

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 774 288**

51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2013 PCT/EP2013/073476**

87) Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072500**

96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2013 E 13789010 (9)**

97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2917736**

54) Título: **Diagnóstico basado en TnT o BNP de fibrilación auricular paroxística**

30) Prioridad:

09.11.2012 EP 12191996

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

20.07.2020

73) Titular/es:

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

72) Inventor/es:

**BLOCK, DIRK;
LATINI, ROBERTO;
MASSON, SERGE;
WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE;
ZAUGG, CHRISTIAN y
ZIEGLER, ANDRE**

74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 774 288 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico basado en TnT o BNP de fibrilación auricular paroxística

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente. El procedimiento se basa en la determinación del al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, NT-proBNP (prohormona N terminal del péptido natriurético cerebral), hsCRP, IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) en una muestra del sujeto, y en la comparación, por tanto, de la(s) cantidad(es) determinada(s) con una cantidad de referencia (cantidades de referencia). Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar a un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante y a un procedimiento para diagnosticar una fibrilación auricular continua en base a la determinación de la cantidad de IGFBP7. Se prevén otros sistemas, reactivos y kits usados para realizar los procedimientos divulgados en el presente documento.
- 10
- 15 La fibrilación auricular es la arritmia cardíaca más común. Sin embargo, la fibrilación auricular (FA) con frecuencia no se reconoce por el paciente. Este es el caso en aproximadamente un 40 % de los pacientes, lo que indica que la anamnesis es insensible para el diagnóstico de fibrilación auricular (Kamel H. *et al.*, *Curr Atheroscler Rep* 2011; 13: 338 - 343). Aunque estos números se refieren a fibrilación auricular persistente, la fibrilación auricular paroxística es aún más difícil de diagnosticar y solo se puede registrar por telemetría cardíaca hospitalaria o incluso monitorización Holter. Por tanto, el reconocimiento de fibrilación auricular paroxística es un desafío importante, específicamente porque al menos un 1 % de la población general tiene fibrilación auricular persistente y la frecuencia se incrementa con la edad (Rizos T. *et al.*).
- 20
- 25 La fibrilación auricular paroxística se define como episodios recurrentes de fibrilación auricular que terminan espontáneamente en menos de siete días, normalmente menos de 24 horas. Puede ser autolimitada o bien intermitente. La fibrilación auricular paroxística es común (5-10 % de los sujetos ancianos (véase Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. Heeringa *et al.*, *Eur Heart J.* 2006; 27(8):949). Los pacientes no tratados tienen un incremento en el riesgo de apoplejía (sin anticoagulación).
- 30 El tratamiento de referencia para detectar la fibrilación auricular es el electrocardiograma (ECG), preferentemente realizado como ECG de 24 horas (monitorización Holter). Sin embargo, la monitorización Holter solo puede detectar fibrilación auricular si la arritmia se produce en el período de 24 horas de registro de ECG.
- 35 Varias publicaciones implican la asociación de biomarcadores a una potenciación en los niveles con fibrilación auricular (Biomarkers in Atrial Fibrillation: Investigating Biologic Plausibility, Cause, and Effect R. Becker *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 19(1), 71-75, 2005).
- 40 La evaluación de Nt-ProBNP proporciona un medio para evaluar la disfunción sistólica. Los ensayos de troponina de alta sensibilidad permiten la detección de lesión cardíaca asintomática. Se ha descrito que una elevación en los niveles tanto de troponina T y como de Nt-ProBNP predicen independientemente un mayor riesgo de una primera recaída de fibrilación auricular después de 6 o 12 meses (Circulating cardiovascular bio markers in recurrent atrial fibrillation: data from the GISSI-Atrial Fibrillation Trial, R. Latini *et al.*, *J Intern Med* 2011;269:160-171). I. Beaulieu-Boire describió que la elevación en los niveles de cTnI en pacientes con apoplejía isquémica (AIS) o accidente isquémico transitorio (AIT) que es predictivo de FA de reciente aparición y se asocia con un peor pronóstico y una mayor tasa de mortalidad (I. Beaulieu-Boire *et al.* *J Stroke Cerebrovasc Dis.*, 15 febrero 2012, disponible en línea, en prensa).
- 45
- 50 Varias otras publicaciones describen la asociación de un incremento en los niveles de biomarcadores con el diagnóstico y/o predicción de la fibrilación auricular (Kirchhof *et al.*, 26 julio 2011, *Europace Epub*, Comprehensive risk reduction in patients with atrial fibrillation: emerging diagnostic and therapeutic options: un informe de la 3rd Atrial Fibrillation Competence NETwork/European Heart Rhythm Association consensus conference; Circulating cardiovascular biomarkers in recurrent atrial fibrillation: datos del GISSI-Atrial Fibrillation Trial, R. Latini *et al.*, *J Intern Med* 2011;269:160-171). Los biomarcadores sanguíneos que permitirían diagnosticar la aparición reciente de fibrilación auricular paroxística son altamente deseables ya que la determinación de estos biomarcadores permitiría identificar a pacientes que se pueden beneficiar del tratamiento anticoagulante.
- 55
- 60 Bugnicourt *et al.* 2010 (*Eur Neurol* 2010;63:24-28) divulga que los niveles de troponina I cardíaca predicen la fibrilación auricular de reciente aparición en pacientes con apoplejía isquémica. También divulgó que se sabe que una elevación en los niveles de troponina I se asocia con fibrilación auricular.
- 65 Hijazi *et al.* 2012 (*Circulation*.125:1605-1616) divulga que las elevaciones de troponina I y NTproBNP son comunes en pacientes con FA y se relacionan independientemente con un incremento en los riesgos de apoplejía y mortalidad.
- Marcus *et al.* 2008 (*Heart Rhythm*. 2008 Feb;5(2):215-21) divulga que los niveles de CRP e IL-6 se elevan en pacientes que presentan fibrilación auricular.
- Choudhury *et al.* 2008 (*Sep*;134(3):574-81) divulga un procedimiento basado en la detección de sCD40L para

diagnosticar la fibrilación auricular. Específicamente, los pacientes con FA tenían niveles de sCD40L significativamente mayores en comparación con los sujetos de control sanos.

5 Cohen *et al.* 2007 (doi:10.1093/eurheartj/ehm170) informa de un procedimiento basado en la detección del dímero D para diagnosticar la fibrilación auricular.

Latini *et al.* 2011 (J Intern Med. 2011 Feb;269(2):160-71) divulga un procedimiento para predecir la reaparición de fibrilación auricular basado en la detección de NTproANP, hsTnT o NTproBNP en pacientes con antecedentes de FA.

10 Wachter *et al.* 2012 (PLoS ONE 7(4): e34351. doi:10.1371/journal.pone.0034351) divulga que se puede usar BNP para detectar la FA paroxística.

15 Rizos *et al.* 2010 (Journal of Human Hypertension 24, 447-457) divulga que se pueden usar hsCRP e IL-6 para detectar la FA paroxística.

El problema técnico subyacente a la presente invención se puede ver como la provisión de medios y procedimientos para cumplir con las necesidades mencionadas anteriormente.

20 El problema técnico se resuelve por los modos de realización caracterizados en las reivindicaciones y en el presente documento a continuación.

También se describe un procedimiento para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente en un sujeto, que comprende:

25 (a) determinar la cantidad de al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP (prohormona N terminal del péptido natriurético cerebral), hsCRP, IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) en una muestra del sujeto, y

30 (b) comparar la(s) cantidad(es) así determinada(s) de dicho al menos un marcador con una cantidad de referencia (con cantidades de referencia), con lo que se diagnostica una fibrilación auricular paroxística reciente,

en el que el sujeto no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra.

35 Preferentemente, se diagnostica una fibrilación auricular paroxística reciente llevando a cabo la etapa adicional de c) diagnosticar una fibrilación paroxística reciente, en base a los resultados de la comparación llevada a cabo en la etapa b).

40 En un modo de realización, la determinación de la(s) cantidad(es) del/de los biomarcador(es) en la etapa (a) se realiza poniendo en contacto la muestra con un agente de detección que se une específicamente al biomarcador (o con agentes de detección que se unen específicamente a los biomarcadores), formando de este modo un complejo con el agente de detección y el biomarcador, detectando la(s) cantidad(es) del/de los complejo(s) formado(s), determinando de este modo la cantidad del biomarcador. El término "agente de detección" se ha especificado en otra parte en el presente documento.

45 En un modo de realización, el procedimiento mencionado anteriormente puede comprender además la etapa (c) de proporcionar un diagnóstico de fibrilación auricular paroxística reciente cuando la cantidad del/de los biomarcador(es) en la muestra del sujeto está por encima de la(s) cantidad(es) de referencia y/o de proporcionar un diagnóstico de la ausencia de fibrilación auricular cuando la(s) cantidad(es) del/de los biomarcador(es) en la muestra del sujeto está(n) por debajo de la cantidad de referencia.

50 El procedimiento de la presente divulgación, preferentemente, es un procedimiento *ex vivo* o *in vitro*. Además, puede comprender etapas además de las mencionadas de forma explícita anteriormente. Por ejemplo, otras etapas se pueden referir a pretratamientos de muestras o evaluación de los resultados obtenidos por el procedimiento. El procedimiento se puede llevar a cabo manualmente o asistido por automatización. Preferentemente, la etapa (a) y/o

55 (b) puede estar asistida totalmente o en parte por automatización, por ejemplo, por un equipo robótico o sensitivo adecuado para la determinación en la etapa (a) o una comparación implementada por ordenador y/o evaluación basada en dicha comparación en la etapa (b).

60 En consecuencia, también se describe un sistema para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente en un sujeto, que comprende

(a) una unidad analizadora configurada para poner en contacto, *in vitro*, una porción de una muestra de un sujeto que padece neumonía con un ligando (o ligandos) que comprende afinidad de unión específica por al menos un marcador

65 seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, hsCRP (CRP de alta sensibilidad), IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7),

(b) una unidad analizadora configurada para detectar una señal de la porción de la muestra del sujeto en contacto con el ligando (o ligandos),

(c) un dispositivo informático que tiene un procesador y en comunicación operativa con dichas unidades de análisis, y

(d) un medio legible por máquina no transitorio que incluye una pluralidad de instrucciones ejecutables por el procesador, las instrucciones, cuando se ejecutan, calculan una cantidad (o cantidades) del al menos un marcador y comparan la cantidad (o cantidades) del al menos un marcador con una cantidad de referencia (o con cantidades de referencia), diagnosticando de este modo una fibrilación auricular paroxística reciente en el sujeto.

El término "diagnóstico" como se usa en el presente documento, preferentemente, quiere decir evaluar si un sujeto como se hace referencia en el presente documento ha padecido recientemente una fibrilación auricular paroxística o no. En particular, se evalúa si ha padecido recientemente un episodio de fibrilación auricular paroxística o no. Como se entenderá por los expertos en la técnica, dicha evaluación normalmente no pretende ser correcta para un 100 % de los sujetos que se van a diagnosticar. El término, sin embargo, requiere que la evaluación sea correcta para una parte estadísticamente significativa de los sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohorte). Se puede determinar sin más si una parte es estadísticamente significativa por el experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son de al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

En el contexto de la presente invención, se diagnosticará una fibrilación auricular paroxística reciente, es decir, se diagnosticará si el sujeto ha padecido recientemente fibrilación auricular paroxística o no.

El término "fibrilación auricular" es bien conocido en la técnica. La fibrilación auricular se revisa, por ejemplo, por Fuster *et al.* (Fuster V, Rydén LE, Asinger RW, *et al.* ACC/AHA/ESC Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation) Developed in Collaboration With the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*. 23 octubre 2001;104(17):2118-50). La fibrilación auricular es un ritmo cardíaco anómalo que implica las dos cavidades superiores del corazón. En un ritmo cardíaco normal, el impulso generado por el nódulo sinoauricular se propaga a través del corazón y provoca la contracción del miocardio y el bombeo de sangre. En la fibrilación auricular, los impulsos eléctricos regulares del nódulo sinoauricular se reemplazan por impulsos eléctricos rápidos desorganizados que dan como resultado latidos cardíacos irregulares.

La fibrilación auricular (FA) puede ser permanente, persistente o paroxística (con frecuencia también denominada "intermitente").

Un sujeto, preferentemente, padece FA permanente, si la FA ha persistido durante más de un año. En particular, no se produce la conversión de nuevo al ritmo sinusal (o solo si se trata).

Un sujeto, preferentemente, padece FA persistente, si la FA dura más de 7 días y puede requerir intervención farmacológica o bien eléctrica para terminar la fibrilación auricular. Por tanto, la FA persistente se produce en episodios, pero la arritmia no se convierte de nuevo en ritmo sinusal espontáneamente.

En el contexto de la presente invención, se diagnosticará una fibrilación auricular paroxística reciente, en particular un episodio de fibrilación auricular paroxística que se produjo recientemente (antes de que se haya obtenido la muestra). Fibrilación auricular paroxística, preferentemente, se refiere a un episodio intermitente de fibrilación auricular que dura de minutos a siete días. Preferentemente, el episodio dura menos de una hora. Más preferentemente, el episodio dura menos de un día. Aún más, preferentemente, el episodio dura menos tres días o cinco días. Preferentemente, el episodio de fibrilación auricular terminó espontáneamente. En consecuencia, la fibrilación auricular, preferentemente, terminó espontáneamente.

El término "espontáneo" en relación con la terminación de la fibrilación auricular se entiende bien por el experto en la técnica. El término "terminación espontánea" como se usa en el presente documento, preferentemente, quiere decir que la terminación auricular terminó sin intervención, en particular sin cardioversión.

Preferentemente, se considera que una fibrilación auricular paroxística se ha producido recientemente, si se produjo hasta doce semanas antes de llevar a cabo el procedimiento como se describe (o, para ser más precisos, si se produjo hasta doce semanas antes de que se haya obtenido la muestra que se va a someter a prueba). En consecuencia, se diagnostica si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística (o no), en particular un episodio de fibrilación auricular paroxística dentro de un periodo de doce semanas antes de que se haya obtenido la muestra.

Más preferentemente, se considera que una fibrilación auricular paroxística se ha producido recientemente, si se produjo hasta seis semanas antes de que se haya obtenido la muestra. En consecuencia, se diagnostica si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística (o no), en particular un episodio de fibrilación auricular paroxística dentro de un período de seis semanas antes de que se haya obtenido la muestra.

5 Incluso más preferentemente, se considera que una fibrilación auricular paroxística se ha producido recientemente, si se produjo hasta 15 o 30 días antes de que se haya obtenido la muestra. En consecuencia, se diagnostica si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística (o no), en particular un episodio de fibrilación auricular paroxística, dentro de un período de 15 o 30 días (en particular 30 días) antes de que se haya obtenido la muestra. En un modo de realización, la FA paroxística reciente se produjo dentro de 1 a 30 días antes de que se haya obtenido la muestra.

15 Incluso más preferentemente, se considera que una fibrilación auricular paroxística se ha producido recientemente, si se produjo hasta siete días antes de que se haya obtenido la muestra. En consecuencia, se diagnostica si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística (o no), en particular un episodio de fibrilación auricular paroxística, dentro de un período de una semana antes de que se haya obtenido la muestra. En particular, es preferente que la fibrilación auricular paroxística reciente se produzca dentro de 1 a 7 días antes de que se haya obtenido la muestra.

20 Además, se prevé que la fibrilación auricular paroxística reciente se produzca dentro de las 72 horas antes de que se haya obtenido la muestra.

Preferentemente, los períodos a los que se hace referencia en el presente documento se refieren a la terminación del último episodio de fibrilación auricular.

25 El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y más preferentemente, seres humanos. El sujeto puede ser hombre (en particular un hombre que sea mayor de 60 o 65 años). Además, el sujeto puede ser mujer (en particular, una mujer que sea mayor de 60 o 65 años). Además, se prevé que el sujeto no padezca fibrilación auricular, en particular no padece fibrilación auricular, es decir, no presenta un episodio de FA en el momento en que se ha obtenido la muestra que se va a someter a prueba. Si un sujeto padece fibrilación auricular en este momento o no, se puede determinar por un experto en la técnica sin más. Preferentemente, un sujeto que no padece fibrilación auricular muestra un ritmo sinusal normal del corazón (o viceversa: un sujeto que no padece fibrilación auricular no muestra un ritmo sinusal anormal). Por tanto, si el sujeto padece una fibrilación auricular paroxística reciente, la fibrilación auricular se habrá convertido de nuevo en ritmo sinusal (normal), en particular, en el momento en el que se ha obtenido la muestra. Preferentemente, la fibrilación auricular se habrá convertido de nuevo en ritmo sinusal (normal) al menos 30 minutos antes de que se haya obtenido la muestra. En consecuencia, el sujeto no habrá presentado un episodio de fibrilación auricular (FA) dentro de los 30 minutos antes de que se haya obtenido la muestra. Preferentemente, la fibrilación auricular se habrá convertido de nuevo en ritmo sinusal (normal) al menos 3 o 6 horas antes de que se haya obtenido la muestra. Más preferentemente, la fibrilación auricular se habrá convertido de nuevo en ritmo sinusal (normal) al menos 24 o 36 horas antes de que se haya obtenido la muestra. Incluso más preferentemente, la fibrilación auricular se habrá convertido de nuevo en ritmo sinusal (normal) al menos 72 horas antes de que se haya obtenido la muestra. También se prevé que la fibrilación auricular se haya convertido de nuevo en ritmo sinusal (normal) al menos 6 días antes de que se haya obtenido la muestra.

