

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 321**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2018** **PCT/EP2018/065503**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2018** **WO18229051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2018** **E 18729158 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2023** **EP 3639035**

54 Título: **Proteína 3 de unión a ácidos grasos para la evaluación de fibrilación auricular (FA)**

30 Prioridad:

13.06.2017 EP 17175672

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

21.11.2023

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)
Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH y

MAASTRICHT UNIVERSITY MEDICAL CENTER
(50.0%)

72 Inventor/es:

KARL, JOHANN;
KASTNER, PETER;
ROLNY, VINZENT;
WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE;
DIETRICH, MANUEL;
ZIEGLER, ANDRÉ y
SCHOTTEN, ULI

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 954 321 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

Proteína 3 de unión a ácidos grasos para la evaluación de fibrilación auricular (FA)

La presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar la fibrilación auricular paroxística en un sujeto, que comprende: determinar la cantidad de FABP-3 (proteína 3 de unión a ácidos grasos) en una muestra de un sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular paroxística y comparar la cantidad determinada con una cantidad de referencia. El procedimiento de la presente invención puede comprender además la determinación de un péptido de tipo BNP.

La fibrilación auricular paroxística se define como episodios recurrentes de fibrilación auricular (FA) que terminan espontáneamente en menos de siete días, normalmente menos de 24 horas. Puede ser autolimitada o bien intermitente. La FA paroxística es frecuente (un 5-10 % de los sujetos de edad avanzada (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 mayor riesgo de apoplejía sin la administración de tratamiento anticoagulante. El diagnóstico de arritmia cardíaca, tal como fibrilación auricular, típicamente implica la determinación de la causa de la arritmia y la clasificación de la arritmia. El tratamiento de referencia para detectar la FA es el electrocardiograma (ECG), preferentemente realizado como ECG de 24 horas (monitorización Holter). Sin embargo, la monitorización Holter solo puede detectar FA si la arritmia se produce durante el período de 24 horas de registro del ECG. Por tanto, la FA paroxística con frecuencia no se detecta mediante la monitorización Holter.

Diversas publicaciones científicas tratan sobre la asociación de biomarcadores a niveles potenciados con la fibrilación auricular (revisado en: Biomarkers in Atrial Fibrillation: Investigating Biologic Plausibility, Cause, and Effect R. Becker Journal of Thrombosis and Thrombolysis 19(1), 71-75, 2005).

La determinación de NT-proBNP permite evaluar la alteración de la función sistólica. Además, los ensayos de troponina de alta sensibilidad permiten la detección de lesión cardíaca asintomática. Se ha descrito que niveles elevados tanto de troponina T y como de NT-proBNP predicen independientemente un mayor riesgo de una primera recaída de la FA después de 6 o 12 meses (Circulating cardiovascular biomarkers in recurrent atrial fibrillation: data from the GISSI-Atrial Fibrillation Trial, R. Latini *et al.*, JInternMed2011; 269:160-171). Se ha descrito además, que los pacientes se pueden seleccionar en función de los niveles de proteína cardíaca, troponina T y NT-proBNP para diagnosticar la FA paroxística que se ha producido antes y se remonta incluso a aproximadamente 1 semana y para seleccionar a los pacientes que puedan beneficiarse de tratamiento anticoagulante (documento WO 2014/072500).

El biomarcador FABP-3 (proteína 3 de unión a ácidos grasos), también conocido como proteína de unión a ácidos grasos de tipo cardíaco (H-FABP), se ha sugerido como un marcador temprano de infarto de miocardio. FABP-3 es una proteína citoplasmática de bajo peso molecular, FABP-3 humana es un polipéptido de 132 aminoácidos y 14,8 kDa, y que está presente en abundancia en el miocardio. Cuando se lesiona el miocardio, como en el caso del infarto de miocardio, se liberan a la circulación proteínas citoplasmáticas de bajo peso molecular, incluyendo FABP-3, y se puede detectar un nivel elevado de FABP-3 en una muestra de sangre (véase, por ejemplo, Ruzgar *et al.*, Heart Vessels, 21; 209-314 (2006). Otros nombres para FABP-3 y H-FABP son: FABP-11 (proteína 11 de unión a ácidos grasos), M-FABP (proteína muscular de unión a ácidos grasos), MDGI (inhibidor del crecimiento derivado de glándula mamaria) y O-FABP.

Se observaron niveles elevados de FABP-3 circulante en pacientes con fibrilación auricular (FA) en curso en comparación con pacientes en ritmo sinusal (Otaki *et al.*, Internal Medicine, (2014) Vol. 53, n.º 7, pág. 661-8).

Se observó que los niveles circulantes elevados de FABP-3 estaban asociados con acontecimientos postoperatorios de FA (Sezai *et al.*, Carperitide and Atrial Fibrillation after Coronary Bypass Grafting: The Nihon University Working Group Study of Low-Dose HANP Infusion Therapy during Cardiac Surgery Trial for Postoperative Atrial Fibrillation. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology, (4 de junio de 2015) Vol. 8, n.º 3, pág. 546-553).

Un nivel incrementado de FABP-3 se asoció con FA después de cirugía cardíaca, lo que sugiere que el daño miocárdico isquémico es un mecanismo subyacente contribuyente (Rader *et al.*, Perioperative heart-type fatty acid binding protein levels in atrial fibrillation after cardiac surgery. Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society, (2013) Vol. 10, n.º 2, pág. 153-7).

Yang *et al.* describen el uso combinado de un beta-bloqueante y el fármaco antiisquémico trimetazidina. Las directrices de 2016 indican que se puede considerar la trimetazidina para el tratamiento de la angina de pecho estable con ICFer sintomática, cuando la angina persiste a pesar del tratamiento con un beta-bloqueante (o alternativo), para aliviar la angina (tratamiento antianginoso eficaz, seguro en la IC). Esta recomendación se basa en el conjunto de pruebas que sugieren que la trimetazidina puede mejorar la capacidad funcional según la NYHA, la duración del ejercicio y la función del VI en pacientes con ICFer. No existe una recomendación para la trimetazidina en el contexto de IC sola. (Yang *et al.* Efficacy of metoprolol in combination with trimetazidine in

patients with atrial fibrillation and its effects on serum concentrations of H-FABP. South China Journal of Cardiovascular Diseases, (2014) 20(2), 168-170). Los autores de la publicación describen el uso de trimetazidina en combinación con un beta-bloqueante en pacientes con FA con los criterios de valoración de mejora de los síntomas clínicos, reducción de las recaídas de FA y niveles reducidos de FABP3. No hay indicios de que FABP3 se asocie significativamente con FA paroxística. Varios parámetros clínicos diferentes que mejoran con estos fármacos también pueden provocar la reducción de FABP3. La trimetazidina es un fármaco antiisquémico que mejora el uso de la glucosa miocárdica a través de la inhibición del metabolismo de los ácidos grasos. FABP3 desempeña una función en el transporte citosólico de ácidos grasos de cadena larga y en la protección de los miocitos cardíacos frente a los ácidos grasos durante la isquemia. Se sugiere FABP3 como parámetro de lesión cardíaca isquémica que se correlaciona con el mecanismo del fármaco antiisquémico. Los beta-bloqueantes son fármacos antihipertensores. El bloqueo de los receptores beta reduce el gasto cardíaco y la tensión arterial, así como el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular del riñón. Los niveles elevados de FABP3 pueden deberse a una eliminación reducida debida a una alteración de la función renal. Se sugiere FABP3 como parámetro de tasa de filtración glomerular reducida que se correlaciona con el mecanismo del fármaco antihipertensor.

