermedad arterial coronaria.
- 50 8. Uso del polipéptido NT-proANP como biomarcador en una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de un sujeto que supuestamente ha padecido un ataque isquémico transitorio (AIT), para diagnosticar un ataque isquémico transitorio (AIT) cuando el sujeto sospechoso de haber sufrido un ataque isquémico transitorio ha mostrado síntomas de AIT en las 72 horas anteriores a la obtención de la muestra, en particular cuando el sujeto ha mostrado síntomas de AIT en las 24 horas anteriores a la obtención de la muestra y cuando el sujeto ya no muestra síntomas de AIT en el momento de la obtención de muestra.
- 55 9. Uso de un agente detector que se une específicamente al NT-proANP para diagnosticar un ataque isquémico transitorio en una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de un sujeto que supuestamente ha padecido un ataque isquémico transitorio (AIT), cuando el sujeto sospechoso de haber sufrido un ataque isquémico transitorio ha mostrado síntomas de AIT en las 72 horas anteriores a la obtención de la muestra, en particular cuando el sujeto ha mostrado síntomas de AIT en las 24 horas anteriores a la obtención de la muestra y cuando el sujeto ya no muestra síntomas de AIT en el momento de la obtención de muestra.
- 60 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el uso según la reivindicación 8 o 9, en el cual el sujeto es humano.
- 65 11. Dispositivo para diagnosticar un ataque isquémico transitorio, que comprende:
- a) una unidad analizadora que incluye un agente detector del polipéptido NT-proANP para poder determinar la cantidad de dicho polipéptido NT-proANP; y
- b) una unidad de evaluación que contiene un procesador de datos con un algoritmo implementado para comparar la cantidad determinada por la unidad analizadora con una cantidad de referencia almacenada en

- 5 una base de datos, a fin de establecer el diagnóstico, de manera que la cantidad de referencia procede de una muestra de sangre, suero o muestra de plasma de un sujeto tal como se define en la reivindicación 5, y el algoritmo es un algoritmo como el definido en la reivindicación 5, cuando el sujeto sospechoso de haber padecido un ataque isquémico transitorio ha mostrado síntomas de AIT en las 72 horas anteriores a la obtención de la muestra, en particular cuando el sujeto ha mostrado síntomas de AIT en las 24 horas anteriores a la obtención de la muestra y cuando el sujeto ya no muestra síntomas de AIT en el momento de la obtención de muestra.