45 En consecuencia, el sujeto, preferentemente, no habrá presentado un episodio de fibrilación auricular (FA) dentro de los 30 minutos antes de que se haya obtenido la muestra. También preferentemente, el sujeto no habrá presentado un episodio de fibrilación auricular (FA) dentro de las 3 o 6 horas antes de que se haya obtenido la muestra. Más preferentemente, el sujeto no habrá presentado un episodio de fibrilación auricular (FA) dentro de las 24 o 36 horas antes de que se haya obtenido la muestra. Incluso más preferentemente, el sujeto no presentó un episodio de fibrilación auricular (FA) dentro de las 72 horas antes de que se haya obtenido la muestra. También se prevé que el sujeto no presente un episodio de fibrilación auricular (FA) dentro de los 6 días antes de que se haya obtenido la muestra. En consecuencia, se prevé que la FA paroxística reciente que se va a diagnosticar no se produzca dentro de los períodos mencionados anteriormente. Preferentemente, los períodos mencionados anteriormente se refieren a la terminación del (último) episodio de FA paroxística.

55 De acuerdo con la presente divulgación, por tanto, se prevé diagnosticar la FA paroxística, en particular un episodio de FA paroxística, que se produjo (en particular, que terminó) preferentemente, más de 30 minutos, más preferentemente, más de 3 o 6 horas, incluso más preferentemente, más de 24 o 36 horas, y, lo más preferentemente, más de 72 horas antes de que se haya obtenido la muestra, pero, preferentemente, menos de 7 días, más preferentemente, menos de 15 días y, lo más preferentemente, menos de 30 días antes de que se haya obtenido la muestra.

60 En un modo de realización preferente, se prevé diagnosticar la FA paroxística, en particular un episodio de FA paroxística, que se produjo (en particular, que terminó) más de 30 minutos o 3 horas, pero menos de 7 días antes de que se haya obtenido la muestra. En otro modo de realización, se prevé diagnosticar la FA paroxística, en particular un episodio de FA paroxística, que se produjo (en particular, que terminó) más de 6 horas pero menos de 7 días antes de que se haya obtenido la muestra. En otro modo de realización, se prevé diagnosticar la FA paroxística, en particular un episodio de FA paroxística, que se produjo (en particular, que terminó) más de 24 horas pero menos de 15 o 30

días antes de que se haya obtenido la muestra. Además, se prevé diagnosticar la FA paroxística, en particular un episodio de FA paroxística, que se produjo (en particular, que terminó) más de 72 horas pero menos de 30 días antes de que se haya obtenido la muestra.

- 5 Además, se prevé diagnosticar la FA paroxística, en particular un episodio de FA paroxística, que se produjo (en particular, que terminó) más de 6 horas pero menos de 72 horas antes de que se haya obtenido la muestra.

Preferentemente, los períodos mencionados anteriormente se refieren a la terminación del (último) episodio de FA paroxística.

10 El sujeto de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente de la presente divulgación será sospechoso de haber padecido una fibrilación auricular paroxística reciente. Un sujeto sospechoso de haber padecido una fibrilación auricular reciente, preferentemente, es un sujeto que tiene uno o más factores de riesgo de fibrilación auricular. Estos factores de riesgo son bien conocidos en la técnica e incluyen cardiopatía, incluyendo problemas valvulares y antecedentes de infarto de miocardio y cirugía cardíaca, hipertensión sistémica, en especial si no está bien controlada con cambios en el estilo de vida o medicamentos, y consumo de alcohol. Preferentemente, el sujeto sospechoso pertenece a un grupo de riesgo. En particular, se prevé que el sujeto sea un sujeto con trastornos cardíacos probados o sospechosos, incluyendo sujetos que tienen factores de riesgo que predisponen a trastornos cardíacos tales como hipertensión arterial o sistémica, diabetes *mellitus*, fumadores, individuos con hiperlipemia o signos del síndrome metabólico, en particular si el sujeto está en edad avanzada (más de 60, 65, 70 y preferentemente más de 75 u 80 años). De forma alternativa o adicional, el sujeto puede, preferentemente, padecer trastornos valvulares, preferentemente trastornos de la válvula mitral.

20 En un modo de realización preferente particular del procedimiento de la presente divulgación, el sujeto padece hipertensión y/o insuficiencia cardíaca.

25 En un modo de realización de la presente divulgación, el sujeto no es un hombre de 58 años.

30 La hipertensión puede ser cualquier forma de hipertensión conocida por el experto en la técnica. En un modo de realización preferente de la presente divulgación, el individuo padece hipertensión arterial, hipertensión sistólica y/o diastólica. En particular, el sujeto padecerá hipertensión arterial. Preferentemente, un sujeto padece hipertensión arterial, si la presión sistólica excede 140 mmHg y/o la presión diastólica excede 90 mmHg. Más preferentemente, un sujeto padece hipertensión arterial, si la presión sistólica excede 140 mmHg y/o la presión diastólica excede 90 mmHg durante tres meses o más, seis meses o más, doce meses o más, dos años o más, tres años o más, o cinco años o más.

35 El término "insuficiencia cardíaca" como se usa en el presente documento, preferentemente, se refiere a una función sistólica y/o diastólica deteriorada del corazón acompañada de signos sintomáticos de insuficiencia cardíaca como es conocido para el experto en la técnica. Preferentemente, la insuficiencia cardíaca a la que se hace referencia en el presente documento también es insuficiencia cardíaca crónica. La insuficiencia cardíaca de acuerdo con la presente divulgación incluye insuficiencia cardíaca sintomática y/o avanzada. En la insuficiencia cardíaca sintomática, el sujeto muestra síntomas de insuficiencia cardíaca como es conocido para el experto en la técnica. Se contempla en particular que el término "insuficiencia cardíaca" como se usa en el presente documento se refiere a las fases C y D de la clasificación ACC/AHA. En estas fases, el sujeto muestra síntomas típicos de insuficiencia cardíaca, es decir, el sujeto aparentemente no está sano. El sujeto que tiene insuficiencia cardíaca y que se clasifica en la fase C o D ha sufrido cambios funcionales y/o estructurales no reversibles permanentes en su miocardio y, como consecuencia de estos cambios, no es posible un restablecimiento de la salud completo.

40 La clasificación ACC/AHA es una clasificación para la insuficiencia cardíaca desarrollada por el American College of Cardiology y la American Heart Association (véase J. Am. Coll. Cardiol. 2001;38;2101-2113, actualizado 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 (insuficiencia cardíaca), pero se consideran para ayudar a identificar a los pacientes pronto antes de desarrollar "verdadera" IC. Los pacientes de las fases A y B se definen mejor como aquellos con factores de riesgo para el desarrollo de IC. Por ejemplo, los pacientes con arteriopatía coronaria, hipertensión o diabetes *mellitus* que aún no muestran una función ventricular izquierda (VI) deteriorada, hipertrofia o distorsión de cavidad geométrica se considerarían como fase A, mientras que los pacientes que son asintomáticos pero demuestran hipertrofia VI (HVI), un fenómeno en el que las paredes de los ventrículos se engrosan) y/o función VI deteriorada se designarían como fase B. La fase C entonces indica pacientes con síntomas actuales o pasados de IC asociados con cardiopatía estructural subyacente (la mayoría de los pacientes con IC), y la fase D designa a pacientes con verdadera IC resistente al tratamiento.

50 En un modo de realización preferente de la presente divulgación, el sujeto que se va a someter a prueba se clasifica como sujeto de fase A (de acuerdo con la clasificación ACC/AHA como se hace referencia anteriormente).

60 Preferentemente, la fibrilación auricular paroxística reciente que se va a diagnosticar no se produjo en relación con apoplejía. En particular, se prevé que el sujeto no tenga antecedentes de apoplejía.

Preferentemente, se considera que la fibrilación auricular paroxística se ha producido en relación con apoplejía si existe una relación temporal y/o causal entre la fibrilación auricular paroxística y la apoplejía. Preferentemente, se considera que la fibrilación auricular paroxística se ha producido en relación con apoplejía, si se produjo dentro de una semana antes y/o después de una apoplejía. Más preferentemente, se considera que la fibrilación auricular paroxística se ha producido en relación con apoplejía, si se produjo dentro de un mes antes y/o después de una apoplejía.

Preferentemente, un sujeto que no tiene antecedentes de apoplejía no padeció apoplejía dentro de los tres meses antes de que se haya obtenido la muestra que se va a someter a prueba. Más preferentemente, un sujeto que no tiene antecedentes de apoplejía no padeció en absoluto apoplejía antes de que se haya obtenido la muestra que se va a someter a prueba.

El término "apoplejía" es bien conocido en la técnica. Como se usa en el presente documento, el término, preferentemente, se refiere a la muerte súbita de células en un área específica del cerebro debido a la interrupción del flujo sanguíneo al cerebro. Apoplejía también se puede denominar accidente cerebral, infarto cerebral o accidente cerebrovascular. La interrupción del flujo sanguíneo al cerebro puede estar provocada por el bloqueo de una arteria o una rotura de arteria, evitando una circulación sanguínea normal. Una apoplejía puede estar precedida por accidentes isquémicos transitorios (AIT) o un accidente isquémico intermitente, que se caracterizan por una interrupción temporal en el flujo sanguíneo al cerebro. Un apoplejía puede dar lugar a pérdida de visión, afasia, pérdida de control muscular, desmayo, coma y muerte.

En particular, se prevé que la fibrilación auricular paroxística reciente no se produjo en relación con apoplejía isquémica. El término "apoplejía isquémica" (en el presente documento también denominado "apoplejía") es bien conocido por el experto en la técnica (véanse, por ejemplo, Adams *et al.*, Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke, A Guideline From the American Heart Association/ American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups in Stroke. 2007;38:1655; o Stroke Genetics, editado por Hugh S. Markus, capítulo 1 "An introduction to stroke, Oxford University Press, incorporado, fecha de publicación 06/03)

Como se usa en el presente documento, el término, preferentemente, se refiere a apoplejía isquémica cerebral. La apoplejía isquémica está provocada por una reducción en el flujo sanguíneo al cerebro o partes del mismo que da lugar a una reducción en el suministro (suministro insuficiente) de oxígeno a las células cerebrales. La apoplejía isquémica se puede caracterizar por anemia tisular provocada por obstrucción de la entrada de sangre arterial. Puede dar lugar a daño tisular irreversible debido a la muerte de células cerebrales.

Existen diversos sistemas de clasificación para la apoplejía isquémica. La clasificación del Oxford Community Stroke Project (OCSP, también conocida como clasificación de Bamford u Oxford) se basa principalmente en los síntomas iniciales; en base a la extensión de los síntomas, el episodio de apoplejía se clasifica como infarto de circulación anterior total (TACI), infarto de circulación anterior parcial (PACI), infarto lagunar (LACI) o infarto de circulación posterior (POCI). Estas cuatro entidades predicen la extensión de la apoplejía, el área del cerebro afectada, la causa subyacente y el pronóstico.

Si un sujeto padece apoplejía, en particular apoplejía isquémica, se puede determinar por procedimientos bien conocidos. Además, los síntomas de apoplejía son bien conocidos en la técnica y, por ejemplo, se describen en Adams *et al.* (*loc. cit.*). Por ejemplo, los síntomas de apoplejía incluyen entumecimiento o debilidad súbita de la cara, brazo o pierna, en especial en un lado del cuerpo, confusión repentina, dificultad para hablar o comprender, problema súbito para ver en uno o ambos ojos, y problema súbito para caminar, mareo, pérdida de equilibrio o coordinación.

Además, se prevé que el sujeto en el contexto de la presente invención no tenga disfunción renal. Preferentemente, el sujeto no padecerá insuficiencia renal, en particular el sujeto no padecerá insuficiencia renal aguda, crónica y/o terminal. Además, el sujeto, preferentemente, no padecerá hipertensión renal. La forma de evaluar si un sujeto presenta disfunción renal es bien conocida en la técnica. Se pueden diagnosticar trastornos renales por cualquier medio conocido y considerado apropiado. En particular, se puede evaluar la función renal por medio de 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 hacia la cápsula de Bowman por unidad de tiempo. Clínicamente, esto se usa a menudo para determinar la función renal. La TFG se estimó originalmente (la TFG nunca se puede determinar, todos los cálculos derivaron de fórmulas tales como la fórmula Cockcroft Gault o la fórmula MDRD aportan solo estimaciones y no la TFG "real") inyectando inulina en el plasma. Puesto que la inulina no se reabsorbe por el riñón después de la filtración glomerular, su tasa de excreción es directamente proporcional a la tasa de filtración de agua y solutos a través del filtro glomerular. En la práctica clínica, sin embargo, se usa el aclaramiento de creatinina para medir la TFG. La creatinina es una molécula endógena, sintetizada en el cuerpo, que se filtra libremente por el glomérulo (pero también se secreta por los túbulos renales en cantidades muy pequeñas). El aclaramiento de creatinina (CrCl) es, por lo tanto, una aproximación cercana de la TFG. La TFG se registra típicamente en mililitros por minuto (ml/min). El intervalo normal de TFG para hombres es de 97 a 137 ml/min, el intervalo normal de TFG para mujeres es de 88 a 128 ml/min. Por tanto, se contempla en particular que la TFG de un sujeto que no presenta disfunción renal está dentro de este

intervalo. Además, dicho sujeto tiene preferentemente un nivel de creatinina en sangre (en particular un nivel de creatinina en suero) menor que 0,9 mg/dl, más preferentemente menor que 1,1 mg/dl y lo más preferentemente menor que 1,3 mg/dl.

5 Además, se prevé además que el sujeto no padezca SCA (síndrome coronario agudo). El término "SCA" como se usa en el presente documento incluye STEMI (infarto de miocardio con elevación del segmento ST); IAMSEST (infarto de miocardio sin elevación del segmento ST) y angina de pecho inestable. Se prevé además que el sujeto que se va a someter a prueba no tiene antecedentes de SCA. En particular, el sujeto no habrá padecido SCA dentro de un mes antes de llevar a cabo el procedimiento de la presente divulgación (para ser más precisos, dentro de un mes antes de obtener la muestra).

15 También se contempla que el sujeto no padezca arteriopatía coronaria. El término "arteriopatía coronaria", abreviado APC, con frecuencia también llamado cardiopatía coronaria (CPC) o cardiopatía aterosclerótica, es conocido para el experto en la técnica. Preferentemente, el término se refiere a una afección en la que los vasos sanguíneos que suministran sangre y oxígeno al corazón se estrechan. La arteriopatía coronaria está provocada normalmente por una afección llamada aterosclerosis, que se produce cuando se acumula materia grasa y una sustancia llamada placa en las paredes de las arterias. Esto hace que se estrechen. En particular, la APC es el resultado de la acumulación de placas ateromatosas dentro de las paredes de las arterias que suministran al miocardio (el músculo del corazón). Preferentemente, un sujeto que padece APC tiene al menos un 50 % de estenosis (y por tanto al menos un 50 % de oclusión), en al menos una arteria coronaria principal. Por tanto, un sujeto que no padece APC, preferentemente, tiene menos de un 50 % de estenosis en las arterias coronarias principales. La forma de evaluar el grado de oclusión de una arteria coronaria es bien conocida en la técnica, preferentemente, el grado se evalúa por coronariografía. Aunque los síntomas y signos de la arteriopatía coronaria se observan en el estado avanzado de la enfermedad, la mayoría de los individuos con arteriopatía coronaria no muestran evidencia de enfermedad durante décadas a medida que la enfermedad avanza antes de la primera aparición de los síntomas de un acontecimiento agudo, a menudo un infarto de miocardio "repentino", finalmente surgen.

Además, el sujeto no debe ser gestante. Además, el sujeto no es, preferentemente, un atleta.

30 El término "muestra" se refiere a una muestra de un líquido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o un órgano. Se pueden obtener muestras de líquidos corporales por técnicas bien conocidas e incluyen, preferentemente, muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferentemente, muestras de sangre, plasma o suero. Se pueden obtener muestras de tejidos u órganos a partir de cualquier tejido u órgano, por ejemplo, por biopsia. Se pueden obtener células separadas de los líquidos corporales o los tejidos u órganos por técnicas de separación tales como centrifugación o separación celular. Preferentemente, se obtienen muestras de células, tejidos u órganos a partir de las células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos a los que se hace referencia en el presente documento. En caso de que el sujeto haya padecido fibrilación auricular paroxística recientemente, la muestra, preferentemente, se ha obtenido al menos 30 minutos y, más preferentemente, al menos tres horas, o lo más preferentemente, al menos 6 horas después de la terminación de la fibrilación auricular paroxística reciente, es decir, después de la terminación del episodio, en particular, el último episodio de fibrilación auricular paroxística.

45 El término "troponina cardíaca" se refiere a todas las isoformas de troponina expresadas en las células del corazón y, preferentemente, las células subendocárdicas. Estas isoformas están bien caracterizadas en la técnica como se describe, por ejemplo, en Anderson 1995, *Circulation Research*, vol. 76, n.º 4: 681-686 y Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493. Preferentemente, troponina cardíaca se refiere a troponina T y/o a troponina I y, lo más preferentemente, a troponina T. Se debe entender que las isoformas de troponinas se pueden determinar en el procedimiento de la presente invención conjuntamente, es decir, simultánea o secuencialmente, o de forma individual, es decir, sin determinar la otra isoforma en absoluto. Las secuencias de aminoácidos para la troponina T humana y troponina I humana se divulgan en Anderson, *loc cit* y Ferrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493.