Los documentos US 2006/099608 y US 2007/218498 divulgan FABP-3 dentro de una lista de varios biomarcadores para el diagnóstico de afecciones vasculares.

El documento US 2011/144205 divulga la detección de pacientes asintomáticos con riesgo de insuficiencia cardíaca. FABP-3 se describe dentro de una lista de varios biomarcadores.

El documento US 2015/126385 divulga que FABP-3 puede ayudar en el diagnóstico de apoplejía isquémica.

De acuerdo con el documento US 2016/258965, FABP-3 puede ser indicativo del tiempo transcurrido desde el inicio de la apoplejía, como uno de varios trastornos cardíacos.

Se observó que los niveles circulantes elevados de FABP-3 están asociados con el riesgo de apoplejía recidivante en pacientes con antecedentes de un ataque isquémico transitorio previo (Segal *et al.* Population-based study of blood biomarkers in prediction of subacute recurrent stroke. Stroke (2014) Vol. 45, n.º 10, pág. 2912-2917).

Se observa un incremento progresivo de los niveles circulantes entre los subgrupos de pacientes con fibrilación auricular paroxística a persistente o permanente para la mayoría de los biomarcadores, incluyendo PCR (Li *et al.*, Plasma oxidative stress and inflammatory biomarkers are associated with the sizes of the left atrium and pulmonary vein in atrial fibrillation patients. Clin Cardiol (2017) 40(2), pág. 89-942017 o Kossaiy *et al.*, Perspectives of biomarkers in acute cardiac care. Biomarker Insights (2013) 8, pág.115-126).

Por tanto, se observa un incremento significativo de la mayoría de los biomarcadores de FA, tal como PCR, en fase posteriores de la fibrilación auricular.

Sin embargo, un diagnóstico temprano de fibrilación auricular y, por tanto, el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística es altamente deseado porque la fibrilación auricular es un factor de riesgo importante de apoplejía y embolia sistémica. La consecuencia más temida de la fibrilación auricular es la apoplejía (isquémica), que se produce cuando un coágulo o depósitos de grasa denominados placa en el revestimiento de los vasos sanguíneos bloquean el flujo de sangre al cerebro. Independientemente de la sintomatología, las personas con fibrilación auricular tienen un riesgo 5 veces mayor de apoplejía isquémica. Además, las apoplejías provocadas por complicaciones de la FA tienden a ser más graves que las apoplejías con otras causas subyacentes. La apoplejía provocada por fibrilación auricular da lugar a discapacidades más debilitantes y tiene una tasa de mortalidad más alta. Se estima que al menos un 30 % de todos los pacientes con apoplejía tienen fibrilación auricular, de modo que la anticoagulación oral (ACO) para la prevención de la apoplejía se ha convertido en un tratamiento común y beneficioso.

Como se puede deducir de lo anterior, la detección de la fibrilación auricular paroxística es de particular pertinencia, pero problemática. En consecuencia, existe la necesidad de métodos fiables para el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística.

El problema técnico que subyace a la presente invención se puede ver como la provisión de procedimientos para satisfacer la necesidad mencionada anteriormente. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y a continuación en el presente documento. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones y descripciones que ya no entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas se consideran simplemente como ejemplos adecuados para entender la invención.

De forma ventajosa, en el contexto de los estudios de la presente invención, se descubrió que la determinación de la cantidad de FABP-3 en una muestra de un sujeto permite el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística. A diferencia de otros varios biomarcadores de FA, FABP-3 ya está significativamente incrementada en las primeras fases de la FA. Gracias a la presente invención, por tanto, se puede evaluar si un sujeto padece fibrilación auricular paroxística o no.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar fibrilación auricular paroxística en un sujeto, que comprende:

- 5 (a) determinar la cantidad de FABP-3 (proteína 3 de unión a ácidos grasos) en una muestra de un sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular paroxística, y
- (b) comparar la cantidad determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia.

- 10 En una realización del procedimiento de la presente invención, el procedimiento comprende además la determinación de la cantidad de un péptido de tipo BNP en una muestra del sujeto en la etapa a) y la comparación de la cantidad de dicho péptido de tipo BNP con una cantidad de referencia en la etapa b).

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar fibrilación auricular paroxística en un sujeto, que comprende:

- 15 (a) determinar la cantidad de FABP-3 (proteína 3 de unión a ácidos grasos) y la cantidad de un péptido de tipo BNP en una muestra de un sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular paroxística, y
- 20 (b) comparar las cantidades determinadas en la etapa a) con cantidades de referencia.

En una realización preferente, el diagnóstico de fibrilación auricular (FA) se basa en los resultados de la etapa b) de comparación.

25 En consecuencia, la presente invención comprende preferentemente las etapas de

- a) determinar la cantidad de FABP-3 y, opcionalmente, la cantidad de un péptido de tipo BNP, en una muestra del sujeto,
- 30 b) comparar la cantidad de FABP-3 con una cantidad de referencia (para dicho marcador) y, opcionalmente, comparar la cantidad del péptido de tipo BNP con una cantidad de referencia (para dicho marcador) y
- c) diagnosticar fibrilación auricular en función de los resultados de la etapa b) de comparación.

- 35 El procedimiento como se hace referencia de acuerdo con la presente invención incluye un procedimiento que consiste esencialmente en las etapas mencionadas anteriormente o un procedimiento que incluye otras etapas. Además, el procedimiento de la presente invención es preferentemente un procedimiento *ex vivo* y más preferentemente un procedimiento *in vitro*. Asimismo, puede comprender etapas además de las mencionadas de forma explícita anteriormente. Por ejemplo, el diagnóstico de FA se puede basar además en la evaluación de
- 40 registros de ECG intermitentes obtenidos de dicho sujeto durante un período de al menos una semana usando un dispositivo de ECG portátil (como se describe con detalle en otra parte en el presente documento). Además, se pueden relacionar otras etapas con la determinación de otros marcadores y/o con pretratamientos de muestra o evaluación de los resultados obtenidos por el procedimiento. El procedimiento se puede llevar a cabo de forma manual o automática. Preferentemente la etapa (a), (b) y/o (c) puede estar asistida total o parcialmente por
- 45 automatización, por ejemplo, por un equipo robótico y sensorial adecuado para la determinación en la etapa (a) o un cálculo implementado por ordenador en la etapa (b).