50 La expresión "troponina cardíaca" engloba también variantes de las troponinas específicas mencionadas anteriormente, es decir, preferentemente, troponina I y más preferentemente, troponina T. Dichas variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que las troponinas cardíacas específicas. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si son detectables por los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, por ensayos ELISA usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente las dichas troponinas cardíacas. Además, se debe entender que una variante como se hace referencia de acuerdo con la presente invención, tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, delección y/o adición aminoacídica, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante todavía es, preferentemente, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 % idéntica a la secuencia amino de la troponina específica (en particular a lo largo de la longitud completa). Preferentemente, el grado de identidad se va a determinar comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, donde el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (por ejemplo, huecos o

salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo aminoacídico idéntico en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Se puede llevar a cabo la alineación óptima de secuencias para su comparación, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por la búsqueda para el procedimiento de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988), por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para su comparación, se emplean preferentemente GAP y BESTFIT para determinar su alineación óptima y, por tanto, el grado de identidad. Preferentemente, se usan los valores por defecto de 5,00 para peso de hueco y 0,30 para la longitud de peso de hueco. Las variantes pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento incluyen fragmentos de las troponinas cardíacas específicas o los tipos de variantes mencionados anteriormente siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales como se hace referencia anteriormente.

Preferentemente, las variantes de troponina cardíaca tienen propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítomos) comparables a las de la troponina T o troponina I humana. Por tanto, las variantes serán reconocibles por los medios o ligandos mencionados anteriormente usados para la determinación de la concentración de las troponinas cardíacas. Por tanto, las variantes serán reconocibles por los medios o ligandos mencionados anteriormente usados para la determinación de la concentración de las troponinas cardíacas. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de las troponinas. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación o miristilación. Preferentemente, la propiedad biológica de la troponina I y su variante es la capacidad para inhibir la ATPasa de actomiosina o para inhibir la angiogénesis *in vivo* e *in vitro*, que se puede detectar, por ejemplo, en base al ensayo descrito por Moses *et al.* 1999 PNAS USA 96 (6): 2645-2650). Preferentemente, la propiedad biológica de la troponina T y su variante es la capacidad para formar un complejo con troponina C e I, para unirse a iones de calcio o para unirse a tropomiosina, preferentemente si está presente como complejo de troponina C, I y T o un complejo formado por troponina C, troponina I y una variante de troponina T. Es conocido que se pueden detectar concentraciones bajas de troponina cardíaca circulante en sujetos en diversas afecciones, pero se requieren estudios adicionales para comprender su respectivo papel y tasa (Masson *et al.*, Curr Heart Fail Rep (2010)7:15-21).

Preferentemente, la troponina cardíaca es troponina T, en particular troponina T humana. Preferentemente, la cantidad de troponina T se determina usando un ensayo de troponina altamente sensible como se describe en los ejemplos, o en el documento WO2012/025355.

Como se usa en el presente documento, el término "péptidos de tipo BNP" comprende pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP y BNP. En particular, el péptido de tipo BNP es NT-proBNP o BNP.

El pre-pro-péptido (134 aminoácidos en el caso de pre-proBNP) comprende un péptido señal corto, que se escinde enzimáticamente para liberar el pro-péptido (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El pro-péptido se escinde además en un pro-péptido N terminal (NT-pro-péptido, 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de BNP). Preferentemente, los péptidos de tipo BNP de acuerdo con la presente invención son NT-proBNP, BNP y variantes de los mismos. BNP es la hormona activa y tiene una semivida más corta que la respectiva homóloga inactiva NT-proBNP. BNP se metaboliza en la sangre, mientras que NT-proBNP circula en la sangre como molécula intacta y como tal se elimina por vía renal. La semivida *in vivo* de NT-proBNP es 120 minutos más larga que la de BNP, que es de 20 minutos (Smith 2000, J Endocrinol. 167: 239-46.). Los preanalíticos son más resistentes con NT-proBNP, lo que permite un fácil transporte de la muestra a un laboratorio central (Mueller 2004, Clin Chem Lab Med 42: 942-4.). Se pueden almacenar muestras de sangre a temperatura ambiente durante varios días o se pueden enviar o despachar sin pérdida con recuperación. Por el contrario, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4° Celsius da lugar a una pérdida en la concentración de al menos un 20 % (Mueller *loc.cit.*; Wu 2004, Clin Chem 50: 867-73.). Por lo tanto, dependiendo de la evolución temporal o propiedades de interés, cualquier medición de las formas activas o inactivas del péptido natriurético puede ser ventajosa. Los péptidos natriuréticos más preferentes de acuerdo con la presente invención son NT-proBNP o variantes de los mismos. Como se analiza en resumen anteriormente, el NT-proBNP humano, como se hace referencia de acuerdo con la presente invención, es un polipéptido que comprende, preferentemente, 76 aminoácidos de longitud correspondiente a la porción N terminal de la molécula de NT-proBNP humano. La estructura del BNP y NT-proBNP humanos ya se ha descrito en detalle en la técnica anterior, por ejemplo, documentos WO 02/089657, WO 02/083913 o Bonow *loc. cit.* Preferentemente, NT-proBNP humano como se usa en el presente documento es NT-proBNP humano como se divulga en el documento EP 0 648 228 B1.

El NT-proBNP al que se hace referencia de acuerdo con la presente invención engloba además variantes alélicas y otras de dicha secuencia específica para el NT-proBNP humano analizado anteriormente. Específicamente, se contemplan polipéptidos variantes que están al nivel aminoacídico preferentemente, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la secuencia de referencia.

80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o un 99 % idéntico al NT-proBNP humano, preferentemente a lo largo de la longitud completa del NT-proBNP humano. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por algoritmos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el grado de identidad se va a determinar comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, donde el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (por ejemplo, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo aminoacídico idéntico en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Se puede llevar a cabo la alineación óptima de secuencias para su comparación, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por la búsqueda para el procedimiento de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988), por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para su comparación, se emplean preferentemente GAP y BESTFIT para determinar su alineación óptima y, por tanto, el grado de identidad. Preferentemente, se usan los valores por defecto de 5,00 para peso de hueco y 0,30 para la longitud de peso de hueco. Las variantes a las que se hace referencia anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de especie. Sustancialmente similares y también previstos son los productos de degradación proteolítica que todavía se reconocen por los medios de diagnóstico o por ligandos dirigidos contra el respectivo péptido de longitud completa. También se incluyen polipéptidos variantes que tienen deleciones, sustituciones y/o adiciones aminoacídicas en comparación con la secuencia de aminoácidos de NT-proBNP humano siempre que dichos polipéptidos tengan propiedades de NT-proBNP. Las propiedades de NT-proBNP como se hace referencia en el presente documento son propiedades inmunológicas y/o biológicas. Preferentemente, las variantes de NT-proBNP tienen propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítomos) comparables a las de NT-proBNP humano. Por tanto, las variantes serán reconocibles por los medios o ligandos mencionados anteriormente usados para la determinación de la cantidad de los péptidos natriuréticos. Las propiedades de NT-proBNP biológicas y/o inmunológicas se pueden detectar por el ensayo descrito en Karl *et al.* (Karl 1999, Scand J Clin Lab Invest 230:177-181), Yeo *et al.* (Yeo 2003, Clinica Chimica Acta 338:107-115). Las variantes también incluyen péptidos modificados postraduccionalmente tales como péptidos glucosilados. Además, una variante de acuerdo con la presente invención también es un péptido o polipéptido que se ha modificado después de la recogida de la muestra, por ejemplo por unión covalente o no covalente de un marcador, en particular un marcador radioactivo o fluorescente, al péptido.

La CRP, también denominada en el presente documento proteína C-reactiva, es una proteína de la fase aguda que se descubrió hace más de 75 años como una proteína sanguínea que se une al polisacárido C de los neumococos. La CRP es conocida como un marcador inflamatorio reactivo y se produce por un órgano distal (es decir, el hígado) en respuesta o reacción a las quimiocinas o interleucinas que se originan en el sitio de lesión elemental. La CRP consiste en cinco subunidades individuales, que se unen de forma no covalente y se ensamblan como un pentámero cíclico con un peso molecular de aproximadamente 110-140 kDa. Preferentemente, la CRP como se usa en el presente documento se refiere a CRP humana. La secuencia de CRP humana es bien conocida y se divulga, por ejemplo, por Woo *et al.* (J. Biol. Chem. 1985. 260 (24), 13384-13388). El nivel de CRP es normalmente bajo en individuos normales, pero se puede elevar de 100 a 200 veces o más debido a inflamación, infección o lesión (Yeh (2004) Circulation. 2004; 109:II-11-II-14). Es conocido que la CRP es un factor independiente para la predicción de un riesgo cardiovascular. En particular, se ha demostrado que la CRP es adecuada como factor pronóstico para infarto de miocardio, apoplejía, arteriopatía periférica y muerte súbita de causa cardíaca. Además, las cantidades de CRP elevadas también pueden predecir isquemia recurrente y muerte en sujetos con síndrome coronario agudo (SCA) y los sometidos a intervención coronaria. La determinación de la CRP se recomienda por grupos de expertos (por ejemplo, por la American Heart Association) en pacientes con riesgo de cardiopatía coronaria (véase también Pearson *et al.* (2003) Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. Circulation, 107: 499-511). El término CRP también se refiere a variantes de la misma.

Preferentemente, la cantidad de CRP en una muestra de un sujeto se determina usando ensayos de CRP con una alta sensibilidad. La CRP determinada por dichos ensayos con frecuencia también se denomina CRP de alta sensibilidad (hsCRP). Se usan ensayos de hsCRP, por ejemplo, para predecir el riesgo de cardiopatía. Los ensayos de hsCRP adecuados son conocidos en la técnica. Un ensayo de hsCRP en particular preferente en el contexto de la presente divulgación es la prueba de HS Roche/Hitachi CRP (Latex) con un límite de detección de 0,1 mg/l.

La interleucina-6 (abreviada como IL-6) es una interleucina secretada por linfocitos T y macrófagos para estimular la respuesta inmunitaria, por ejemplo, durante la infección y después de traumatismo, en especial quemaduras u otro daño tisular que da lugar a inflamación. Actúa como una citocina tanto proinflamatoria como antiinflamatoria. En humanos, se codifica por el gen IL6. La secuencia de IL-6 humana se puede evaluar por medio de GenBank (véase NM_000600.3 para la secuencia polinucleotídica y NP_000591.1 para la secuencia de aminoácidos). La IL-6 envía señales a través de un complejo de receptor de citocina de tipo I de la superficie celular que consiste en la cadena de IL-6R α de unión a ligando (CD126) y el componente transductor de señal gp130 (también llamado CD130). CD130 es el transductor de señal común para varias citocinas, incluyendo factor inhibidor de leucemia (LIF), factor neurotrópico

ciliar, oncostatina M, IL-11 y cardiotrofina-1, y se expresa de forma casi ubicua en la mayoría de los tejidos. Por el contrario, la expresión de CD126 se restringe a determinados tejidos. A medida que IL-6 interactúa con su receptor, desencadena las proteínas gp130 e IL-6R para formar un complejo, activando así el receptor. Estos complejos unen las regiones intracelulares de gp130 para iniciar una cascada de transducción de señales a través de determinados factores de transcripción, cinasas Jano (JAK) y transductores de señales y activadores de transcripción.

El marcador IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) es bien conocido en la técnica. El sistema de proteína de unión al factor insulínico de crecimiento (IGFBP) desempeña un papel importante en el crecimiento y diferenciación celular. Comprende dos ligandos, IGF-I e IGF-II, dos receptores, receptores de IGF tipo 1 y tipo 2, y desde 1995 seis proteínas de unión a IGF (IGFBP), IGFBP-1 a -6 (Jones, J.I., *et al.*, *Endocr. Rev.* 16 (1995) 3-34). Recientemente, la familia IGFBP se ha expandido para incluir las proteínas relacionadas con IGFBP (IGFBP-rP), que tienen similitudes estructurales significativas con las IGFBP (Hwa, V., *et al.*, *Endocr. Rev.* 20 (1999) 761-787). Por tanto, la superfamilia de IGFBP incluye las seis IGFBP convencionales, que tienen alta afinidad por IGF, y al menos 10 IGFBP-rP, que no solo comparten el dominio aminoterminal conservado de las IGFBP sino que también muestran cierto grado de afinidad por IGF e insulina. Las IGFBP-rP son un grupo de proteínas ricas en cisteína que controlan diversas funciones celulares, tales como crecimiento celular, adherencia y migración celular, y síntesis de la matriz extracelular. Además, estas proteínas podrían estar implicadas en procesos biológicos como proliferación y diferenciación tisular, reproducción, angiogénesis, reparación de heridas, inflamación, fibrosis y tumorigénesis (Hwa, V., *et al.*, *Endocr. Rev.* 20 (1999)761-787).

La proteína de unión a IGF 7 (= IGFBP7) es una glucoproteína modular de 30 kDa que se sabe que se secreta por células endoteliales, células musculares lisas vasculares, fibroblastos y células epiteliales (Ono, Y., *et al.*, *Biochem Biophys Res Comm* 202 (1994) 1490-1496). En la literatura, esta molécula también se ha denominado FSTL2; IBP 7; proteína relacionada con la proteína de unión a IGF I; IGFBP 7; IGFBP 7v; IGFBP rPI; IGFBP7; IGFBPRP1; proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7; precursor de la proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7; MAC25; proteína MAC25; factor estimulante de PGI2; y PSF o factor estimulante de prostaciclina. Los estudios de transferencia Northern revelaron una amplia expresión de este gen en tejidos humanos, incluyendo corazón, cerebro, placenta, hígado, músculo esquelético y páncreas (Oh, Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 30322-30325).

IGFBP7 se identificó inicialmente como un gen expresado diferencialmente en células epiteliales mamarias y leptomeníngicas normales, en comparación con sus células tumorales homólogas, y se denominó ADNc asociado a meningioma (MAC25) (Burger, A.M., *et al.*, *Oncogene* 16 (1998) 2459-2467). La proteína expresada se purificó independientemente como un factor de adherencia derivado del tumor (posteriormente renombrado como angiomodulina) (Sprenger, C.C., *et al.*, *Cancer Res* 59 (1999) 2370-2375) y como un factor estimulante de prostaciclina (Akaogi, K., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 8384-8389). Se ha informado adicionalmente de T1A12, un gen regulado por disminución en carcinomas de mama (StCroix, B., *et al.*, *Science* 289 (2000) 1197-1202).

Preferentemente, el término "IGFBP7" se refiere a IGFBP7 humana. La secuencia de la proteína es bien conocida en la técnica y es accesible, por ejemplo, por medio de GenBank (NP_001240764.1). IGFBP7 como se usa en el presente documento, preferentemente, engloba también variantes de los polipéptidos de IGFBP7 específicos.

Los marcadores preferentes que se van a determinar en relación con el procedimiento mencionado anteriormente son troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP (prohormona N terminal del péptido natriurético cerebral) y hsCRP o IL-6 (interleucina-6).

Determinar la cantidad de un péptido o polipéptido como se hace referencia en el contexto del procedimiento de la presente invención se refiere a medir la cantidad o concentración, preferentemente, de forma semicuantitativa o cuantitativa. La medición se puede realizar de forma directa o indirecta. La medición directa se refiere a la medición de la cantidad o concentración del péptido o polipéptido en base a una señal que se obtiene a partir del propio péptido o polipéptido y con una intensidad que se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presentes en la muestra. Una señal de este tipo (en ocasiones denominada en el presente documento señal de intensidad) se puede obtener, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta incluye la medición de una señal obtenida a partir de un componente secundario (es decir, un componente que no es el propio péptido o polipéptido) o un sistema de lectura biológica, por ejemplo, respuestas celulares, ligandos, marcadores o productos de reacción enzimáticos mensurables.

De acuerdo con la presente invención, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido se puede lograr por todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden inmunoensayo y procedimientos que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo de tipo sándwich, competencia u otros. Dichos ensayos se basan preferentemente en agentes de detección tales como anticuerpos que reconocen específicamente el péptido o polipéptido que se va a determinar. Los agentes de detección podrán, directa o indirectamente, generar una señal que indique la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la intensidad de señal se puede correlacionar, preferentemente, de forma directa o indirecta (por ejemplo, inversamente proporcional) con la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Otros procedimientos adecuados comprenden medir una propiedad física o química específica para el péptido o polipéptido tal como su masa molecular precisa o espectro de RMN. Dichos procedimientos comprenden, preferentemente, biosensores, dispositivos ópticos

acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos de cromatografía. Además, los procedimientos incluyen procedimientos basados en ELISA con microplacas, inmunoensayos completamente automatizados o robóticos (disponibles, por ejemplo, en Elecsys™ analyzers), CBA (un ensayo de unión a cobalto enzimático, disponibles, por ejemplo, en Roche-Hitachi™ analyzers), y ensayos de aglutinación de látex (disponibles, por ejemplo, en Roche-Hitachi™ analyzers).

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

También preferentemente, determinar la cantidad de un péptido o polipéptido comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica obtenible a partir del péptido o polipéptido en la muestra. Como se describe anteriormente, una señal de este tipo puede ser la intensidad de señal observada a una variable m/z específica para el péptido o polipéptido, observada en espectros de masas o un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

Determinar la cantidad de un péptido o polipéptido puede comprender, preferentemente, las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) retirar el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido, es decir, el complejo del ligando formado en la etapa (a). De acuerdo con un modo de realización preferente, dichas etapas de poner en contacto, retirar y medir se pueden realizar por una unidad analizadora del sistema divulgado en el presente documento. De acuerdo con algunos modos de realización, dichas etapas se pueden realizar por una única unidad analizadora de dicho sistema o por más de una unidad analizadora en comunicación operativa entre sí. Por ejemplo, de acuerdo con un modo de realización específico, dicho sistema divulgado en el presente documento puede incluir una primera unidad analizadora para realizar dichas etapas de poner en contacto y retirar y una segunda unidad analizadora, conectada operativamente a dicha primera unidad analizadora por una unidad de transporte (por ejemplo, un brazo robot), que realiza dicha etapa de medir.