- Preferentemente, el término "diagnosticar", como se usa en el presente documento, preferentemente, significa evaluar si un sujeto al se hace referencia de acuerdo con el procedimiento de la presente invención padece
- 50 fibrilación auricular (FA) paroxística o no. Por ejemplo, el término se refiere a la evaluación de la probabilidad de que el sujeto padezca o no FA paroxística. Por tanto, se evalúa si un sujeto tiene una probabilidad baja o alta de padecer FA. Un sujeto al que se le diagnostica que padece FA paroxística tendrá una alta probabilidad de padecer FA paroxística (tal como una probabilidad de aproximadamente un 80 % o más). Un sujeto al que se le diagnostica que no padece FA paroxística tendrá una baja probabilidad de padecer FA paroxística (tal como una probabilidad de aproximadamente un 15 % o menos de un 15 %). En consecuencia, la expresión "diagnosticar fibrilación
- 55 auricular paroxística", como se usa en el presente documento, se entenderá como "ayudar" o "asistir" en el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística. Por ejemplo, se puede asistir a un médico en el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística.

- 60 Como entenderán los expertos en la técnica, el diagnóstico de la presente invención normalmente no pretende ser correcta para un 100 % de los sujetos que se van a someter a prueba. El término "diagnosticar", preferentemente, requiere que se pueda realizar un diagnóstico correcto para una proporción estadísticamente significativa de sujetos. 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
- 65 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 0,4, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

Es conocido en la técnica que los biomarcadores podrían estar incrementados en diversas enfermedades y trastornos. Esto también se aplica a FABP-3 y los péptidos de tipo BNP. Por ejemplo, es conocido que FABP-3 está incrementada en pacientes con síndrome coronario agudo, mientras que es conocido que los péptidos de tipo BNP están incrementados en pacientes con insuficiencia cardíaca. Sin embargo, esto lo tiene en cuenta el experto en la técnica.

La expresión "fibrilación auricular" ("abreviada" FA o FibA) es bien conocido en la técnica. Como se usa en el presente documento, el término se refiere preferentemente a una taquiarritmia supraventricular caracterizada por activación auricular no coordinada con la consiguiente degeneración de la función mecánica auricular. En particular, el término se refiere a un ritmo cardíaco anómalo caracterizado por latidos rápidos e irregulares. Afecta a 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 desorganizados y rápidos que dan como resultado latidos cardíacos irregulares. Los síntomas de fibrilación auricular son palpitaciones cardíacas, desmayos, disnea o dolor torácico. Sin embargo, la mayoría de los episodios no tienen síntomas. En el electrocardiograma, la fibrilación auricular se caracteriza por el reemplazo de ondas P consistentes por oscilaciones rápidas u ondas fibrilatorias que varían en amplitud, forma y tiempo, asociadas con una respuesta ventricular irregular, con frecuencia rápida, cuando la conducción auriculoventricular está intacta.

El American College of Cardiology (ACC), la American Heart Association (AHA) y la European Society of Cardiology (ESC) proponen el siguiente sistema de clasificación (véase Fuster (2006) *Circulation* 114 (7): e257-354

véase, por ejemplo, la figura 3 en el documento): FA detectada por primera vez, FA paroxística, FA persistente y FA permanente.

Todas las personas con FA inicialmente están en la categoría llamada FA detectada por primera vez. Sin embargo, el sujeto puede haber tenido o no episodios previos no detectados. Un sujeto padece FA permanente si la FA ha persistido durante más de un año. En particular, no se produce la conversión de vuelta a ritmo sinusal (o solo con intervención médica). Un sujeto padece FA persistente si la FA dura más de 7 días. El sujeto puede requerir intervención farmacológica o bien eléctrica para cesar la fibrilación auricular. Por tanto, la FA persistente se manifiesta en episodios, pero la arritmia no se convierte de vuelta a ritmo sinusal de forma espontánea. La fibrilación auricular paroxística se refiere preferentemente a un episodio intermitente de fibrilación auricular que dura hasta 7 días. En la mayoría de los casos de FA paroxística, los episodios duran menos de 24 horas. Los episodios de fibrilación auricular paroxística cesan de forma espontánea, es decir, sin intervención médica. La FA paroxística es asintomática y está infradiagnosticada (FA oculta). Una duración preferente del episodio de la presente invención es inferior a 48 horas, 24 horas o 12 horas (FA paroxística). En consecuencia, la expresión "fibrilación auricular paroxística", como se usa en el presente documento, se define como episodios de FA que se autolimitan, preferentemente, en menos de 48 horas, más preferentemente en menos de 24 horas y, lo más preferentemente, en menos de 12 horas. Preferentemente, dichos episodios son recidivantes. Además, se contempla que los episodios se autolimiten en menos de 6 horas.

Tanto la FA persistente como la paroxística pueden ser recidivantes en semanas o meses, con lo que se proporciona la distinción de FA paroxística y persistente por los registros de ECG: Cuando un paciente ha tenido dos o más episodios, la FA se considera recidivante. Si la arritmia cesa de forma espontánea, la FA, en particular, FA recidivante, se designa como paroxística. La FA se designa como persistente si dura más de 7 días.

La distribución epicárdica de alta densidad puede confirmar si un sujeto padece fibrilación auricular paroxística o persistente, o si un sujeto no padece FA. Este procedimiento, que se aplicó en la sección de ejemplos, es un medio diferente para discriminar entre subgrupos de ritmo sinusal, FA paroxística y persistente de acuerdo con diferentes patrones de conducción de ondas de fibrilación resultantes de activaciones eléctricas (véase, Eckstein *et al.*, Transmural Conduction Is the Predominant Mechanism of Breakthrough During Atrial Fibrillation Evidence From Simultaneous Endo-Epicardial High-Density Activation Mapping. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* (2013) 6, pág. 334-341; van Marion *et al.*, Diagnosis and Therapy of Atrial Fibrillation: the Past, the Present and the Future Diagnosis and Therapy of Atrial Fibrillation: the Past, the Present and the Future JAFIB: Journal of Atrial Fibrillation; ago/sep 2015, Vol. 8 número 2, p5).

El término "sujeto" al que se hace referencia en el presente documento es preferentemente un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitaciones, animales domésticos (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En una realización preferente, el sujeto es un ser humano. El sujeto puede ser hombre o mujer.

En una realización, el sujeto puede tener al menos un factor de riesgo de fibrilación auricular paroxística. Los factores de riesgo preferentes son la edad (véase el siguiente párrafo, por ejemplo, el sujeto tiene 65 años o más), la hipertensión, tal como la hipertensión que requiere medicación antihipertensora, la insuficiencia cardíaca, tal como la insuficiencia cardíaca AHA en fase A-C, antecedentes de apoplejía, antecedentes de cirugía cardíaca o ablación. Preferentemente, el sujeto también puede tener indicios de diagnósticos por electrocardiograma remotos, dispositivos portátiles, incluyendo aplicaciones de salud.

Preferentemente, el sujeto que se va a someter a prueba tiene 50 años o más, más preferentemente 60 años o más y, lo más preferentemente, 65 años o más. Además, se contempla que el sujeto que se va a someter a prueba tenga 70 años o más.

Como se ha expuesto anteriormente, el biomarcador FABP-3 se podría incrementar en diversas enfermedades y trastornos distintos de fibrilación auricular. En una realización de la presente invención, se contempla que el sujeto no padezca dichas enfermedades y trastornos. Por ejemplo, se contempla que el sujeto no padezca síndrome coronario agudo.