El ligando unido, es decir, el ligando o el complejo ligando/péptido, generará una señal de intensidad. Unión de acuerdo con la presente invención incluye unión tanto covalente como no covalente. Un ligando de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier compuesto, por ejemplo, un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña, que se une al péptido o polipéptido descrito en el presente documento. Los ligandos preferentes incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos tales como receptores o compañeros de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos que comprenden los dominios de unión para los péptidos, y aptámeros, por ejemplo, aptámeros de ácidos nucleicos o péptidos. Los procedimientos para preparar dichos ligandos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también se ofrece por proveedores comerciales. El experto en la técnica está familiarizado con procedimientos para desarrollar derivados de dichos ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos.

Estos derivados se pueden someter a prueba a continuación para determinar la unión de acuerdo con procedimientos de cribado conocidos en la técnica, por ejemplo, presentación en fagos. Los anticuerpos como se hace referencia en el presente documento incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que se pueden unir a antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos monocatenarios y anticuerpos híbridos humanizados en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que presentan una especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donantes incluirán normalmente al menos los residuos aminoácidos de unión a antígeno del donante, pero pueden comprender además otros residuos aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos se pueden preparar por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido. Unión específica de acuerdo con la presente invención quiere decir que el ligando o agente no se debe unir sustancialmente a ("reaccionar de forma cruzada" con) otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra que se va a analizar. Preferentemente, el péptido o polipéptido unido específicamente se debe unir con una afinidad al menos 3 veces mayor, más preferentemente al menos 10 veces mayor e incluso más preferentemente al menos 50 veces mayor que cualquier otro péptido o polipéptido pertinente. La unión inespecífica puede ser tolerable, si todavía se puede distinguir y medir inequívocamente, por ejemplo, de acuerdo con su tamaño en una inmunotransferencia, o por su abundancia relativamente mayor en la muestra. La unión del ligando se puede medir por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Preferentemente, dicho procedimiento es semicuantitativo o cuantitativo. Otras técnicas adecuadas para la determinación de un polipéptido o péptido se describen a continuación.

La unión de un ligando se puede medir directamente, por ejemplo, por RMN o resonancia de plasmón superficial. La medición de la unión de un ligando, de acuerdo con modos de realización preferentes, se realiza por una unidad analizadora de un sistema divulgado en el presente documento. Después de esto, se puede calcular una cantidad de

la unión medida por un dispositivo informático de un sistema divulgado en el presente documento. Si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, se puede medir un producto de reacción enzimático (por ejemplo, se puede medir la cantidad de una proteasa midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo, en una inmunoelectrotransferencia). De forma alternativa, el ligando puede presentar propiedades enzimáticas por sí mismo y el complejo "ligando/péptido o polipéptido" o el ligando que se unió por el péptido o polipéptido, respectivamente, se puede poner en contacto con un sustrato adecuado permitiendo la detección por la generación de una señal de intensidad. Para la medición de productos de reacción enzimáticos, preferentemente la cantidad de sustrato es saturante. El sustrato también se puede marcar con un marcador detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para que se produzca una cantidad detectable, preferentemente mensurable, de producto. En lugar de medir la cantidad de producto, se puede medir el tiempo necesario para la aparición de una cantidad dada (por ejemplo, detectable) de producto. En tercer lugar, el ligando se puede acoplar de forma covalente o no covalente a un marcador permitiendo la detección y medición del ligando. El marcaje se puede realizar por procedimientos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcador directamente (de forma covalente o no covalente) al ligando. El marcaje indirecto implica la unión (de forma covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario se debe unir específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario se puede acoplar a un marcador adecuado y/o ser la diana (receptor) del ligando terciario que se une al ligando secundario. El uso de ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior se usa a menudo para incrementar la señal. Los ligandos secundarios y de orden superior adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios y el sistema de estreptavidina-biotina bien conocido (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también se puede "marcar" con una o más marcas como es conocido en la técnica. Dichas marcas pueden ser entonces dianas para ligandos de orden superior. Las marcas adecuadas incluyen biotina, digoxigenina, marca His, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, marca myc, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A, proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la marca está preferentemente en el extremo N terminal y/o extremo C-terminal. Las marcas adecuadas son cualquier marca detectable por un procedimiento de detección apropiado. Los marcadores típicos incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridano, luminol, rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radiactivos, marcadores magnéticos ("por ejemplo, perlas magnéticas", incluyendo marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de los mismos. Los sustratos adecuados para detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponible como solución madre preparada de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Bio-sciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación enzima-sustrato adecuada puede dar como resultado un producto de reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que se puede medir de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). En cuanto a medir la reacción enzimática, los criterios dados anteriormente se aplican de forma análoga. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Texas Red, fluoresceína y los tintes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Otros marcadores fluorescentes están disponibles, por ejemplo, en Molecular Probes (Oregón). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Los marcadores radioactivos típicos incluyen ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P y similares. Un marcador radiactivo se puede detectar por cualquier procedimiento conocido y apropiado, por ejemplo, una película sensible a la luz o un aparato de diagnóstico con fósforo. Los procedimientos de medición adecuados de acuerdo con la presente invención también incluyen precipitación (en particular inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), RIA (radioinmunoanálisis), ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática), inmunoensayos enzimáticos de tipo *sandwich*, inmunoanálisis de tipo *sandwich* de electroquimioluminiscencia (ECLIA), fluoroinmunoanálisis de lantánidos potenciado por disociación (DELFI), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría potenciada con látex, o inmunoensayos en fase sólida. Otros procedimientos conocidos en la técnica (tales como electroforesis en gel, electroforesis en gel 2D, electroforesis en gel de poli(acrilamida) SDS (SDS-PAGE), inmunoelectrotransferencia y espectrometría de masas) se pueden usar solos o en combinación con marcaje u otros procedimientos de detección como se describe anteriormente.

La cantidad de un péptido o polipéptido se puede determinar, también preferentemente, como sigue: (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el péptido o polipéptido como se especifica anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) medir la cantidad de péptido o polipéptido que se une al soporte. El ligando, preferentemente elegido del grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está preferentemente presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para fabricar soportes sólidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, materiales de columna disponibles comercialmente, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, superficies y chips de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, Duracryte, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede estar unido a muchos vehículos diferentes. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas), agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o bien insoluble para los propósitos de la invención. Los procedimientos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos e incluyen, pero no se limitan a, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. También se contempla el uso de "matrices de suspensión" como matrices de acuerdo con la presente invención (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12). En dichas matrices de suspensión,

el vehículo, por ejemplo, una microperla o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consiste en diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que portan diferentes ligandos. En general son conocidos procedimientos de producción de dichas matrices, por ejemplo, en base a la química en fase sólida y grupos protectores fotolábiles (documento US 5.744.305).

5 El término "cantidad" como se usa en el presente documento engloba la cantidad absoluta de un polipéptido o péptido, la cantidad o concentración relativa del dicho polipéptido o péptido así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona con el mismo o se pueda derivar del mismo. Dichos valores o parámetros comprenden valores de señal de intensidad de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas a partir de dichos péptidos por mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en espectros de masas o espectros de RMN. Además, se engloban todos los valores o parámetros que se obtienen por mediciones indirectas especificadas en otra parte en esta descripción, por ejemplo, cantidades de respuesta determinadas a partir de sistemas de lectura biológica en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidas a partir de ligandos unidos de forma específica. Se debe entender que los valores que se correlacionan con las cantidades o parámetros mencionados anteriormente también se pueden obtener por todas las operaciones matemáticas estándar. De acuerdo con modos de realización preferentes de la invención objeto, la determinación de una "cantidad" se realiza por el sistema divulgado, con lo que un dispositivo informático determina la "cantidad" en base a las etapas de contacto y medición realizadas por una o más unidades analizadoras de dicho sistema.

20 El término "comparar" como se usa en el presente documento engloba comparar la cantidad de un marcador como se hace referencia en el presente documento, en particular de péptido o polipéptido comprendido por la muestra que se va a analizar con la cantidad de una fuente de referencia adecuada en otra parte en esta descripción. Se debe entender que comparar como se usa en el presente documento se refiere a una comparación de parámetros o valores correspondientes, por ejemplo, una cantidad absoluta se compara con una cantidad de referencia absoluta mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia o una señal de intensidad obtenida a partir de una muestra de prueba se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación a la que se hace referencia en la etapa (b) del procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo manualmente o por un dispositivo informático (por ejemplo, de un sistema divulgado en el presente documento). Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada se puede comparar con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos por un programa informático. El programa informático puede evaluar además el resultado de la comparación, es decir, proporciona automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. El dicho resultado puede servir, preferentemente, como ayuda para evaluar si el sujeto se debe someter a una evaluación de diagnóstico basada en imágenes como se expone en otra parte en el presente documento, o no. Por ejemplo, un resultado de una comparación se puede dar como datos brutos (cantidades absolutas o relativas) y, en algunos casos, como indicador en forma de una palabra, frase, símbolo o valor numérico que puede ser indicativo de un diagnóstico particular. Por lo tanto, la cantidad de referencia se debe elegir de modo que una diferencia o una similitud en las cantidades comparadas permita llevar a cabo el diagnóstico de la presente invención.

40 El término "cantidad de referencia" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad que permite la asignación de un sujeto al grupo de sujetos que padecieron fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente, o bien a un grupo de sujetos que no padecieron fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente. Una cantidad de referencia de este tipo puede ser una cantidad umbral que separa estos grupos entre sí. En consecuencia, la cantidad de referencia para un biomarcador como se hace referencia en el presente documento será una cantidad que permite la asignación de un sujeto a un grupo de sujetos que padecieron fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente, o a un grupo de sujetos que no padecieron fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente. Una cantidad umbral adecuada que separa los dos grupos se puede calcular sin más por las pruebas estadísticas a las que se hace referencia en el presente documento en otra parte en base a cantidades del marcador como se hace referencia en el presente documento de un sujeto o grupo de sujetos que padecieron fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente, o bien un sujeto o grupo de sujetos que no padecieron fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente. Las cantidades referenciadas preferentes que se pueden derivar de los sujetos o grupo de sujetos mencionados anteriormente se indican en otra parte en el presente documento.

55 La cantidad de referencia se puede usar para definir y establecer una cantidad umbral. La cantidad umbral, preferentemente, permite admitir y/o descartar qué sujetos padecieron fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente. Dicha admisión y/o descarte se puede proporcionar por el dispositivo informático de un sistema divulgado en el presente documento en base a dicha comparación de la "cantidad" calculada con una referencia o un valor umbral. Por ejemplo, un dispositivo informático de un sistema puede proporcionar un indicador, en forma de una palabra, símbolo o valor numérico que sea indicativo de una admisión o descarte. La cantidad de referencia aplicable para un sujeto individual puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos tales como edad, sexo o subpoblación, así como de los medios usados para la determinación del polipéptido o péptido al que se hace referencia en el presente documento. Se puede determinar una cantidad de referencia adecuada a partir de una muestra de referencia que se va a analizar conjuntamente, es decir, simultánea o posteriormente, con la muestra de prueba. Preferentemente, la cantidad de referencia se determina llevando a cabo el procedimiento de la presente invención. Preferentemente, la cantidad de referencia se determina en una muestra/muestras obtenidas dentro de los mismos períodos de tiempo con respecto a la FA paroxística reciente.

Preferentemente, la cantidad de referencia es una cantidad de referencia calculada. Preferentemente, la cantidad de referencia calculada permitirá diferenciar entre un sujeto que padeció fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente y un sujeto que no padeció fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente. Las cantidades de referencia se pueden calcular, en principio, para una cohorte de sujetos como se especifica anteriormente en base a los valores medios o promedios para un biomarcador dado aplicando procedimientos estadísticos estándar. En particular, la exactitud de una prueba tal como un procedimiento destinado a diagnosticar un acontecimiento, o no, se describe mejor por sus características de eficacia diagnóstica (ROC) (véase en especial Zweig 1993, Clin. Chem. 39:561-577). El gráfico ROC es una curva de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de variar continuamente el valor umbral de decisión en todo el intervalo de datos observado. El rendimiento clínico de un procedimiento de diagnóstico depende de su exactitud, es decir, su capacidad para asignar correctamente los sujetos a una determinada evaluación, pronóstico o diagnóstico. La curva ROC indica la superposición entre las dos distribuciones representando la sensibilidad frente a la 1-especificidad para el intervalo completo de valores umbrales adecuados para realizar una distinción. En el eje y está la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos, que se define como la proporción del número de resultados de prueba positivos verdaderos con respecto al producto del número de resultados de prueba positivos verdaderos y el número de negativos falsos. Esto también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x está la fracción de positivos falsos, o 1-especificidad, que se define como la proporción del número de resultados positivos falsos con respecto al producto del número de resultados negativos verdaderos y el número positivos falsos. Es un índice de especificidad y se calcula totalmente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de positivos verdaderos y falsos se calculan totalmente por separado, usando los resultados de prueba de dos subgrupos diferentes, la curva ROC es independiente de la prevalencia del acontecimiento en la cohorte. Cada punto en la curva ROC representa un par de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un valor umbral de decisión particular. Una prueba con discriminación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene una curva ROC que pasa a través de la esquina izquierda superior, donde la fracción de positivos verdaderos es de 1,0, o de un 100 % (sensibilidad perfecta), y la fracción de positivos falsos es de 0 (especificidad perfecta). La curva teórica para una prueba sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina izquierda inferior hasta la esquina derecha superior. La mayoría de las curvas están entre estos dos extremos. Si la curva ROC entra 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, cuanto más cerca esté la curva de la esquina izquierda superior, mayor será la exactitud global de la prueba. Dependiendo de un intervalo de confianza deseado, se puede derivar un valor umbral de la curva ROC que permita el diagnóstico o la predicción de un acontecimiento dado con un equilibrio apropiado de sensibilidad y especificidad, respectivamente. En consecuencia, la referencia que se va a usar para el procedimiento mencionado anteriormente de la presente invención puede ser, preferentemente, una cantidad umbral o límite y se puede generar, preferentemente, estableciendo una ROC para dicha cohorte como se describe anteriormente y derivando una cantidad umbral a partir de la misma. Dependiendo de una sensibilidad y especificidad deseadas para un procedimiento de diagnóstico, la curva ROC permite derivar valores umbrales adecuados.

Preferentemente, lo siguiente se aplica como algoritmo de diagnóstico (en particular si la referencia es una cantidad de referencia calculada):

Preferentemente, un incremento en la cantidad del al menos un marcador (incremento en las cantidades de los marcadores) en comparación con la(s) cantidad(es) de referencia es indicativo para el diagnóstico de una fibrilación auricular paroxística reciente, mientras que una disminución en la cantidad del al menos un marcador (disminución en las cantidades de los marcadores) en comparación con la(s) cantidad(es) de referencia indica que el sujeto no padeció fibrilación auricular paroxística recientemente.

Las cantidades de referencia preferentes son como sigue:

Con respecto al marcador hsCRP, la cantidad de referencia está preferentemente dentro de un intervalo de 2,5 a 3,5 mg/l, y más preferentemente, dentro de un intervalo de 3,0 a 3,5 mg/l. Lo más preferentemente, la cantidad de referencia es de 3,0 o 3,5 mg/l.

Con respecto a la troponina cardíaca, la cantidad de referencia está preferentemente dentro de un intervalo de 4,0 a 6 pg/ml, y más preferentemente, dentro de un intervalo de 5,0 a 6,0 pg/ml. Lo más preferentemente, la cantidad de referencia es de 5,5 o 6,0 pg/ml.

Con respecto al marcador IL-6, la cantidad de referencia está preferentemente dentro de un intervalo de 1,5 a 2,0 pg/ml, y más preferentemente, dentro de un intervalo de 1,6 a 1,9 pg/ml. Lo más preferentemente, la cantidad de referencia es de 1,7 o 1,9 pg/ml.

Con respecto al marcador NT-proBNP, la cantidad de referencia está preferentemente dentro de un intervalo de 100 a 150 pg/ml, y más preferentemente, dentro de un intervalo de 110 a 130 pg/ml. Lo más preferentemente, la cantidad de referencia es de 125 o 150 pg/ml.

Una cantidad de referencia preferente para IGFBP7 está dentro de un intervalo de 70 a 100 ng/ml, o más preferentemente dentro del intervalo de 70 a 90 ng/ml. Una cantidad de referencia en particular preferente es de 80 ng/ml.

5 Como se expone anteriormente en el presente documento, la(s) cantidad(es) de referencia también se puede(n) derivar de (i) un sujeto o grupo de sujetos que se sabe que han padecido una fibrilación auricular paroxística reciente. En este caso, una cantidad (cantidades) del al menos un marcador que es (que son) esencialmente la(s) misma(s) cantidad(es) y/o un incremento en la cantidad (incremento en las cantidades) del al menos un marcador en la muestra del sujeto en comparación con la(s) cantidad(es) de referencia es/son indicativo(s) para el diagnóstico de una fibrilación
10 auricular paroxística reciente. Preferentemente, la(s) cantidad(es) de referencia se deriva(n) de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos.

Preferentemente, aplicando la cantidad de referencia mencionada anteriormente, se puede admitir que el sujeto ha padecido una fibrilación auricular paroxística reciente.

15 De forma adicional o alternativa, la(s) cantidad(es) de referencia se puede(n) derivar, preferentemente, de (i) un sujeto o grupo de sujetos conocido por no haber padecido una fibrilación auricular paroxística reciente. Preferentemente, una cantidad (cantidades) del al menos un marcador que es (que son) esencialmente la(s) misma(s) cantidad(es) y/o una disminución en la cantidad (disminución en las cantidades) del al menos un marcador en la muestra del sujeto en comparación la(s) cantidad(es) de referencia indica(n) que el sujeto no padeció fibrilación auricular paroxística. Preferentemente, la cantidad de referencia se deriva de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos.

20 Preferentemente, aplicando la(s) cantidad(es) de referencia mencionada(s) anteriormente se puede descartar que el sujeto haya padecido una fibrilación auricular paroxística reciente.

25 La definición del término "sujeto" se da en otra parte en el presente documento. Las definiciones también se aplican al/a los sujeto(s) de referencia. Preferentemente, el sujeto que se va a someter a prueba y el/los sujeto(s) de referencia tienen la misma edad, sexo y/o raza. En consecuencia, es preferente que la cantidad de referencia se ajuste por edad, sexo y/o raza.

30 Los marcadores como se hace referencia en el presente documento se pueden determinar solos. Sin embargo, se pueden determinar conjuntamente, es decir, el procedimiento de la presente divulgación puede englobar la determinación de un marcador, dos marcadores, tres marcadores o cuatro marcadores. Una combinación preferente particular es la determinación de una troponina cardíaca y de CRP (es decir, hsCRP). La determinación combinada de estos marcadores, preferentemente, permite diagnosticar si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística, o no, dentro de un período de 30 días antes de que se haya obtenido la muestra, y más preferentemente, dentro de un período de una semana antes de que se haya obtenido la muestra.

35 Otra combinación preferente es la determinación de una troponina cardíaca y de un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP. La determinación combinada de estos marcadores, en particular, permite diagnosticar si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística, o no, dentro de un período de una semana antes de que se haya obtenido la muestra.

40 Otra combinación preferente es la determinación de una troponina cardíaca y de IL-6. La determinación combinada de estos marcadores, preferentemente, permite diagnosticar si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística, o no, dentro de un período de 30 días antes de que se haya obtenido la muestra, y más preferentemente, dentro de un período de una semana antes de que se haya obtenido la muestra.

45 Otra combinación preferente es la determinación de IL-6 y de un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP. La determinación combinada de estos marcadores, en particular, permite diagnosticar si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística, o no, dentro de un período de una semana antes de que se haya obtenido la muestra.

50 Otra combinación preferente es la determinación de CRP y de un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP. La determinación combinada de estos marcadores, en particular, permite diagnosticar si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística, o no, dentro de un período de una semana antes de que se haya obtenido la muestra.

55 Otra combinación preferente es la determinación de hsCRP y de IL-6. La determinación combinada de estos marcadores, preferentemente, permite diagnosticar si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística, o no, dentro de un período de 30 días antes de que se haya obtenido la muestra, y más preferentemente, dentro de un período de una semana antes de que se haya obtenido la muestra.

60 En un aspecto descrito, se contempla un procedimiento para establecer una ayuda para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento:

65 a) determinar la cantidad de al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca,

- un péptido de tipo BNP, hsCRP (CRP de alta sensibilidad), IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) (i) poniendo la muestra en contacto con un agente de detección (agentes de detección) que se une(n) específicamente a dicho al menos un marcador durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo(s) de dicho(s) agente(s) de detección y el al menos un marcador de la muestra, (ii) midiendo la(s) cantidad(es) del/de los complejo(s) formado(s), en el que dicha(s) cantidad(es) del/de los complejo(s) formado(s) es/son proporcionales a la(s) cantidad(es) del al menos un marcador presente en la muestra, y (iii) transformando la(s) cantidad(es) del complejo formado en una cantidad (cantidades) del al menos un marcador que refleja la(s) cantidad(es) del al menos un marcador presente en la muestra;
- 5 b) comparar dicha(s) cantidad(es) con una referencia (referencias); y
- 10 c) establecer una ayuda para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente en un sujeto en base al resultado de la comparación realizada en la etapa b).
- 15 En otro aspecto, se describe un sistema para establecer una ayuda para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente en un sujeto, que comprende:
- a) una unidad analizadora configurada para poner la muestra en contacto con un agente de detección (o agentes de detección) que se une(n) específicamente a dicho al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, hsCRP (CRP de alta sensibilidad), IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de dicho agente de detección y el al menos un marcador de la muestra,
- 20 b) una unidad analizadora configurada para medir la cantidad del complejo formado, en el que dicha cantidad del complejo formado es proporcional a la cantidad del al menos un marcador presente en la muestra,
- 25 c) un dispositivo informático que tiene un procesador y en comunicación operativa con dichas unidades de análisis, y
- d) un medio legible por máquina no transitorio que incluye una pluralidad de instrucciones ejecutables por el procesador, las instrucciones, cuando se ejecutan, transforman la cantidad del complejo formado en una cantidad del al menos un marcador que refleja la cantidad del al menos un marcador presente en el muestra, comparan dicha cantidad con una referencia y establecen una ayuda para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente en un sujeto en base al resultado de dicha comparación con dicha referencia.
- 30 Un agente de detección adecuado puede ser, en un aspecto, un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal, que se une específicamente al al menos un marcador, es decir, un agente de detección que se une a una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, hsCRP (CRP de alta sensibilidad), o a IL-6 (interleucina-6), en una muestra de un sujeto que se va a investigar por el procedimiento de la divulgación.
- 35 Otro agente de detección que se puede aplicar, en un aspecto, puede ser un aptámero que se une específicamente al al menos un marcador en la muestra. Aún en un aspecto, la muestra se retira del complejo formado entre el agente de detección y el al menos un marcador antes de la medición de la cantidad de complejo formado. En consecuencia, en un aspecto, el agente de detección se puede inmovilizar sobre un soporte sólido.
- 40 Aún en un aspecto, la muestra se puede retirar del complejo formado sobre el soporte sólido aplicando una solución de lavado. El complejo formado será proporcional a la cantidad del al menos un marcador presente en la muestra. Se entenderá que la especificidad y/o sensibilidad del agente de detección que se va a aplicar define el grado de proporción de al menos un marcador comprendido en la muestra que se puede unir específicamente. Otros detalles sobre cómo se puede llevar a cabo la determinación también se encuentran en otra parte en el presente documento.
- 45 La cantidad de complejo formado se transformará en una cantidad de al menos un marcador que refleja la cantidad efectivamente presente en la muestra. Una cantidad de este tipo, en un aspecto, puede ser esencialmente la cantidad presente en la muestra o puede ser, en otro aspecto, una cantidad que es una determinada proporción de la misma debido a la relación entre el complejo formado y la cantidad presente en la muestra original.
- 50 Aún en un aspecto del procedimiento mencionado anteriormente, la etapa a) se puede llevar a cabo por una unidad analizadora, en un aspecto, una unidad analizadora como se define en otra parte en el presente documento.
- 55 En un aspecto del procedimiento de la invención, la(s) cantidad(es) determinada(s) en la etapa a) se compara(n) con una referencia. En un aspecto, la referencia es una referencia como se define en otra parte en el presente documento.
- 60 Aún en otro aspecto, la referencia tiene en cuenta la relación proporcional entre la cantidad medida de complejo y la cantidad presente en la muestra original. Por tanto, las referencias aplicadas en un aspecto del procedimiento de la invención son referencias artificiales que se adoptan para reflejar las limitaciones del agente de detección que se ha usado. En otro aspecto, dicha relación también se puede tener en cuenta cuando se lleva a cabo la comparación, por ejemplo, incluyendo una etapa de cálculo de normalización y/o corrección para la cantidad determinada antes de comparar realmente el valor de la cantidad determinada y la referencia. De nuevo, la etapa de cálculo de normalización y/o corrección para la cantidad determinada adopta la etapa de comparación de modo que las limitaciones del agente
- 65

de detección que se ha usado se reflejen apropiadamente. En un aspecto, la comparación se lleva a cabo automáticamente, por ejemplo, asistida por un sistema informático o similar.

La ayuda para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente se establece en base a la comparación llevada a cabo en la etapa b) asignando al sujeto a un grupo de sujetos que han padecido fibrilación auricular paroxística recientemente o bien a un grupo de sujetos que no han padecido fibrilación auricular paroxística recientemente como se expone en el presente documento en otra parte. Como se analiza en otra parte, la asignación del sujeto investigado no debe ser correcta en un 100 % de los casos investigados. Además, los grupos de sujetos en los que se asigna el sujeto investigado son grupos artificiales porque se establecen en base a consideraciones estadísticas, es decir, un determinado grado preseleccionado de verosimilitud en base al que debe operar el procedimiento de la invención. En un aspecto de la invención, la ayuda para optimizar una evaluación de riesgo se establece automáticamente, por ejemplo, se asiste por un dispositivo informático o similar, como se describe y divulga en el presente documento.

En un aspecto del procedimiento de la invención, dicho procedimiento comprende además una etapa de recomendar el tratamiento anticoagulante de acuerdo con los resultados de comparación. Preferentemente, se recomienda el tratamiento anticoagulante si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística recientemente.

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

Las definiciones y explicaciones dadas en el presente documento se aplican *mutatis mutandis* a lo siguiente:

Procedimiento para identificar a un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante

Además, la presente divulgación también se refiere al procedimiento para identificar a un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante:

a. determinar la cantidad de al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, NT-proBNP (prohormona N terminal del péptido natriurético cerebral), hsCRP, IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) en una muestra de un sujeto que es sospechoso de haber padecido fibrilación auricular paroxística recientemente, y

b. comparar la(s) cantidad(es) así determinada(s) de dicho al menos un marcador con una cantidad de referencia (con cantidades de referencia), con lo que se identifica un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante,

en el que el sujeto no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra.

Preferentemente, se identifica un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante llevando a cabo la etapa adicional de c) identificar un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante, en base a los resultados de la comparación llevada a cabo en la etapa b).

En un modo de realización, la determinación de la(s) cantidad(es) del/de los biomarcador(es) en la etapa (a) se realiza poniendo en contacto la muestra con un agente de detección que se une específicamente al biomarcador (o con agentes de detección que se unen específicamente a los biomarcadores), formando de este modo un complejo con el agente de detección y el biomarcador, detectando la(s) cantidad(es) del/de los complejo(s) formado(s), determinando de este modo la cantidad del biomarcador. El término "agente de detección" se ha especificado en otra parte en el presente documento.

El término "identificar" como se usa en el presente documento quiere decir evaluar si un sujeto será sensible al tratamiento anticoagulante o no, y, por tanto, requiere dicho tratamiento o no. Preferentemente, un sujeto es sensible a dicho tratamiento, si el sujeto se beneficiará de dicho tratamiento. En particular, un sujeto se beneficia de dicho tratamiento, si el tratamiento reduce el riesgo de apoplejía de dicho sujeto. Además, para un sujeto que es sensible a dicho tratamiento, las ventajas de dicho tratamiento superarán las desventajas (en particular desventajas provocadas por efectos secundarios adversos de un determinado régimen de tratamiento, pero también con respecto a los costes). Además, para un sujeto que no es sensible a dicho tratamiento, las desventajas (en particular, con respecto a efectos secundarios adversos pero también con respecto a los costes debido a un sobretratamiento) de dicho tratamiento superarán las ventajas. En particular, si un sujeto no requiere un determinado tratamiento cardíaco, se ahorrarán los costes que resultarían del sobretratamiento y/o se pueden evitar los efectos secundarios adversos. Como se entenderá por los expertos en la técnica, dicha evaluación normalmente no pretende ser correcta para todos (es decir, 100 %) de los sujetos que se van a identificar. El término, sin embargo, requiere que se pueda identificar una parte estadísticamente significativa de sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). Se puede determinar si una parte es estadísticamente significativa sin más por el experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes son de al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. Los valores de p son,

preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más preferentemente, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de una población se pueden identificar apropiadamente por el procedimiento de la presente invención.

5 Los marcadores preferentes que se van a determinar en relación con el procedimiento mencionado anteriormente son troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, en particular NT-proBNP (prohormona N terminal del péptido natriurético cerebral) y hsCRP o IL-6 (interleucina-6).

10 Los tratamientos anticoagulantes son bien conocidos en la técnica. Como se usa en el presente documento, el término, preferentemente, se refiere a un tratamiento que tiene como objetivo reducir o prevenir la coagulación de la sangre. Un tratamiento anticoagulante preferente es la administración de un anticoagulante. Un anticoagulante preferente se selecciona del grupo que consiste en heparina, un derivado de cumarina, tal como warfarina o dicumarol, inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), antitrombina III, inhibidores del factor IXa, inhibidores del factor Xa, inhibidores de los factores Va y VIIIa, inhibidores de trombina.

15 Un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante también puede ser sensible a un tratamiento con al menos un agente antiarrítmico. Los agentes antiarrítmicos preferentes son los agentes de clase I tales como quinidina y lidocaína, agentes de clase II, es decir, betabloqueantes, agentes de clase III tales como ibutilida, agentes de clase IV tales como verapamilo o agentes de clase V tales como digoxina.

20 El término "cantidad de referencia" se ha explicado en otra parte en el presente documento. En el contexto del procedimiento mencionado anteriormente, el término se refiere a una cantidad que permite la asignación de un sujeto al grupo de sujetos que son sensibles al tratamiento anticoagulante o bien a un grupo de sujetos que no son sensibles al tratamiento anticoagulante. Una cantidad de referencia de este tipo puede ser una cantidad umbral que separa estos grupos entre sí. Una cantidad umbral adecuada que separa los dos grupos se puede calcular sin más por las pruebas estadísticas a las que se hace referencia en el presente documento en otra parte en base a cantidades del marcador como se hace referencia en el presente documento de un sujeto o grupo de sujetos que padecieron fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente, o bien un sujeto o grupo de sujetos que no padecieron fibrilación auricular paroxística (FA) recientemente.

30 Preferentemente, lo siguiente se aplica como algoritmo de diagnóstico (en particular si la referencia es una cantidad de referencia calculada):

35 Preferentemente, un incremento en la cantidad del al menos un marcador (incremento en las cantidades de los marcadores) en comparación con la(s) cantidad(es) de referencia es indicativo de un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante, mientras que una disminución en la cantidad del al menos un marcador (disminución en las cantidades de los marcadores) en comparación con la(s) cantidad(es) de referencia es indicativo de un sujeto que no es sensible al tratamiento anticoagulante.

40 Además, la(s) cantidad(es) de referencia se pueden derivar de (i) un sujeto o grupo de sujetos que se sabe que son sensibles al tratamiento anticoagulante. En este caso, una cantidad (cantidades) del al menos un marcador que es (que son) esencialmente la(s) misma(s) cantidad(es) y/o un incremento en la cantidad (incremento en las cantidades) del al menos un marcador en la muestra del sujeto en comparación con la(s) cantidad(es) de referencia es/son indicativos de un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante. Preferentemente, la(s) cantidad(es) de referencia se deriva(n) de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos.

Preferentemente, aplicando la cantidad de referencia mencionada anteriormente, se puede admitir que el sujeto es sensible al tratamiento anticoagulante.

50 De forma adicional o alternativa, la(s) cantidad(es) de referencia se pueden derivar, preferentemente, de (i) un sujeto o grupo de sujetos conocidos porque no son sensibles al tratamiento anticoagulante. Preferentemente, una cantidad (cantidades) del al menos un marcador que es (que son) esencialmente la(s) misma(s) cantidad(es) y/o una disminución en la cantidad (disminución en las cantidades) del al menos un marcador en la muestra del sujeto en comparación la(s) cantidad(es) de referencia indica(n) que el sujeto no es sensible al tratamiento anticoagulante. Preferentemente, la cantidad de referencia se deriva de una muestra de dicho sujeto o de muestras de dicho grupo de sujetos.

Preferentemente, aplicando la(s) cantidad(es) de referencia mencionada(s) se puede descartar que el sujeto no sea sensible al tratamiento anticoagulante.

60 Además, la presente divulgación contempla un procedimiento para tratar a un paciente con tratamiento anticoagulante y/o con un agente antiarrítmico, comprendiendo el procedimiento:

65 (a) determinar la cantidad de al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, NT-proBNP (prohormona N terminal del péptido natriurético cerebral), hsCRP, IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) en una muestra de un sujeto que es sospechoso de haber padecido

fibrilación auricular paroxística recientemente, y

(b) comparar la(s) cantidad(es) así determinada(s) de dicho al menos un marcador con una cantidad de referencia (con cantidades de referencia), y

5 (c) seleccionar y/o iniciar un tratamiento anticoagulante y/o con un agente antiarrítmico cuando la(s) cantidad(es) del al menos un marcador está por encima de la cantidad de referencia (están por encima de las cantidades de referencia).

10 El procedimiento al que se hace referencia anteriormente, puede comprender además la etapa (b1) identificar un sujeto como que ha padecido fibrilación auricular recientemente cuando la cantidad del al menos un marcador (o las cantidades) está por encima de la cantidad de referencia (están por encima de las cantidades de referencia).

15 La presente divulgación también se refiere al uso de i) al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, hsCRP (CRP de alta sensibilidad), IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) o ii) de un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo BNP, y/o de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca, y/o de un agente de detección que se une específicamente a hsCRP, y/o de un agente de detección que se une específicamente a IL-6, y/o de un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7, en una muestra de un sujeto para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente en el sujeto. Preferentemente, el sujeto no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra.

20 La presente divulgación también se refiere al uso de i) al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, hsCRP (CRP de alta sensibilidad), IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) o ii) de un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo BNP, y/o de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca, y/o de un agente de detección que se une específicamente a hsCRP, y/o de un agente de detección que se une específicamente a IL-6, y/o de un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7, en una muestra de un sujeto para identificar un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante. Preferentemente, el sujeto no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra.

25 La presente divulgación también se refiere al uso de i) al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, hsCRP (CRP de alta sensibilidad), IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) o ii) de un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo BNP, y/o de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca, y/o de un agente de detección que se une específicamente a hsCRP, y/o de un agente de detección que se une específicamente a IL-6, y/o de un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7, para la fabricación de una composición diagnóstica para diagnosticar en un sujeto una fibrilación auricular paroxística reciente. Preferentemente, el sujeto no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra.