En una realización del procedimiento de la presente invención, el sujeto que se va a someter a prueba padece una cardiopatía, en particular una cardiopatía que requiere cirugía valvular o una cardiopatía que requiere cirugía de revascularización coronaria. Por tanto, el sujeto puede padecer una arteriopatía coronaria, es decir, una arteriopatía coronaria estable. El sujeto puede tener diversos grados del perfil de riesgo cardiovascular hasta pacientes con insuficiencia cardíaca grave. El sujeto puede no tener cardiovasculopatía.

Preferentemente, un sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular paroxística es un sujeto que muestra al menos un síntoma de fibrilación auricular y/o que ha mostrado al menos un síntoma de fibrilación auricular antes de llevar a cabo el procedimiento para evaluar la fibrilación auricular paroxística. Normalmente, dichos síntomas son transitorios y pueden aparecer en unos pocos segundos y pueden desaparecer con la misma rapidez. Los síntomas de fibrilación auricular incluyen mareos, desmayos, disnea y, en particular, palpitaciones cardíacas. En consecuencia, el al menos un síntoma de fibrilación auricular se selecciona de mareos, desmayos, dificultad para respirar y, en particular, palpitaciones del corazón. Preferentemente, el sujeto ha mostrado al menos un síntoma de fibrilación auricular en los seis meses, más preferentemente en el mes, incluso más preferentemente en las dos semanas y lo más preferentemente en la semana anterior a la obtención de la muestra. En particular, se contempla que el sujeto haya mostrado al menos un síntoma de FA en los 2 días anteriores a la obtención de la muestra. Además, se contempla que el sujeto haya mostrado al menos un síntoma de FA en las 24 horas o incluso en las 12 horas anteriores a la obtención de la muestra. Por tanto, se sospecha que el sujeto ha presentado un episodio de fibrilación auricular, es decir, fibrilación auricular paroxística, dentro de uno de estos períodos. En consecuencia, las etapas llevadas a cabo de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente de la presente invención permiten el diagnóstico (o para ser más precisos una ayuda en el diagnóstico) si el sujeto ha padecido recientemente un episodio de fibrilación auricular, o no, dentro de estos períodos, en particular, si el sujeto ha padecido un episodio de fibrilación auricular en la semana, en particular en los dos días o en las 24 horas o en las 12 horas anteriores a la obtención de la muestra. Por tanto, la presente invención también contempla un procedimiento para diagnosticar un episodio reciente de fibrilación auricular, en particular de fibrilación auricular paroxística.

En una realización preferente del procedimiento de la presente invención, el sujeto no tiene antecedentes conocidos de fibrilación auricular, en particular, fibrilación auricular paroxística. En consecuencia, no se deberá haber diagnosticado al sujeto previamente de fibrilación auricular, es decir, antes de llevar a cabo el procedimiento de la presente invención (en particular, antes de obtener la muestra del sujeto). Sin embargo, el sujeto puede haber tenido o no episodios previos no diagnosticados de fibrilación auricular.

En una realización del procedimiento o uso de la presente invención, el sujeto tiene alteraciones de la conducción. Estas alteraciones de la conducción podrían confirmarse mediante distribución eléctrica invasiva de la fibrilación auricular durante una cirugía cardíaca (véase la sección de ejemplos). La infiltración grasa es un determinante importante de las alteraciones de la conducción como barrera eléctrica que impide la propagación del impulso.

Además, el sujeto que se va a someter a prueba, preferentemente, no padece fibrilación auricular permanente ni fibrilación auricular persistente. Por tanto, el sujeto no padece FA permanente ni FA persistente. Además, se contempla que el sujeto no padezca aleteo auricular.

En particular, se contempla que el sujeto no se haya sometido a cardioversión antes de llevar a cabo el procedimiento de la presente invención (en particular antes de que se haya obtenido la muestra a someter a prueba). La cardioversión es un procedimiento médico por el que la arritmia cardíaca se convierte en un ritmo normal. Esto se puede conseguir mediante cardioversión eléctrica o cardioversión con un agente antiarrítmico.

Preferentemente, el paciente está en ritmo sinusal en el momento en que se obtiene la muestra (es decir, en ritmo sinusal normal). En consecuencia, el sujeto preferentemente no padece un episodio de fibrilación auricular en el momento en que se obtiene la muestra.

Los criterios para el ritmo sinusal normal incluyen frecuencia cardíaca normal (clásicamente de 60 a 100 latidos por minuto para un adulto), ritmo regular, con variación de menos de 0,16 segundos en las duraciones más cortas y más largas entre ondas P sucesivas, el nódulo sinusal debe marcar el ritmo del corazón, por lo tanto, las ondas P deben ser redondeadas, todas de la misma forma y presentarse antes de cada complejo QRS en una proporción de 1:1, eje de onda P normal (de 0 a +75 grados). Intervalo PR, complejo QRS e intervalo QT normales, complejo QRS positivo en las derivaciones I, II, aVF y V3-V6, y negativo en la derivación aVR.

El término "muestra" se refiere a una muestra de un líquido corporal.

Las muestras de líquidos corporales se pueden obtener mediante técnicas bien conocidas e incluyen muestras de sangre, plasma y suero.

La muestra es una muestra de sangre (es decir, sangre completa), suero o plasma. El suero es la fracción líquida de la sangre completa que se obtiene después de que la sangre se deja coagular. Para obtener el suero, se retira el coágulo por centrifugación y se recoge el sobrenadante. El plasma es la parte de líquido acelular de la sangre. Para obtener una muestra de plasma, se recoge sangre completa en tubos tratados con anticoagulante (por ejemplo, tubos tratados con citrato o tratados con EDTA). Se retiran las células de la muestra por centrifugación y se obtiene el sobrenadante (es decir, la muestra de plasma).

En una realización preferente del procedimiento de la presente invención, el procedimiento comprende además, en la etapa a), la determinación de la cantidad de un péptido de tipo BNP en una muestra del sujeto y, en la etapa b), la comparación de la cantidad del péptido de tipo BNP con una cantidad de referencia, es decir, con una cantidad de referencia para dicho péptido de tipo BNP.

Los biomarcadores que se determinan en relación con el procedimiento de la presente invención son bien conocidos en la técnica:

El término "FABP-3", como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína 3 de unión a ácidos grasos. FABP-3 también se conoce como proteína cardíaca de unión a ácidos grasos o proteína de unión a ácidos grasos de tipo cardíaco (abreviada H-FABP). Preferentemente, el término también incluye variantes de FABP-3. FABP-3, como se usa en el presente documento, preferentemente, se refiere a FABP-3 humana. La secuencia de ADN del polipéptido que codifica el polipéptido FABP-3 humano, así como la secuencia proteínica de FABP-3 humana, son bien conocidas en la técnica y fueron descritas por primera vez por Peeters *et al.* (Biochem. J. 276 (Pt 1), 203-207 (1991)). Además, la secuencia de H-FABP humana se puede encontrar, preferentemente, en la entrada de Genbank U57623-1 (secuencia de ADN) y AAB02555.1 (secuencia proteínica). Se cree que la principal función fisiológica de FABP es el transporte de ácidos grasos libres, véase, por ejemplo, Storch *et al.*, Biochem. Biophys. Acta. 1486 (2000), 28-44. Otros nombres para FABP-3 y H-FABP son: FABP-11 (proteína 11 de unión a ácidos grasos), M-FABP (proteína muscular de unión a ácidos grasos), MDGI (inhibidor del crecimiento derivado de glándula mamaria) y O-FABP.