30 La presente divulgación también se refiere al uso de i) al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, hsCRP (CRP de alta sensibilidad), IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) o ii) de un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo BNP, y/o de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca, y/o de un agente de detección que se une específicamente a hsCRP, y/o de un agente de detección que se une específicamente a IL-6, y/o de un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7, para la fabricación de una composición diagnóstica para identificar un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante. Preferentemente, el sujeto no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra.

35 El término "agente de detección" como se usa en el presente documento se refiere a un agente que puede reconocer y unirse específicamente al/a los polipéptido(s) biomarcador(s) presente(s) en una muestra. Además, dicho agente permitirá la detección directa o indirecta del complejo formado por dicho agente y el biomarcador. La detección directa se puede lograr incluyendo en el agente un marcador detectable. El marcaje indirecto se puede lograr por otro agente que se une específicamente al complejo que comprende el biomarcador y el agente de detección en el que dicho otro agente puede generar una señal detectable. Los compuestos adecuados que se pueden usar como agentes de detección son bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el agente de detección es un anticuerpo o aptámero que se une específicamente al biomarcador. El término "anticuerpo" se ha descrito en otra parte en el presente documento.

40 La presente divulgación también se refiere a un anticoagulante o un agente antiarrítmico para tratar a un sujeto que ha padecido una fibrilación auricular paroxística reciente, en el que el sujeto se trata cuando la cantidad de al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, hsCRP (CRP de alta sensibilidad), IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) en una muestra del paciente es mayor que la cantidad de referencia.

45 De acuerdo con un modo de realización preferente de la presente divulgación, se proporciona un dispositivo adaptado

para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente que comprende

a) una unidad analizadora que comprende un agente (o agentes) de detección que se une específicamente a un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, hsCRP, IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7), estando adaptada dicha unidad para determinar la(s) cantidad(es) del/de los marcador(es) en una muestra; y

b) una unidad analizadora para comparar la(s) cantidad(es) determinada(s) con la(s) cantidad(es) de referencia, con lo que se diagnostica una fibrilación auricular paroxística reciente, comprendiendo dicha unidad una base de datos con una cantidad (o cantidades) de referencia como se expone en el presente documento en otra parte y un algoritmo implementado por ordenador que lleva a cabo la comparación como se expone en el presente documento en otra parte.

De acuerdo con otro modo de realización preferente de la presente divulgación, se proporciona un dispositivo adaptado para identificar a un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante que comprende

a) una unidad analizadora que comprende un agente (o agentes) de detección que se une específicamente a un marcador seleccionado del grupo que consiste en una troponina cardíaca, un péptido de tipo BNP, hsCRP, IL-6 (interleucina-6) e IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7), estando adaptada dicha unidad para determinar la(s) cantidad(es) del/de los marcador(es) en una muestra; y

b) una unidad analizadora para comparar la(s) cantidad(es) determinada(s) con la(s) cantidad(es) de referencia, con lo que se identifica un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante, comprendiendo dicha unidad una base de datos con una cantidad (o cantidades) de referencia como se expone en el presente documento en otra parte y un algoritmo implementado por ordenador que lleva a cabo la comparación como se expone en el presente documento en otra parte.

Las cantidades de referencia y algoritmos preferentes se divulgan en otra parte en el presente documento.

El término "dispositivo", como se usa en el presente documento se refiere a un sistema que comprende las unidades mencionadas anteriormente unidas operativamente entre sí para permitir el diagnóstico o monitorización de acuerdo con los procedimientos de la divulgación.

Los agentes de detección preferentes que se pueden usar para la unidad de análisis se divulgan en otra parte en el presente documento. La unidad de análisis, preferentemente, comprende dichos agentes de detección en forma inmovilizada sobre un soporte sólido que se debe poner en contacto con la muestra que comprende los biomarcadores de los que su cantidad se va a determinar. Además, la unidad de análisis también puede comprender un detector que determina la cantidad de agente de detección que se une específicamente al/a los biomarcador(es). La cantidad determinada se puede transmitir a la unidad de evaluación. Dicha unidad de evaluación comprende un elemento de procesamiento de datos, tal como un ordenador, con un algoritmo implementado para llevar a cabo una comparación entre la cantidad determinada y una referencia adecuada. Las referencias adecuadas se derivan de un sujeto o bien grupo de sujetos como se define anteriormente en contexto con el procedimiento de la presente divulgación.

Los resultados se pueden dar como salida de datos brutos de diagnóstico paramétrico, preferentemente, como cantidades absolutas o relativas. Se debe entender que estos datos necesitarán interpretación por el médico. Sin embargo, también se contemplan dispositivos de sistemas expertos en los que la salida comprende datos brutos de diagnóstico procesado en los que su interpretación no requiere un médico especializado.

Un modo de realización preferente de la presente divulgación incluye un sistema para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente. Los ejemplos de sistemas incluyen analizadores de química clínica, analizadores de química de coagulación, analizadores de inmunquímica, analizadores de orina, analizadores de ácido nucleico, usados para detectar el resultado de reacciones químicas o biológicas o para monitorizar el progreso de reacciones químicas o biológicas. Más específicamente, los sistemas ejemplares de la presente divulgación pueden incluir sistemas Roche Elecsys™ y analizadores de inmunoanálisis Cobas®, analizadores Abbott Architect™ y AxSYM™, analizadores Siemens Centaur™ e Immulite™, y analizadores Beckman Coulter UniCel™ y Access™, o similares.

Los modos de realización del sistema pueden incluir una o más unidades analizadoras utilizadas para practicar la divulgación objeto. Las unidades analizadoras del sistema divulgadas en el presente documento están en comunicación operativa con el dispositivo informático divulgado en el presente documento a través de cualquiera de una conexión por cable, Bluetooth, LANS o señal inalámbrica, como es conocido. Adicionalmente, de acuerdo con la presente divulgación, una unidad analizadora puede comprender un aparato independiente, o módulo dentro de un instrumento más grande, que realiza una o ambas de la detección, por ejemplo, evaluación cualitativa y/o cuantitativa de muestras para propósitos de diagnóstico. Por ejemplo, una unidad analizadora puede realizar o ayudar con el pipeteo, dosificación, mezcla de muestras y/o reactivos. Una unidad analizadora puede comprender una unidad de mantenimiento de reactivos para mantener los reactivos para realizar los ensayos. Los reactivos se pueden disponer, por ejemplo, en forma de recipientes o casetes que contienen reactivos individuales o un grupo de reactivos,

dispuestos en receptáculos o posiciones apropiados dentro de un transportador o compartimento de almacenamiento. Los reactivos de detección también pueden estar en forma inmovilizada sobre un soporte sólido que está en contacto con la muestra. Además, una unidad analizadora puede incluir un componente de detección y/o procedimiento que es optimizable para análisis específico.

5 De acuerdo con algunos modos de realización, una unidad analizadora se puede configurar para la detección óptica de un analito, por ejemplo un marcador, con una muestra. Una unidad analizadora ejemplar configurada para la detección óptica comprende un dispositivo configurado para convertir energía electromagnética en una señal eléctrica, que incluye detectores ópticos tanto de un solo elemento como de múltiples elementos o de matriz. De acuerdo con
10 la presente divulgación, un detector óptico puede monitorizar una señal electromagnética óptica y proporcionar una señal de respuesta o señal de salida eléctrica con respecto a una señal de referencia indicativa de la presencia y/o concentración de un analito en una muestra que se localiza en una trayectoria óptica. Dichos dispositivos también pueden incluir, por ejemplo, fotodiodos, incluyendo fotodiodos de avalancha, fototransistores, detectores
15 fotomultiplicadores y matrices de sensores lineales, detectores CCD, detectores CMOS, incluyendo detectores de matrices CMOS, fotomultiplicadores y matrices fotomultiplicadoras. De acuerdo con determinados modos de realización, un detector óptico, tal como un fotodiodo o fotomultiplicador, puede contener dispositivos electrónicos de acondicionamiento o procesamiento de señales adicionales. Por ejemplo, un detector óptico puede incluir al menos un preamplificador, filtro electrónico o circuito integrado. Los preamplificadores adecuados incluyen, por ejemplo, preamplificadores de integración, transimpedancia y ganancia de corriente (espejo de corriente).

20 Adicionalmente, una o más unidades analizadoras de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender una fuente de luz para emitir luz. Por ejemplo, una fuente de luz de una unidad analizadora puede consistir en al menos un elemento emisor de luz (tal 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 alta
25 intensidad, un láser) para medir las concentraciones de analitos con una muestra que se está sometiendo a prueba o para permitir una transferencia de energía (por ejemplo, a través de transferencia de energía de resonancia fluorescente o catalizando una enzima).

30 Además, una unidad analizadora del sistema puede incluir una o más unidades incubadoras (por ejemplo, para mantener una muestra o un reactivo a una temperatura o intervalo de temperatura específico). En algunos modos de realización, una unidad analizadora puede incluir un termociclador, incluir un termociclador en tiempo real, para someter una muestra a ciclos de temperatura repetidos y monitorizar un cambio en la cantidad de un producto de amplificación con la muestra.

35 Adicionalmente, una unidad analizadora del sistema divulgado en el presente documento puede comprender, o estar conectada operativamente a, un recipiente de reacción o unidad de alimentación de cubeta. Las unidades de alimentación ejemplares incluyen unidades de procesamiento de líquido, 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, por ejemplo, una aguja de acero, o puntas de pipeta desechables. La unidad analizadora puede
40 comprender además una o más unidades de mezcla, por ejemplo, un agitador para agitar una cubeta que comprende un líquido o una paleta de mezcla para mezclar líquidos en una cubeta o recipiente de reactivos.

45 De lo anterior se deduce que de acuerdo con algunos modos de realización de la presente divulgación, partes de algunas etapas de los procedimientos divulgados y descritos en el presente documento se pueden realizar por un dispositivo informático. Un dispositivo informático de datos puede ser un ordenador de propósito general o un dispositivo informático portátil, por ejemplo. También se debe entender que se pueden usar múltiples dispositivos informáticos juntos, tales como en una red u otros procedimientos de transferencia de datos, para realizar una o más etapas de los procedimientos divulgados en el presente documento. Los dispositivos informáticos ejemplares incluyen ordenadores de sobremesa, ordenadores portátiles, agendas electrónicas ("PDA"), tales como dispositivos de marca
50 BLACKBERRY, teléfonos inteligentes, tabletas, servidores y similares. En general, un dispositivo informático comprende un procesador que puede ejecutar una pluralidad de instrucciones (tales como un programa informático).

Un dispositivo informático tiene acceso a una memoria. Una memoria es un medio legible por ordenador y puede comprender un único dispositivo de almacenamiento o múltiples dispositivos de almacenamiento, situados localmente
55 con el dispositivo informático o bien accesibles al dispositivo informático a través de una red, por ejemplo. Los medios legibles por ordenador pueden ser cualquier medio disponible al que se puede acceder por el dispositivo informático e incluye medios tanto volátiles como no volátiles. Además, los medios legibles por ordenador pueden ser uno o ambos de medios extraíbles y no extraíbles. A modo de ejemplo, y sin limitación, los medios legibles por ordenador pueden comprender medios de almacenamiento informáticos. Los medios de almacenamiento informáticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, RAM, ROM, EEPROM, memoria flash o cualquier otra tecnología de memoria, CD-ROM, disco versátil digital (DVD) u otro almacenamiento en disco óptico, casetes magnéticos, cinta magnética, almacenamiento en disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético, o cualquier otro medio que se pueda usar para almacenar una pluralidad de instrucciones a las que se puede acceder por el dispositivo informático y ejecutar por el procesador del dispositivo informático.

60 De acuerdo con modos de realización de la presente divulgación, el programa informático puede incluir instrucciones

que, cuando se ejecutan por un procesador del dispositivo informático, pueden realizar una o más etapas de los procedimientos divulgados en el presente documento. Algunas de las instrucciones se pueden adaptar para producir señales que controlan la operación de otras máquinas y por tanto pueden operar a través de esas señales de control para transformar materiales muy alejados del propio ordenador. Estas descripciones y representaciones son los medios usados por los expertos en la técnica de procesamiento de datos, por ejemplo, para transmitir más eficazmente lo esencial de su trabajo a otros expertos en la técnica.

La pluralidad de instrucciones también pueden comprender un algoritmo que en general está concebido como una secuencia autoconcoherente de etapas que da lugar a un resultado deseado. Estas etapas son las que requieren manipulaciones físicas de cantidades físicas. Normalmente, aunque no necesariamente, estas cantidades toman la forma de pulsos o señales eléctricos o magnéticos que se pueden almacenar, transferir, transformar, combinar, comparar y manipular de otro modo. En ocasiones resulta conveniente, principalmente por motivos de uso común, referirse a estas señales como valores, caracteres, datos de visualización, números o similares como una referencia a los elementos físicos o manifestaciones en que se incorporan o expresan dichas señales. Sin embargo, se debe tener en cuenta que todos estos términos y similares se deben asociar con las cantidades físicas apropiadas y se usan simplemente en el presente documento como etiquetas convenientes aplicadas a estas cantidades. De acuerdo con algunos modos de realización de la presente divulgación, un algoritmo para llevar a cabo una comparación entre una cantidad determinada de uno o más marcadores divulgados en el presente documento, y una referencia adecuada, se realiza y se lleva a cabo ejecutando las instrucciones. Los resultados se pueden dar como salida de datos brutos de diagnóstico paramétrico o como cantidades absolutas o relativas. De acuerdo con diversos modos de realización del sistema divulgado en el presente documento, se puede proporcionar un "diagnóstico" por el dispositivo informático de un sistema divulgado en el presente documento en base a dicha comparación de la "cantidad" calculada con una referencia o un valor umbral. Por ejemplo, un dispositivo informático de un sistema puede proporcionar un indicador, en forma de una palabra, símbolo o valor numérico que sea indicativo de un diagnóstico particular.

El dispositivo informático también puede tener acceso a un dispositivo de salida. Los dispositivos de salida ejemplares incluyen máquinas de fax, pantallas, impresoras y archivos, por ejemplo. De acuerdo con algunos modos de realización de la presente divulgación, un dispositivo informático puede realizar una o más etapas de un procedimiento divulgado en el presente documento, y después de esto proporcionar una salida, por medio de un dispositivo de salida, con relación a un resultado, indicación, proporción u otro factor del procedimiento.

Finalmente, también se describe un kit adaptado para llevar a cabo un procedimiento de la presente divulgación que comprende un agente de detección que se une específicamente a un marcador seleccionado del grupo que consiste en un péptido natriurético cerebral, una troponina cardíaca y sFlt-1, estándares de referencia así como instrucciones para llevar a cabo el dicho procedimiento.

El término "kit", como se usa en el presente documento, se refiere a una colección de los componentes mencionados anteriormente, preferentemente, proporcionados por separado o en un único recipiente. El recipiente también comprende instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de la presente divulgación.

Estas instrucciones pueden estar en forma de un manual o se pueden proporcionar por un código de programa informático que puede llevar a cabo las comparaciones a las que se hace referencia en los procedimientos de la presente divulgación y establecer un diagnóstico en consecuencia cuando se implementa en un ordenador o un dispositivo de procesamiento de datos. El código de programa informático se puede proporcionar en un medio o dispositivo de almacenamiento de datos tal como un medio de almacenamiento óptico (por ejemplo, un disco compacto) o directamente en un ordenador o dispositivo de procesamiento de datos. Además, el kit comprenderá al menos un estándar para una referencia como se define en el presente documento anteriormente, es decir, una solución con una cantidad predefinida para el al menos un marcador que representa una cantidad de referencia. Un estándar de este tipo puede representar, por ejemplo, la cantidad del al menos un marcador de un sujeto o grupo de sujetos que han padecido una fibrilación auricular paroxística recientemente o un sujeto o grupo de sujetos que no han padecido una fibrilación auricular paroxística recientemente.

En algunos modos de realización, un kit divulgado en el presente documento incluye al menos un componente o una combinación envasada de componentes para practicar un procedimiento divulgado. Por "combinación envasada" se quiere decir que los kits proporcionan un único envase que contiene una combinación de uno o más componentes, tales como sondas (por ejemplo, un anticuerpo), controles, tampones, reactivos (por ejemplo, conjugado y/o sustrato) instrucciones, y similares, como se divulga en el presente documento. Un kit que contiene un solo recipiente también se incluye dentro de la definición de "combinación envasada". En algunos modos de realización, los kits incluyen al menos una sonda, por ejemplo un anticuerpo (que tiene afinidad específica por un epítipo de un biomarcador como se divulga en el presente documento. Por ejemplo, los kits pueden incluir un anticuerpo que se marca con un fluoróforo o un anticuerpo que es miembro de una proteína de fusión. En el kit, la sonda se puede inmovilizar y se puede inmovilizar en una conformación específica. Por ejemplo, se puede proporcionar una sonda inmovilizada en un kit para unir específicamente la proteína diana, para detectar la proteína diana en una muestra y/o para retirar la proteína diana de una muestra.

De acuerdo con algunos modos de realización, los kits incluyen al menos una sonda, que se puede inmovilizar, en al

menos un recipiente. Los kits también pueden incluir múltiples sondas, opcionalmente inmovilizadas, en uno o más recipientes. Por ejemplo, las múltiples sondas pueden estar presentes en un único recipiente o en recipientes separados, por ejemplo, en los que cada recipiente contiene una única sonda.

5 En algunos modos de realización, un kit puede incluir una o más sondas no inmovilizadas y uno o más soportes sólidos que incluyen o no una sonda inmovilizada. Algunos de dichos modos de realización pueden comprender algunos o todos los reactivos y suministros necesarios para inmovilizar una o más sondas al soporte sólido, o algunos o todos los reactivos y suministros necesarios para la unión de sondas inmovilizadas a proteínas específicas dentro de una muestra.

10 En determinados modos de realización, una única sonda (incluyendo múltiples copias de la misma sonda) se puede inmovilizar en un único soporte sólido y proporcionarse en un único recipiente. En otros modos de realización, dos o más sondas, cada una específica para una proteína diana diferente o una forma diferente de una única proteína diana (tal como un epítipo específico), se proporciona en un único recipiente. En algunos de dichos modos de realización, una sonda inmovilizada se puede proporcionar en múltiples recipientes diferentes (por ejemplo, en forma de un solo uso), o múltiples sondas inmovilizadas se pueden proporcionar en múltiples recipientes diferentes. En otros modos de realización, las sondas se pueden inmovilizar en múltiples tipos diferentes de soportes sólidos. Cualquier combinación de sonda(s) inmovilizada(s) y recipiente(s) se contempla para los kits divulgados en el presente documento, y cualquier combinación de los mismos se puede seleccionar para lograr un kit adecuado para un uso deseado.

20 Un recipiente de los kits puede ser cualquier recipiente que sea adecuado para envasar y/o contener uno o más componentes divulgados en el presente documento, incluyendo por ejemplo sondas (por ejemplo, un anticuerpo), controles, tampones y reactivos (por ejemplo, conjugado y/o sustrato). Los materiales adecuados incluyen, pero no se limitan a, vidrio, plástico, cartón u otro producto de papel, madera, metal y cualquier aleación de los mismos. En algunos modos de realización, el recipiente puede encerrar completamente una sonda(s) inmovilizada(s) o puede cubrir simplemente la sonda para minimizar la contaminación por polvo, aceites, etc., y la exposición a la luz. En algunos otros modos de realización, los kits pueden comprender un único recipiente o múltiples recipientes, y cuando están presentes múltiples recipientes, cada recipiente puede ser el mismo que todos los otros recipientes, diferente a otros o diferente a algunos pero no a todos los otros recipientes.

30 **Procedimiento para diagnosticar fibrilación auricular continua en un sujeto**

Ventajosamente, se ha descubierto en el contexto de los estudios subyacentes a la presente divulgación que la determinación de IGFBP7 en una muestra de un sujeto permite diagnosticar si un sujeto padece una fibrilación auricular continua o no.

En consecuencia, también se describe un procedimiento para diagnosticar fibrilación auricular en un sujeto, que comprende

40 (a) determinar la cantidad del biomarcador IGFBP7 en una muestra del sujeto, y

(b) comparar la cantidad del biomarcador IGFBP7 como se determina en la etapa (a) con una cantidad de referencia.

45 Preferentemente, una cantidad del biomarcador IGFBP7 en la muestra del sujeto por encima de la cantidad de referencia indica que el sujeto tiene fibrilación auricular. También preferentemente, una cantidad del biomarcador IGFBP7 en la muestra del sujeto por debajo de la cantidad de referencia indica que el sujeto no tiene fibrilación auricular.

50 En un modo de realización, la determinación de la cantidad del biomarcador en la etapa (a) se realiza poniendo en contacto la muestra con un agente de detección que se une específicamente al biomarcador, formando de este modo un complejo con el agente de detección y el biomarcador, detectando la cantidad del complejo formado, determinando de este modo la cantidad del biomarcador IGFBP7. El término "agente de detección" se ha especificado en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, el agente es un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a IGFBP7.

55 El término "detectar" un biomarcador como se usa en el presente documento se refiere a procedimientos de detección de la cantidad del biomarcador en la muestra empleando procedimientos apropiados de detección descritos en otra parte en el presente documento.

60 En un modo de realización, el procedimiento mencionado anteriormente puede comprender además la etapa (c) de proporcionar un diagnóstico de fibrilación auricular cuando la cantidad del biomarcador en la muestra del sujeto está por encima de la cantidad de referencia y/o de proporcionar un diagnóstico de la ausencia de fibrilación auricular cuando la cantidad del biomarcador en la muestra del sujeto está por debajo de la cantidad de referencia. En el contexto del procedimiento mencionado anteriormente de diagnóstico de fibrilación auricular, se diagnosticará si el sujeto padece fibrilación auricular en el momento en que se ha obtenido la muestra que se va a someter a prueba. Por tanto, al contrario que con el procedimiento de diagnóstico de una fibrilación auricular reciente, se diagnosticará si el

sujeto padece fibrilación auricular continua o no. El término "fibrilación auricular" se ha definido anteriormente. En el contexto del procedimiento mencionado anteriormente, la fibrilación auricular puede ser permanente, persistente o, en particular, fibrilación auricular paroxística.

5 El término "diagnóstico de fibrilación auricular" como se usa en relación con el procedimiento mencionado anteriormente se usa para indicar que el procedimiento de acuerdo con la presente divulgación clasificará a un individuo como que tiene fibrilación auricular o, como alternativa, que no tiene fibrilación auricular. Se usa una cantidad de biomarcador IGFBP7 por encima de la cantidad de referencia para proporcionar un diagnóstico de fibrilación auricular.

10 El término "indica que el sujeto tiene fibrilación auricular" en el contexto del procedimiento mencionado anteriormente se usa para ilustrar que una cantidad de IGFBP7 por encima de la cantidad de referencia es muy valiosa pero no es diagnóstica sin error. No en todos (100 %) los pacientes con fibrilación auricular la cantidad del biomarcador está por encima de la cantidad de referencia y no en todos los individuos sanos el nivel del biomarcador está por debajo del nivel de referencia. Como apreciará el experto en la técnica, en muchas enfermedades, ningún marcador bioquímico tiene un 100 % de especificidad y al mismo tiempo un 100 % de sensibilidad. En dicho caso, la evaluación, por ejemplo, con respecto al nivel de biomarcador IGFBP7 en la fibrilación auricular, se realiza con determinada verosimilitud, por ejemplo, a un nivel dado de especificidad o a un nivel dado de sensibilidad. El experto en la técnica está completamente familiarizado con los procedimientos matemáticos/estadísticos usados para calcular la especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, valor de referencia o error total. Cualquiera de estos parámetros se puede calcular y usar para obtener una indicación de la presencia o ausencia de fibrilación auricular.

La frase "proporcionar un diagnóstico" como se usa en el presente documento en relación con lo mencionado anteriormente se refiere al uso de la información o datos generados en relación con el nivel o presencia de IGFBP7 en una muestra de un paciente para diagnosticar fibrilación auricular en el paciente. La información o datos pueden estar en cualquier forma, escrita, oral o electrónica. En algunos modos de realización, el uso de la información o los datos generados incluye comunicación, presentación, notificación, almacenamiento, envío, transferencia, suministro, transmisión, distribución o combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, comunicación, presentación, notificación, almacenamiento, envío, transferencia, suministro, transmisión, distribución o combinaciones de los mismos se realizan por un dispositivo informático, unidad analizadora o una combinación de los mismos. En algunos otros modos de realización, comunicación, presentación, notificación, almacenamiento, envío, transferencia, suministro, transmisión, distribución o combinaciones de los mismos se realizan por un profesional de laboratorio o médico. En algunos modos de realización, la información o datos incluyen una comparación del nivel de IGFBP7 con un nivel de referencia. En algunos modos de realización, la información o datos incluyen una indicación de que al paciente se le diagnostica fibrilación auricular.

El término "sujeto" como se usa en relación con el procedimiento mencionado anteriormente se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y, más preferentemente, seres humanos. El sujeto puede ser hombre (en particular un hombre que sea mayor de 60 o 65 años). Además, el sujeto puede ser mujer (en particular, una mujer que sea mayor de 60 o 65 años).

El sujeto de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente de diagnóstico de fibrilación auricular será sospechoso de padecer fibrilación auricular paroxística. Un sujeto sospechoso de padecer fibrilación auricular paroxística, preferentemente, es un sujeto que tiene uno o más factores de riesgo de fibrilación auricular. Estos factores de riesgo son bien conocidos en la técnica e incluyen cardiopatía, incluyendo problemas valvulares y antecedentes de infarto de miocardio y cirugía cardíaca, hipertensión sistémica, en especial si no está bien controlada con cambios en el estilo de vida o medicamentos, y consumo de alcohol. Preferentemente, el sujeto sospechoso pertenece a un grupo de riesgo. En particular, se prevé que el sujeto sea un sujeto con trastornos cardíacos probados o sospechosos, incluyendo sujetos que tienen factores de riesgo que predisponen a trastornos cardíacos tales como hipertensión arterial o sistémica, diabetes *mellitus*, fumadores, individuos con hiperlipemia o signos del síndrome metabólico, en particular si el sujeto está en edad avanzada (más de 60, 65, 70 y preferentemente más de 75 u 80 años). De forma alternativa o adicional, el sujeto puede, preferentemente, padecer trastornos valvulares, preferentemente trastornos de la válvula mitral.

En un modo de realización del procedimiento de la presente divulgación, el sujeto padece hipertensión y/o insuficiencia cardíaca. Los términos "hipertensión" e "insuficiencia cardíaca" se definieron anteriormente. Las definiciones se aplican en consecuencia. En un modo de realización preferente, el sujeto padece insuficiencia cardíaca clasificada como insuficiencia cardíaca en fase A o fase B de acuerdo con la clasificación ACC/AHA (como se hace referencia anteriormente). En un modo de realización preferente particular de la presente divulgación, el sujeto que se va a someter a prueba se clasifica como sujeto de fase A (de acuerdo con la clasificación ACC/AHA como se hace referencia anteriormente).

En un modo de realización del procedimiento de diagnóstico de una fibrilación auricular (continua), el sujeto preferentemente no tiene antecedentes conocidos de fibrilación auricular. En consecuencia, al sujeto no se le habrá diagnosticado que padece fibrilación auricular previamente, en particular por medios convencionales. El término "muestra" se ha definido anteriormente. En un modo de realización, la muestra es una muestra de sangre, suero o

plasma.

Al contrario que con el procedimiento de diagnóstico de una fibrilación auricular paroxística reciente, se prevé que la fibrilación auricular se produzca en relación con apoplejía. Por tanto, el sujeto que se va a someter a prueba puede padecer apoplejía en el momento en que se obtiene la muestra o puede tener antecedentes de apoplejía. Preferentemente, un sujeto que tiene antecedentes de apoplejía ha padecido apoplejía dentro de los tres meses antes de que se haya obtenido la muestra que se va a someter a prueba. Más preferentemente, un sujeto que tiene antecedentes de apoplejía ha padecido apoplejía dentro de un mes para la obtención de la muestra.

Una definición para el marcador IGFBP7 (proteína de unión al factor insulínico de crecimiento 7) se ha dado anteriormente.

Cómo determinar la cantidad de un biomarcador se ha descrito en relación con el procedimiento de diagnóstico de una fibrilación auricular paroxística reciente. La cantidad de IGFBP7 se puede determinar en consecuencia.

El término "cantidad de referencia" en relación con el procedimiento mencionado anteriormente se refiere a un valor predeterminado. En este contexto, "cantidad" engloba la cantidad absoluta, la cantidad relativa o concentración así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona con la misma o se pueda derivar de la misma. Como apreciará el experto en la técnica, la cantidad de referencia se predetermina y se establece para cumplir los requisitos de rutina en términos de, por ejemplo, especificidad y/o sensibilidad. Estos requisitos pueden variar, por ejemplo, de organismo regulador a organismo regulador. Puede ser, por ejemplo, que la sensibilidad o especificidad de ensayo, respectivamente, se deba establecer en determinados límites, por ejemplo, 80 %, 90 %, 95 % o 98 %, respectivamente. Estos requisitos también se pueden definir en términos de valores predictivos positivos o negativos. No obstante, en base a la enseñanza dada en la presente divulgación, siempre será posible que un experto en la técnica llegue a la cantidad de referencia que cumpla esos requisitos. En un modo de realización, la cantidad de referencia se determina en muestras de referencia de individuos sanos. La cantidad de referencia en un modo de realización se ha predeterminado en muestras de referencia de la entidad de enfermedad a la que pertenece el paciente. En determinados modos de realización, la cantidad de referencia se puede establecer, por ejemplo, en cualquier porcentaje entre un 25 % y un 75 % de la distribución global de los valores en una entidad de enfermedad investigada. En otros modos de realización, la cantidad de referencia se puede establecer, por ejemplo, en la mediana, terciles o cuartiles, como se determina a partir de la distribución global de los valores en muestras de referencia de una entidad de enfermedad investigada. En un modo de realización, la cantidad de referencia se establece en valor de mediana como se determina a partir de la distribución global de los valores en una entidad de enfermedad investigada. La cantidad de referencia puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos tales como edad, sexo o subpoblación, así como de los medios usados para la determinación de IGFBP7 al que se hace referencia en el presente documento. En un modo de realización, la muestra de referencia es esencialmente del mismo tipo de fuente de células, tejido, órgano o líquido corporal que la muestra del individuo o paciente sometido al procedimiento de divulgación, por ejemplo, si de acuerdo con la divulgación se usa sangre como muestra para determinar la cantidad de IGFBP7 en el individuo, la cantidad de referencia también se determina en sangre o una parte de la misma.

En un modo de realización, la cantidad de referencia es una cantidad (predeterminada) que permite diferenciar entre un sujeto que padece fibrilación auricular y un sujeto que no padece fibrilación auricular.

Una cantidad de referencia preferente para IGFBP7 está dentro de un intervalo de 70 a 115 ng/ml, o más preferentemente en el intervalo de 80 a 90 ng/ml. Una cantidad de referencia en particular preferente es de 90 ng/ml.

En determinados modos de realización, el término "por encima del nivel de referencia" se refiere a un nivel del biomarcador en la muestra del individuo o paciente por encima del nivel de referencia o a un incremento global de un 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más, determinado por los procedimientos descritos en el presente documento, en comparación con el nivel de referencia. En determinados modos de realización, el término incremento se refiere al incremento en el nivel de biomarcador en la muestra del individuo o paciente en el que el incremento es al menos aproximadamente 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 o 100 veces mayor en comparación con el nivel de referencia, por ejemplo predeterminado de una muestra de referencia.

En determinados modos de realización, el término "disminución" o "por debajo de" en el presente documento se refiere a un nivel del biomarcador en la muestra del individuo o paciente por debajo del nivel de referencia o a una reducción global de un 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, determinado por los procedimientos descritos en el presente documento, en comparación con el nivel de referencia. En determinados modos de realización, el término disminución en el nivel de biomarcador en la muestra del individuo o paciente en el que la disminución en el nivel es como máximo aproximadamente 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, o 0,01 veces el nivel de referencia, por ejemplo predeterminado de una muestra de referencia, o menor.

En un modo de realización preferente del procedimiento mencionado anteriormente, comprende además la determinación de la cantidad de un péptido de tipo BNP, y la comparación de la cantidad así determinada con una

cantidad de referencia (para dicho péptido de tipo BNP).

En consecuencia, también se describe un procedimiento para diagnosticar fibrilación auricular en un sujeto, que comprende

(a) determinar la cantidad de IGFBP7 y un péptido de tipo BNP en una muestra del sujeto, y

(b) comparar las cantidades como se determinan en la etapa (a) con cantidades de referencia (es decir, con una cantidad de referencia para IGFBP7 y con una cantidad de referencia para dicho péptido de tipo BNP).

Preferentemente, una cantidad del biomarcador IGFBP7 en la muestra del sujeto por encima de la cantidad de referencia y una cantidad de dicho péptido de tipo BNP por encima de la cantidad de referencia indica que el sujeto tiene fibrilación auricular. También preferentemente, una cantidad del biomarcador IGFBP7 en la muestra del sujeto por debajo de la cantidad de referencia y una cantidad del péptido de tipo BNP en la muestra del sujeto por debajo de la cantidad de referencia indica que el sujeto no tiene fibrilación auricular.

De acuerdo con este procedimiento, una cantidad de referencia preferente para NT-proBNP está dentro de un intervalo de 200 a 500 ng/l, o más preferentemente en el intervalo de 300 a 400 ng/l. Una cantidad de referencia en particular preferente es de 400 ng/l.

El término "péptido de tipo BNP" se ha definido anteriormente. La definición se aplica en consecuencia. En un modo de realización, el péptido de tipo BNP es NT-proBNP.

En un modo de realización preferente del procedimiento mencionado anteriormente, el procedimiento comprende además la etapa de recomendar un tratamiento adecuado para el tratamiento de fibrilación auricular. Dicho tratamiento puede comprender cualquier tratamiento conocido en la técnica que se usa para el tratamiento de fibrilación auricular continua. Preferentemente, dicho tratamiento pretende (i) terminar dicha fibrilación auricular tal como cardioversión eléctrica o cardioversión con un agente antiarrítmico o (ii) tratamiento anticoagulante.

El término "tratamiento anticoagulante" se ha definido anteriormente. Los agentes antiarrítmicos preferentes también se describen anteriormente.

Además, también se describe un procedimiento de tratamiento de un paciente con un tratamiento adecuado para el tratamiento de fibrilación auricular, comprendiendo el procedimiento:

(a) determinar la cantidad de IGFBP7 y, opcionalmente, de un péptido de tipo BNP en una muestra del sujeto, y

(b) comparar la cantidad (o las cantidades) como se determina en la etapa (a) con una cantidad de referencia (o con cantidades de referencia), y

(c) seleccionar y/o iniciar un tratamiento adecuado para el tratamiento de fibrilación auricular cuando la cantidad de IGFBP7 (o las cantidades de IGFBP7 y el péptido de tipo BNP) está por encima de la cantidad de referencia (están por encima de las cantidades de referencia).

El procedimiento al que se hace referencia anteriormente, puede comprender además la etapa (b1) de identificar un sujeto como que padece fibrilación auricular cuando la cantidad de IGFBP7 (o las cantidades de IGFBP7 y el péptido de tipo BNP) está por encima de la cantidad de referencia (están por encima de las cantidades de referencia).