En una realización preferente de la presente invención, se determina la cantidad del polipéptido FABP-3. En otra realización de la presente invención, se determina la cantidad de transcrito de FABP-3.

El péptido de tipo péptido natriurético cerebral (del inglés *Brain Natriuretic Peptide*) (en el presente documento también denominado péptido de tipo BNP) se selecciona preferentemente del grupo que consiste en pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP y BNP. El prepropéptido (134 aminoácidos en el caso de pre-proBNP) comprende un péptido señal corto, que se escinde enzimáticamente para liberar el propéptido (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El propéptido se escinde además en un propéptido N terminal (NT-propéptido, 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso de BNP). Preferentemente, los péptidos natriuréticos cerebrales de acuerdo con la presente invención son NT-proBNP, BNP y variantes de los mismos. El BNP es la hormona activa y tiene una semivida más corta que su respectiva homóloga inactiva NT-proBNP. Preferentemente, el péptido de tipo péptido natriurético cerebral es BNP (*Brain Natriuretic Peptide*), y más preferentemente NT-proBNP (extremo N de la prohormona péptido natriurético cerebral).

El término "determinar" la cantidad de un biomarcador al que se hace referencia en el presente documento, es decir, FABP-3 o un péptido de tipo BNP, se refiere a la cuantificación del biomarcador, por ejemplo, para determinar el nivel del biomarcador en la muestra, empleando procedimientos de detección apropiados descritos en otra parte en el presente documento. Los términos "medir" y "determinar" se usan en el presente documento indistintamente (en relación con los biomarcadores).

En una realización, la cantidad de un biomarcador se determina poniendo en contacto la muestra con un agente que se une específicamente al biomarcador, formando, de este modo, un complejo entre el agente y dicho biomarcador, detectando la cantidad de complejo formado y midiendo, de este modo, la cantidad de dicho biomarcador.

El polipéptido FABP-3 o el péptido de tipo BNP se pueden detectar usando métodos conocidos en general en la técnica. Los procedimientos de detección engloban, en general, procedimientos para cuantificar la cantidad de un biomarcador en la muestra (procedimiento cuantitativo). En general, es conocido por el experto en la técnica cuáles de los siguientes procedimientos son adecuados para la detección cualitativa y/o para la cuantitativa de un biomarcador. Las muestras se pueden someter a ensayo de forma conveniente para determinar, por ejemplo, proteínas usando inmunolectrotransferencias e inmunoanálisis, como ELISA, RIA, inmunoanálisis basados en fluorescencia y luminiscencia, que están disponibles comercialmente. Otros procedimientos adecuados para detectar un biomarcador incluyen medir una propiedad física o química específica para el péptido o polipéptido, tal como su espectro de masa molecular o de RMN preciso. Dichos procedimientos comprenden, por ejemplo, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoanálisis, 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, inmunoanálisis completamente automatizados o robóticos (disponibles, por ejemplo, en analizadores Elecsys™), CBA (un ensayo enzimático de unión a cobalto, disponible, por ejemplo, en analizadores Roche-Hitachi™) y ensayos de aglutinación de látex (disponibles, por ejemplo, en analizadores Roche-Hitachi™).

Para la detección de proteínas biomarcadoras como se hace referencia en el presente documento, está disponible una amplia gama de técnicas de inmunoanálisis que usan un formato de ensayo de este tipo, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Estas incluyen tanto ensayos de único sitio como de dos sitios o "de tipo sándwich" de los tipos no competitivos, así como en los ensayos de unión competitiva tradicionales. Estos ensayos también incluyen la unión directa de un anticuerpo marcado a un biomarcador diana.

Los ensayos de tipo sándwich se encuentran entre los inmunoanálisis más útiles.

Son bien conocidos los procedimientos que emplean marcadores electroquimioluminiscentes. Dichos procedimientos hacen uso de la capacidad de complejos de metales especiales para lograr, por medio de la oxidación, un estado excitado desde el que se desintegran a su estado fundamental, emitiendo electroquimioluminiscencia. Para una revisión, véase Richter, M.M., Chem. Rev. 104 (2004) 3003-3036.

En una realización, el anticuerpo de detección (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que se va a usar para medir la cantidad de un biomarcador está rutenilado o iridinilado. En consecuencia, el anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) comprenderá un marcador de rutenio. En una realización, dicho marcador de rutenio es un complejo de bipyridina-rutenio(II). O el anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) comprenderá un marcador de iridio. En una realización, dicho marcador de iridio es un complejo como se divulga en el documento WO2012/107419.

La medición de la cantidad de un polipéptido (tal como FABP-3 o el péptido de tipo BNP) puede comprender preferentemente las etapas de (a) poner en contacto el polipéptido con un agente que se une específicamente a dicho polipéptido, (b)(opcionalmente) retirar el agente no unido, (c) medir la cantidad de agente de unión unido, es decir, el complejo del agente formado en la etapa (a). De acuerdo con una realización preferente, dichas etapas de poner en contacto, retirar y medir se pueden realizar por una unidad de analizador. 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 funcional entre sí. Por ejemplo, de acuerdo con una realización específica, 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 de forma funcional a dicha primera unidad analizadora por una unidad de transporte (por ejemplo, un brazo robot), que realiza dicha etapa de medir.

El agente que se une específicamente al biomarcador (en el presente documento también denominado "agente de unión") se puede acoplar de forma covalente o de forma no covalente a un marcador que permite la detección y medición del agente unido. Se puede realizar el marcaje por procedimientos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcador directamente (de forma covalente o de forma no covalente) al agente de unión. El marcaje indirecto implica la unión (de forma covalente o de forma no covalente) de un agente de unión secundario al primer agente de unión. El agente de unión secundario se debe unir específicamente al primer agente de unión. Dicho agente de unión secundario se puede acoplar a un marcador adecuado y/o ser la diana (receptor) del agente de unión terciario que se une al agente de unión secundario. Los agentes de unión de orden secundario y superior adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios y el bien conocido sistema estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El agente de unión o sustrato también se puede "marcar" con una o más marcas como es conocido en la técnica. A continuación, dichas marcas pueden ser dianas para agentes de unión 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 y/o extremo C. Los marcadores adecuados son cualquier marcador detectable por un procedimiento de detección apropiado. Los marcadores típicos incluyen partículas de oro, microesferas de látex, éster de acridano, luminol, complejos de rutenio, complejos de iridio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radioactivos, marcadores magnéticos ("por ejemplo, microesferas 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 las mismas. Los sustratos adecuados para la detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), 3,3',-5,5'-tetrametilbencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitrozul-tetrazolio y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, disponible como solución madre preparada para su uso de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), 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 la medición de 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, de Molecular Probes (Oregón). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Un marcador radioactivo se puede detectar por cualquier procedimiento conocido y apropiado, por ejemplo, una película sensible a la luz o un dispositivo de formación de imágenes de fósforo.

La cantidad de un polipéptido se puede medir, también preferentemente, como sigue: (a) poniendo en contacto un soporte sólido que comprende un agente de unión para el polipéptido como se describe en otra parte en el presente documento con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) midiendo la cantidad de péptido o polipéptido que se une al soporte. Los materiales para la fabricación de soportes son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, materiales de columna disponibles comercialmente, microesferas de poliestireno, microesferas de látex, microesferas magnéticas, partículas de metales coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc.

Aún en un aspecto, la muestra se retira del complejo formado entre el agente de unión y el al menos un marcador antes de la medición de la cantidad de complejo formado. En consecuencia, en un aspecto, el agente de unión se puede inmovilizar en un soporte sólido. En otro aspecto, la muestra se puede retirar del complejo formado en el soporte sólido aplicando una solución de lavado.

Los "ensayos de tipo sándwich" están entre los ensayos más útiles y comúnmente usados que engloban una serie de variaciones de la técnica de ensayo de tipo sándwich. En resumen, en un ensayo típico, un agente de unión (de captura) no marcado se inmoviliza o se puede inmovilizar en un sustrato sólido, y la muestra que se va a someter a prueba se pone en contacto con el agente de unión de captura. Después de un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de agente de unión-biomarcador, un segundo agente de unión (de detección) marcado con una molécula indicadora que puede producir una señal detectable, a continuación, se añade e incuba, lo que deja un tiempo suficiente para la formación de otro complejo de agente de unión-biomarcador-agente de unión marcado. Cualquier material sin reaccionar se puede eliminar por lavado y la presencia del biomarcador se determina por observación de una señal producida por la molécula indicadora unida al agente de unión de detección. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de una señal visible, o bien se pueden cuantificar por comparación con una muestra de control que contenga cantidades conocidas de biomarcador.

Las etapas de incubación de un ensayo de tipo sándwich típico se pueden variar según se requiera y sea apropiado. Dichas variaciones incluyen, por ejemplo, incubaciones simultáneas, en las que dos o más de agente de unión y biomarcador se incuban conjuntamente. Por ejemplo, tanto la muestra que se va a analizar como un agente de unión marcado se añaden simultáneamente a un agente de unión de captura inmovilizado. También es posible incubar en primer lugar la muestra que se va a analizar y un agente de unión marcado y, después de esto, añadir un anticuerpo unido a una fase sólida o que se pueda unir a una fase sólida.

El complejo formado entre un agente de unión específica y el biomarcador será proporcional a la cantidad del biomarcador presente en la muestra. Se entenderá que la especificidad y/o sensibilidad del agente de unión 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 medición también se encuentran en otra parte en el presente documento. La cantidad de complejo formado se transformará en una cantidad del biomarcador que refleje la cantidad efectivamente presente en la muestra.

Las expresiones "agente de unión", "agente de unión específica", "agente de unión específica para analito", "agente de detección" y "agente que se une específicamente a un biomarcador" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Preferentemente se refiere a un agente que comprende un resto de unión que se une específicamente al biomarcador correspondiente. Los ejemplos de "agentes de unión" o "agentes" son una sonda de ácido nucleico, cebador de ácido nucleico, molécula de ADN, molécula de ARN, aptámero, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido, ácido peptidonucleico (APN) o compuesto químico. Un agente preferente es un anticuerpo que se une específicamente al biomarcador que se va a medir. El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno.

deseada (es decir, fragmentos de unión a antígeno de los mismos). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

La expresión "unión específica" o "se une específicamente" se refiere a una reacción de unión en la que las moléculas del par de unión presentan una unión entre sí en condiciones donde no se unen significativamente a otras moléculas. El término "unión específica" o "se une específicamente", cuando se hace referencia a una proteína o péptido como biomarcador, se refiere a una reacción de unión en la que un agente de unión se une al biomarcador correspondiente con una afinidad de al menos 10^{-7} M. El término "unión específica" o "se une específicamente" se refiere preferentemente a una afinidad de al menos 10^{-8} M o incluso más preferente de al menos 10^{-9} M por su molécula diana. El término "específico" o "específicamente" se usa para indicar que otras moléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para la molécula diana.

El término "cantidad" como se usa en el presente documento engloba la cantidad absoluta del biomarcador, la cantidad o concentración relativa del biomarcador, así como cualquier valor o parámetro que se correlacione 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 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 medidas 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.

El término "comparar", como se usa en el presente documento, se refiere a comparar la cantidad del polipéptido FABP-3 o el péptido de tipo BNP en la muestra del sujeto con la cantidad de referencia del biomarcador. Se debe entender que comparar como se usa en el presente documento normalmente 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 del biomarcador en una muestra se compara con el mismo tipo de señal de intensidad obtenida de una muestra de referencia. La comparación se puede llevar a cabo manualmente o estar asistida por ordenador. Por tanto, la comparación se puede llevar a cabo por un dispositivo informático. El valor de la cantidad medida o detectada del biomarcador en la muestra del sujeto y la cantidad de referencia, por ejemplo, se pueden comparar entre sí y dicha comparación se puede llevar a cabo automáticamente por un programa informático que ejecuta un algoritmo para la comparación. El programa informático que lleva a cabo dicha evaluación proporcionará la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad medida 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, proporcionar automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad medida 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, proporcionar automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado.

De acuerdo con la presente invención, la cantidad de FABP-3 y, opcionalmente, la cantidad de péptido de tipo BNP (en particular, la cantidad del biomarcador NT-proBNP) se compararán con una referencia. La referencia es, preferentemente, una cantidad de referencia. La expresión "cantidad de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que permite la asignación de un sujeto en (i) el grupo de sujetos que padecen fibrilación auricular paroxística o (ii) el grupo de sujetos que no padecen fibrilación auricular paroxística. 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.

Las cantidades de referencia, en principio, se pueden calcular para una cohorte de sujetos como se especifica anteriormente en base a los valores promedio o medios para un biomarcador dado aplicando procedimientos estándar de estadística. 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 frente a especificidad resultantes de variar continuamente el valor umbral de decisión en todo el intervalo de datos observados. El rendimiento clínico de un procedimiento diagnóstico depende de su exactitud, es decir, su capacidad para asignar correctamente los sujetos a un determinado pronóstico o diagnóstico. La curva ROC indica la superposición entre las dos distribuciones representando la sensibilidad frente a 1 - especificidad para el intervalo completo de umbrales adecuados para realizar una distinción. En el eje de ordenadas está la sensibilidad, o la fracción de verdaderos positivos, que se define como la proporción del número de resultados de prueba verdaderos positivos con respecto al producto del número de resultados de prueba verdaderos positivos y el número de falsos negativos. Esto también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula exclusivamente a partir del subgrupo afectado. En el eje de abscisas está la fracción de falsos