La presente divulgación se refiere además al uso de i) IGFBP7 y, opcionalmente, un péptido de tipo BNP o ii) de un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7 y, opcionalmente, de un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo BNP en una muestra de un sujeto para diagnosticar fibrilación auricular, en particular una fibrilación auricular continua, en dicho sujeto.

La presente divulgación se refiere además al uso de i) IGFBP7 y, opcionalmente, un péptido de tipo BNP o de ii) un agente de detección que se une específicamente a IGFBP7 y, opcionalmente, de un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo BNP para la fabricación de una composición de diagnóstico para diagnosticar fibrilación auricular. Preferentemente, una cantidad del biomarcador IGFBP7 en la muestra del sujeto por encima de la cantidad de referencia (y, opcionalmente, una cantidad de dicho péptido de tipo BNP por encima de la cantidad de referencia) indica que el sujeto tiene fibrilación auricular. También preferentemente, una cantidad del biomarcador IGFBP7 en la muestra del sujeto por debajo de la cantidad de referencia (y, opcionalmente, una cantidad del péptido de tipo BNP en la muestra del sujeto por debajo de la cantidad de referencia) indica que el sujeto no tiene fibrilación auricular.

De acuerdo con un modo de realización preferente de la presente divulgación, se proporciona un dispositivo adaptado para diagnosticar fibrilación auricular continua que comprende

(a) una unidad analizadora que comprende un agente de detección que se une específicamente a IGFBP (y opcionalmente un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo BNP), estando adaptada dicha unidad para determinar la(s) cantidad(es) del/de los marcador(es) en una muestra; y

5 (b) una unidad analizadora para comparar la(s) cantidad(es) determinada(s) con la(s) cantidad(es) de referencia, con lo que se diagnostica una fibrilación auricular continua, comprendiendo dicha unidad una base de datos con una cantidad de referencia (cantidades de referencia) y un algoritmo implementado por ordenador que lleva a cabo la comparación como se expone en el presente documento en otra parte.

10 El término "dispositivo" se ha definido en otra parte en el presente documento. El término "agente de detección" se ha especificado en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, el agente es un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al marcador (es decir, IGFBP y el péptido de tipo BNP, respectivamente).

15 Los siguientes ejemplos ilustrarán simplemente la invención. No se deben interpretar, en absoluto, como que limitan el alcance de la invención.

Ejemplo 1: cohorte de pacientes

20 Se han determinado los niveles de TnT-hs, IL-6, NT-proBNP y hsCRP en muestras de plasma de n = 46 pacientes con sangre muestreada y biomarcadores analizados, en ritmo sinusal (RS) en la visita de los 12 meses. Todos los pacientes tienen ≥ 1 recaída de fibrilación auricular desde la aleatorización hasta la visita de los 12 meses. Los 46 pacientes se convirtieron espontáneamente a ritmo sinusal.

25 • 0-7 días después de fibrilación auricular paroxística (FA); n=9 pacientes

• 8-30 días después de FA paroxística; n=10 pacientes

Ejemplo 2: ensayos

30 Se determinó la troponina T usando el ensayo Elecsys Troponin T hs (de alta sensibilidad) con STAT (tiempo de obtención breve) con ELISA de electroquimioluminiscencia de tipo *sandwich* de Roche. La prueba emplea dos anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente frente a troponina T cardíaca humana. Los anticuerpos reconocen dos epítomos (posición aminoacídica 125-131 y 136-147) localizados en la parte central de la proteína troponina T cardíaca, que consiste en 288 aminoácidos. El ensayo hs-TnT permite una medición de niveles de troponina T en el intervalo de 3 a 10000 pg/ml.

35 Se determinó NT-proBNP usando el ensayo Elecsys proBNP II STAT (tiempo de obtención breve) con ELISA de electroquimioluminiscencia de tipo *sandwich* de Roche. La prueba emplea dos anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos localizados en la parte N terminal (1-76) de proBNP (1-108).

40 Se midió IL-6 (interleucina 6) por un inmunoanálisis electroquimioluminiscente (ECLIA, Roche Diagnostics). Se realizó la prueba usando un analizador Cobas E601 de Roche Diagnostics. La prueba se basa en una primera incubación con un anticuerpo específico de IL-6 monoclonal biotilado y una segunda incubación con un anticuerpo específico de IL-6 monoclonal marcado con un complejo de rutenio y micropartículas recubiertas de estreptavidina.

45 Se determinó la CRP de alta sensibilidad (hs) usando un ensayo inmunoturbidimétrico potenciador de partículas de Roche Diagnostics (Tina-quant Cardiac C-reactive Protein (Latex) High Sensitive). En esta prueba, los anticuerpos anti-CRP acoplados a micropartículas de látex reaccionan con el antígeno en la muestra para formar un complejo antígeno/anticuerpo. Después de la aglutinación, se mide el complejo turbidimétricamente.

Ejemplo 3: resultados

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

55

días después de fibrilación auricular paroxística	hsTnT (pg/ml)	Nt-proBNP	hsCRP mg/l	IL-6 pg/ml
0-7 (n=6)	8,37	191	4,20	2,21
8-30 (n=10)	6,51	58	4,35	2,04

60 La evaluación de los datos mostró que los pacientes con niveles de TnT-hs (independientes de otro biomarcador) por encima de un valor de referencia (*en el estudio > 6 pg/ml*) son sospechosos de tener fibrilación auricular paroxística y se pueden beneficiar de la anticoagulación. Incluso se muestra que se pueden detectar niveles de TnT-hs en pacientes que presentan de 7-30 días después ritmo sinusal. Otros marcadores tales como hsCRP muestran una cinética ligeramente diferente después de la terminación espontánea de fibrilación auricular y, por tanto, pueden ayudar

individualmente y/o en combinación a la detección de episodios pasados de fibrilación auricular paroxística.

Por tanto, el diagnóstico de aparición reciente de fibrilación auricular paroxística en pacientes que presentan dentro de los 7-30 días después ritmo sinusal se puede lograr con la detección de la potenciación en los niveles de troponina T sola o en combinación con un marcador de inflamación (CRPhs, IL6) y/o un marcador de insuficiencia cardíaca (NT-proBNP).

Ejemplo 4: determinación de IGFBP7 y NT-proBNP en sujetos con fibrilación auricular continua.

Se determinó IGFBP7 en muestras de plasma de 49 sujetos ancianos aparentemente sanos. De estos 49 sujetos, 17 se presentaron con un episodio de FA detectado por ECG en visita clínica. Se determinó NT-proBNP en muestras de plasma de 139 sujetos ancianos aparentemente sanos. De estos 139 sujetos, 45 se presentaron con un episodio de FA detectado por ECG en visita clínica. 28 / 82 controles emparejados por sexo y edad se presentaron sin un episodio de FA en ECG.

Se ha determinado NT-proBNP como se describe anteriormente. Para la detección de IGFBP7 en muestras humanas, se usó un ELISA de tipo *sandwich*. Para la captura y detección del antígeno, se conjugaron alícuotas de un anticuerpo policlonal anti-IGFBP7 de R&D Systems (número de catálogo: AF 1334) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Marcador	Fibrilación auricular continua en ECG				p*
	Sí		NO		
	N	Mediana [Q1-Q3]	N	Mediana [Q1-Q3]	
NT-proBNP (ng/l)	58	582 [192-1014]	81	165 [90-371]	0,0004
IGFBP7 (ng/ml)	17	90 [65-116]	28	66,5 [61-86,5]	0,0271
* P ajustado para sexo y edad					

Se compararon los niveles de biomarcadores en sujetos que presentaron o no un episodio de FA detectado por ECG. Como se puede deducir de la tabla, NT-proBNP e IGFBP7 se encontraron significativamente mayores en sujetos con una FA continua.

Ejemplo 5: casos individuales

Una paciente de 71 años con insuficiencia cardíaca de clase A tiene un IMC por debajo de 30 kg/m² e hipertensión. La paciente no tiene antecedentes de apoplejía. La paciente presenta ritmo sinusal. Se determinan troponina T, interleucina 6 y Nt-ProBNP en una muestra de plasma obtenida de la paciente. El valor de troponina T está por debajo de 6 pg/ml, el valor de interleucina 6 está por debajo de 1,5 pg/ml y el valor de Nt-ProBNP está por debajo de 125 pg/ml. La evaluación de los datos es indicativa de que el paciente no ha tenido episodios recientes de fibrilación auricular paroxística en la última semana.

Un paciente masculino de 69 años con insuficiencia cardíaca de clase A tiene un IMC por debajo de 30 kg/m² e hipertensión. El paciente presenta ritmo sinusal. Se determinan troponina T, proteína C-reactiva y Nt-ProBNP en una muestra de plasma obtenida de la paciente. El valor de troponina T está por debajo de 6 pg/ml, el valor de proteína C-reactiva está entre 1 y 3 mg/l y el valor de Nt-ProBNP está por debajo de 125 pg/ml. La evaluación de los datos es indicativa de que el paciente no ha tenido episodios pasados de fibrilación paroxística hasta 7-30 días antes. Se informa al paciente de que vuelva para una visita de seguimiento a los 12 meses o si los síntomas empeoran. Después de 12 meses, el paciente acude a una visita de seguimiento. Se determinan troponina T, proteína C-reactiva y Nt-ProBNP en una muestra de plasma obtenida de la paciente. El valor de troponina T está por encima de 6 pg/ml, el valor de proteína reactiva C está por encima de 3 mg/l y el valor de Nt-ProBNP está por encima de 125 pg/ml. La evaluación de los datos es indicativa de que el paciente ha tenido episodios pasados de fibrilación paroxística hasta 7-30 días antes y se puede beneficiar de la anticoagulación.

Un paciente masculino de 68 años con insuficiencia cardíaca de clase B tiene un IMC por encima de 30 kg/m² e hipertensión. El paciente presenta ritmo sinusal. Se determinan troponina T, proteína C-reactiva y Nt-ProBNP en una muestra de plasma obtenida de la paciente. El valor de troponina T está por encima de 6 pg/ml, el valor de CRP está por encima de 3 mg/l y el valor de Nt-ProBNP está por encima de 125 pg/ml. Los incrementos en las cantidades de los marcadores) en comparación con la(s) cantidad(es) de referencia indican que el sujeto padece episodios pasados de fibrilación auricular paroxística hasta hace 7-30 días. Este ejemplo demuestra que la determinación de troponina T sola o en combinación con otros marcadores es adecuada para detectar pacientes que se pueden beneficiar de la anticoagulación debido al diagnóstico de fibrilación auricular paroxística.

Una paciente de 76 años con insuficiencia cardíaca de clase A no tiene antecedentes de fibrilación auricular. La

5 paciente presenta ritmo sinusal. Se determinan troponina T, interleucina 6, Nt-ProBNP e IGFBP-7 en una muestra de plasma obtenida de la paciente. El valor de troponina T está por encima de 6 pg/ml, el valor de interleucina 6 está por encima de 1,5 pg/ml, el valor de Nt-ProBNP está por encima de 125 pg/ml y el valor de IGFBP-7 está por encima de 80 ng/ml. La evaluación de los datos es indicativa de que el paciente ha tenido episodios recientes de fibrilación auricular paroxística en los últimos días y se puede beneficiar del tratamiento preventivo.

Conclusiones:

10 Los datos del estudio subyacente a la presente invención indican que las troponinas cardíacas pueden ser un marcador útil para diagnosticar la aparición de una fibrilación auricular paroxística reciente. TnT-hs es un biomarcador soluble que se libera del corazón a la circulación sanguínea durante la fibrilación auricular y los datos muestran que es detectable durante varios días, antes de que disminuya después de una arritmia que se remonta a aproximadamente una semana. Se muestra un patrón similar para hsCRP, NT-proBNP e IL-6 y, por tanto, estos marcadores pueden
15 ayudar solos o en combinación en la detección de fibrilación auricular paroxística de hasta un mes después de la terminación espontánea de fibrilación auricular.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente en un sujeto, que comprende:
- 5 (a) determinar la cantidad del marcador troponina cardíaca en una muestra del sujeto que no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra, y
- (b) comparar la cantidad así determinada de dicho marcador con una cantidad de referencia, con lo que se diagnostica una fibrilación auricular paroxística reciente,
- 10 en el que la fibrilación auricular terminó espontáneamente, y en el que la fibrilación auricular paroxística reciente se produjo dentro de 1 a 30 días, en particular dentro de 1 a 7 días, antes de que se haya obtenido la muestra.
2. Un procedimiento para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente en un sujeto, que comprende:
- 15 (a) determinar la cantidad de un péptido de tipo BNP en una muestra del sujeto que no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra, y
- (b) comparar la cantidad así determinada de dicho péptido de tipo BNP con una cantidad de referencia, con lo que se diagnostica una fibrilación auricular paroxística reciente,
- 20 en el que la fibrilación auricular terminó espontáneamente, y en el que la fibrilación auricular paroxística reciente se produjo dentro de 1 a 7 días antes de que se haya obtenido la muestra.
3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la fibrilación auricular paroxística reciente no se produjo en relación con una apoplejía, en particular en el que el sujeto no tiene antecedentes de apoplejía.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra es una muestra de sangre, suero o plasma.
- 30 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sujeto es humano.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cantidad de referencia es una cantidad de referencia calculada, y en el que un incremento en la cantidad del marcador en comparación con la cantidad de referencia es indicativo para el diagnóstico de una fibrilación auricular paroxística reciente, y/o en el que una disminución en la cantidad del marcador en comparación con la cantidad de referencia indica que el sujeto no padeció fibrilación auricular paroxística recientemente.
- 35 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cantidad de referencia se deriva del sujeto o grupo de sujetos que se sabe que han padecido una fibrilación auricular paroxística reciente, en particular, en el que esencialmente la misma cantidad o un incremento en la cantidad del marcador en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia es indicativo para el diagnóstico de una fibrilación auricular paroxística reciente, y/o en el que la cantidad de referencia se deriva de un sujeto o grupo de sujetos que se sabe que no han padecido una fibrilación auricular paroxística reciente, en particular, en el que esencialmente la misma cantidad o una
- 40 disminución en la cantidad del marcador en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia indica que el sujeto no padeció fibrilación auricular paroxística recientemente.
- 45 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se determinan las cantidades de una troponina cardíaca y de un péptido de tipo BNP, en particular de NT-proBNP, y en el que se diagnostica si el sujeto ha padecido fibrilación auricular paroxística dentro de un período de una semana antes de que se haya obtenido la muestra.
- 50 9. Un procedimiento para identificar a un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante, que comprende:
- 55 (a) determinar la cantidad del marcador troponina cardíaca en una muestra de un sujeto que es sospechoso de haber padecido fibrilación auricular paroxística dentro de 1 a 30 días, en particular dentro de 1 a 7 días, antes de que se haya obtenido la muestra, y
- (b) comparar la cantidad así determinada de dicho marcador con una cantidad de referencia, con lo que se identifica un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante,
- 60 en el que el sujeto no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra, y en el que la fibrilación auricular terminó espontáneamente.
- 65 10. Un procedimiento para identificar a un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante, que comprende:

- (a) determinar la cantidad de un péptido de tipo BNP en una muestra de un sujeto que es sospechoso de haber padecido fibrilación auricular paroxística dentro de 1 a 7 días antes de que se haya obtenido la muestra, y
- 5 (b) comparar, por tanto, la cantidad determinada de dicho péptido de tipo BNP con una cantidad de referencia, con lo que se identifica un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante,
- en el que el sujeto no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra, y en el que la fibrilación auricular terminó espontáneamente.
- 10 11. El procedimiento de la reivindicación 9 o 10, en el que el tratamiento anticoagulante se selecciona de heparina, un derivado de cumarina, tal como warfarina o dicumarol, inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), antitrombina III, inhibidores del factor IXa, inhibidores del factor Xa, inhibidores de los factores Va y VIIIa, inhibidores de trombina.
- 15 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la cantidad de referencia es una cantidad de referencia calculada, y en el que un incremento en la cantidad de la troponina cardíaca o el péptido de tipo BNP en comparación con la cantidad de referencia es indicativo de un sujeto sensible al tratamiento anticoagulante, y/o en el que una disminución en la cantidad del marcador en comparación con la cantidad de referencia indica que el sujeto no es sensible al tratamiento anticoagulante.
- 20 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la cantidad de referencia se deriva de (i) un sujeto o grupo de sujetos que son sensibles al tratamiento anticoagulante, en particular, en el que esencialmente la misma cantidad o un incremento en la cantidad del marcador en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia es indicativo de que un sujeto es sensible al tratamiento anticoagulante, y/o en el que la cantidad de referencia se deriva de (ii) un sujeto o grupo de sujetos que se sabe que no son sensibles al tratamiento
- 25 anticoagulante, en particular, en el que esencialmente la misma cantidad o una disminución en la cantidad del marcador en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de referencia indica que el sujeto no es sensible al tratamiento anticoagulante.
- 30 14. Uso de i) una troponina cardíaca o ii) de un agente de detección que se une específicamente a una troponina cardíaca, en una muestra de un sujeto para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente que se produjo dentro de 1 a 30 días, en particular dentro de 1 a 7 días, antes de que se haya obtenido la muestra, o para identificar a un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante, en el que el sujeto no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra, y en el que la fibrilación auricular terminó espontáneamente.
- 35 15. Uso de i) un péptido de tipo BNP o ii) de un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo BNP, en una muestra de un sujeto para diagnosticar una fibrilación auricular paroxística reciente que se produjo dentro de 1 a 7 días, antes de que se haya obtenido la muestra del sujeto, o para identificar a un sujeto que es sensible al tratamiento anticoagulante, en el que el sujeto no padece fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra, y en el que la fibrilación auricular terminó espontáneamente.