positivos, o 1 - especificidad, que se define como la proporción del número de resultados falsos positivos con respecto al producto del número de resultados verdaderos negativos y el número de falsos positivos. Es un índice de especificidad y se calcula en su totalidad a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de verdaderos positivos y falsos se calculan en su totalidad por separado, al usar 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 sensibilidad/1 - especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Una prueba con discriminación perfecta (ninguna superposición en las dos distribuciones de resultados) tiene una curva ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, donde la fracción de verdaderos positivos es 1,0 o un 100 % (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivos es 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 se encuentran entre estos dos extremos. Si la curva ROC se encuentra completamente por debajo de la diagonal a 45°, esto se rectifica fácilmente invirtiendo el criterio para "positividad" de "mayor que" a "menor que" o viceversa. Cualitativamente, cuanto más cerca esté la curva de la esquina superior izquierda, mayor será la exactitud global de la prueba. Dependiendo de un intervalo de confianza deseado, se puede obtener un umbral de la curva ROC que permita el diagnóstico para un acontecimiento dado con un equilibrio apropiado de sensibilidad y especificidad, respectivamente. En consecuencia, se puede generar la referencia que se va a usar para el procedimiento mencionado anteriormente de la presente invención, es decir, un valor umbral que permite diferenciar entre sujetos que padecen fibrilación auricular paroxística o los que no padecen fibrilación auricular paroxística entre una cohorte de sujetos, preferentemente, estableciendo una ROC para dicha cohorte como se describe anteriormente y derivando una cantidad umbral de la misma. Dependiendo de la sensibilidad y especificidad deseadas para un procedimiento de diagnóstico, la curva ROC permite obtener un umbral adecuado. Se entenderá que se desea una sensibilidad óptima para excluir a un sujeto que padezca fibrilación auricular paroxística (es decir, un descarte), mientras que se contempla una especificidad óptima para evaluar a un sujeto como que padece fibrilación auricular paroxística (es decir, una inclusión). En particular, se contempla que el sujeto se evalúe como que padece fibrilación auricular paroxística.

En realizaciones preferentes, la expresión "cantidad de referencia" en el presente documento se refiere a un valor predeterminado. En una realización preferente, dicho valor predeterminado permitirá diferenciar entre un sujeto que padece fibrilación auricular paroxística y un sujeto que no padece fibrilación auricular paroxística (opcionalmente en combinación con los resultados de los registros de ECG). En otra realización, dicha cantidad de referencia permitirá diagnosticar que un sujeto no padece fibrilación auricular paroxística, es decir, excluir a un sujeto que padece fibrilación auricular.

En determinadas realizaciones, la cantidad de referencia se deriva de un sujeto o un grupo de sujetos que se sabe que no padecen fibrilación auricular paroxística o de un sujeto o un grupo de sujetos que se sabe que padecen fibrilación auricular paroxística.

Preferentemente, una cantidad de FABP-3 en la muestra del sujeto que es mayor que la cantidad de referencia indica que el sujeto padece fibrilación auricular paroxística.

También preferentemente, una cantidad de FABP-3 en la muestra del sujeto que es menor que la cantidad de referencia indica que el sujeto no padece fibrilación auricular paroxística.

Preferentemente se aplica lo siguiente, si se determina FABP-3 y un péptido de tipo BNP:

Preferentemente, una cantidad de FABP-3 en la muestra del sujeto que es mayor que la cantidad de referencia y una cantidad de péptido de tipo BNP en la muestra del sujeto que es mayor que la cantidad de referencia indican que el sujeto padece fibrilación auricular paroxística. Por tanto, ambas cantidades están incrementadas.

También preferentemente, una cantidad de FABP-3 en la muestra del sujeto que es menor que la cantidad de referencia y una cantidad de péptido de tipo BNP en la muestra del sujeto que es menor que la cantidad de referencia indican que el sujeto no padece fibrilación auricular paroxística.

En una realización preferente del procedimiento de la presente invención, el procedimiento comprende además la evaluación de registros de ECG intermitentes obtenidas de dicho sujeto durante un período de al menos una semana usando un dispositivo de ECG portátil. En esta realización, el diagnóstico de si el sujeto padece fibrilación auricular paroxística o no, se basa en los resultados de la etapa de comparación (b), es decir, de la cantidad de FABP-3 con la cantidad de referencia y, opcionalmente, de la cantidad del péptido de tipo BNP con la cantidad de referencia y la evaluación de registros de ECG intermitentes.

La electrocardiografía (abreviada ECG) es el procedimiento de registrar la actividad eléctrica del corazón. Un dispositivo de ECG registra las señales eléctricas producidas por el corazón que se propagan por todo el cuerpo hasta la piel. El registro de la señal eléctrica se consigue poniendo en contacto la piel del sujeto de prueba con electrodos que comprende el dispositivo de ECG. El procedimiento de obtención del registro es no invasivo y libre de riesgos.

- De acuerdo con la presente invención, se evaluarán los registros obtenidos con un dispositivo de ECG portátil. La expresión "evaluar registros de ECG intermitentes", como se usa en el presente documento, se refiere preferentemente a evaluar la presencia o ausencia de fibrilación auricular en los registros de ECG intermitentes (es decir, lecturas de ECG/tiras de ECG) obtenidos del sujeto. Por tanto, se interpretan los registros. Dicha evaluación la puede llevar a cabo un médico, tal como un cardiólogo, y/o puede estar asistida por ordenador. Por ejemplo, se puede realizar una evaluación previa mediante un programa informático automatizado. La evaluación final de los resultados preevaluados la puede llevar a cabo un médico.
- El dispositivo de ECG portátil al que se hace referencia en el procedimiento de la presente invención permitirá, por tanto, el diagnóstico de fibrilación auricular, es decir, la evaluación de la presencia o ausencia de fibrilación auricular (en los registros de ECG obtenidos del sujeto).
- Diversos fabricantes producen dispositivos de ECG portátiles que permiten el diagnóstico de FA. Algunos ejemplos son AfibAlert® de Lohman Technologies, un dispositivo que aborda específicamente la detección de fibrilación auricular, Zenicor-ECG de Zenicor, Suecia, AliveCor Mobile ECG, Dimetek Micro Ambulatory ECG Recorder, ECG Check, el ECG portátil HeartCheck™ PEN, el monitor de ECG InstantCheck Real Time Display, el dispositivo ReadMyHeart o REKA E100.
- En una realización del procedimiento de la presente invención, el dispositivo de ECG portátil es un dispositivo de una sola derivación. En otra realización preferente, el dispositivo de ECG usado para obtener registros de ECG intermitentes es un dispositivo de ECG de 12 derivaciones.
- En una realización de la presente invención, el dispositivo de ECG portátil es un dispositivo manejado por el sujeto que se somete a prueba. Por tanto, el dispositivo portátil al que se hace referencia en el procedimiento de la presente invención permitirá la autoevaluación por el sujeto de prueba. En otras palabras, los registros a evaluar se obtuvieron mediante autoevaluación.
- De acuerdo con la presente invención, se contempla que el dispositivo de ECG portátil comprenda dos electrodos de contacto seco. Por tanto, se contempla que los registros de ECG intermitentes se hayan obtenido colocando dos dedos (tal como el pulgar izquierdo y derecho) sobre los electrodos de contacto seco. De forma alternativa, los electrodos de contacto seco se pueden colocar contra la piel desnuda, tal como el tórax.
- Los registros de ECG de acuerdo con la presente invención serán registros de ECG intermitentes. Por tanto, los registros de ECG no se deben haber obtenido continuamente del sujeto (que es, por ejemplo, el caso de la monitorización Holter). En consecuencia, los registros de ECG a evaluar son registros que se obtuvieron periódicamente durante un período de al menos una semana.
- Sin embargo, se contempla que se obtengan registros de ECG al menos una vez al día del sujeto. Por tanto, el dispositivo lo maneja el sujeto al menos una vez al día. La expresión "al menos una vez", como se usa en el presente documento, significa una vez o más de una vez, tal como dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, etc. En una realización, los registros de ECG se obtienen dos veces al día o más. Los registros se pueden almacenar o transmitir a una base de datos de ECG, por ejemplo, por medio de un teléfono móvil integrado o conectado con el dispositivo de ECG. Por ejemplo, el dispositivo de ECG se puede conectar con un teléfono móvil (por ejemplo, por medio de una conexión Bluetooth o inalámbrica) que transfiere los registros a la base de datos. La transmisión se puede conseguir por medio de una aplicación (tal como una aplicación de Android o iOS). Después de la transmisión de los registros a la base de datos, un médico puede evaluar los registros para detectar la presencia o ausencia de fibrilación auricular, es decir, interpretarlos.
- La duración de un (solo) registro normalmente es entre aproximadamente 10 segundos y aproximadamente 120 segundos. En una realización, la duración de un registro es entre aproximadamente 20 segundos y aproximadamente 60 segundos. Por ejemplo, se puede haber obtenido un registro de ECG colocando los pulgares sobre los dos electrodos durante aproximadamente 30 segundos.
- Además, se contempla en particular que los registros de ECG intermitentes se obtengan cuando el sujeto muestre síntomas de fibrilación auricular (siempre que el sujeto haya mostrado síntomas). Los síntomas se describen en otro lugar del presente documento. Normalmente, dichos síntomas son transitorios y pueden aparecer en unos pocos segundos y pueden desaparecer con la misma rapidez. Si el sujeto no muestra síntomas de fibrilación auricular, no obstante, los registros se obtendrán al menos una vez al día, como se ha descrito anteriormente.
- En una realización, los registros de ECG intermitentes, es decir, no continuos, se habrán obtenido durante un período de al menos cuatro días. En otra realización, los registros de ECG intermitentes, es decir, no continuos, se habrán obtenido durante un período de al menos una semana. Por tanto, habrá al menos siete, en particular al menos 14 registros que se evaluarán. En una realización, los registros de ECG intermitentes se habrán obtenido durante un período de al menos diez días. En otra realización, los registros de ECG intermitentes se habrán obtenido durante un período de al menos dos semanas. Además, se contempla que los registros de ECG

intermitentes a evaluar se hayan obtenido durante un período de una semana a dos semanas, en particular durante un período de diez días a dos semanas. La presencia de FA en al menos un registro es indicativa del diagnóstico de FA, en particular FA paroxística.

- 5 Si el procedimiento comprende la evaluación de registros de ECG intermitentes como se expone anteriormente, el diagnóstico de que el sujeto padece fibrilación auricular, o no, se basará en los resultados de la etapa de comparación b) y la evaluación de los registros de ECG intermitentes:

10 En una realización, se diagnostica que el paciente no padece fibrilación auricular paroxística (descartando fibrilación auricular paroxística). Esto se indica por la ausencia de fibrilación auricular en los registros de ECG intermitentes y por una cantidad de FABP-3 (y por una cantidad del péptido de tipo BNP, si se determina el péptido de tipo BNP) en la muestra del sujeto menor que la cantidad de referencia. En otras palabras, la ausencia de fibrilación auricular en los registros de ECG intermitentes en combinación con una cantidad de FABP-3 (y

15 opcionalmente el péptido de tipo BNP) por debajo de la referencia son indicativos de un sujeto que no padece fibrilación auricular paroxística. Por tanto, el sujeto tiene una baja probabilidad de padecer fibrilación auricular paroxística (por ejemplo, una probabilidad menor de un 10 o un 15 %).

20 En una realización, se diagnostica que el paciente padece fibrilación auricular paroxística. Esto se indica por la presencia de fibrilación auricular en los registros de ECG intermitentes (es decir, la presencia de fibrilación auricular en al menos un registro) y/o por una cantidad de FABP-3 (y opcionalmente por una cantidad del péptido de tipo BNP) en la muestra del sujeto por encima de la referencia. En otras palabras, la presencia de fibrilación auricular en los registros de ECG intermitentes y/o una cantidad de FABP-3 (y opcionalmente una cantidad del péptido de tipo BNP) por encima de la referencia son indicativos de un sujeto que padece fibrilación auricular paroxística. Por tanto, el sujeto tiene una alta probabilidad de padecer fibrilación auricular paroxística (tal como una probabilidad

25 mayor de un 70 o un 80 %).

La ausencia de fibrilación auricular en los registros de ECG intermitentes del sujeto en combinación con una cantidad de FABP-3 por encima de la referencia podría ser indicativa de un sujeto que padece fibrilación auricular. Aunque no se detectó fibrilación auricular en el ECG, es probable que el sujeto padezca fibrilación auricular. Esto

30 podría confirmarse mediante monitorización continua de la actividad eléctrica del sistema cardiovascular durante al menos 24 horas, por ejemplo, mediante monitorización Holter o mediante circuitos de registro implantables (ILR).

En una realización del procedimiento, dicho procedimiento comprende además una etapa de recomendar y/o iniciar una medida complementaria adecuadas en función de los resultados del diagnóstico. Dicha al menos una medida complementaria adecuada se recomendará o iniciará en sujetos diagnosticados de padecer fibrilación auricular, es decir, un sujeto que tiene una alta probabilidad de padecer FA.

35

El término "recomendar", como se usa en el presente documento, significa establecer una propuesta para una medida complementaria adecuada que podría aplicarse al sujeto al que se le ha diagnosticado que padece FA paroxística.

40

La medida complementaria adecuada se refiere a todas las medidas que se pueden aplicar a sujetos que padecen FA, es decir, que tienen una alta probabilidad de padecer FA paroxística. Por ejemplo, las medidas de atención del paciente incluyen la verificación del diagnóstico de FA paroxística (por ejemplo, mediante monitorización Holter) y/o tratamiento farmacológico.

45

Si el sujeto padece fibrilación auricular paroxística, se recomendará o iniciará un tratamiento con al menos un anticoagulante. El anticoagulante tiene como objetivo reducir o evitar la coagulación de sangre y apoplejía relacionada. Preferentemente, el anticoagulante 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 e inhibidores de trombina.

50

En una realización preferente, el anticoagulante es un anticoagulante oral no antagonista de la vitamina K (abreviado ACON). Dichos anticoagulantes inhiben la formación de coágulos y, a diferencia de la warfarina, no son antagonistas de la vitamina K. Dichos anticoagulantes son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Hijazi *et al.*, 2015. The ABC (age, biomarkers, clinical history) stroke risk score: a biomarker-based risk score for predicting stroke in atrial fibrillation. Los ACON preferentes son dabigatrán, rivaroxabán y apixabán.

55

En consecuencia, la presente divulgación se refiere además a un procedimiento de recomendación y/o inicio de al menos una medida complementaria adecuada como se expone anteriormente. En una realización, el procedimiento comprende las etapas del procedimiento de la presente invención, es decir, el procedimiento de diagnóstico de fibrilación auricular paroxística, como se expone en el presente documento en otra parte y la etapa adicional de recomendación y/o inicio de al menos una medida complementaria adecuada. En una realización, la fibrilación auricular paroxística se trata en el sujeto administrando un anticoagulante.

60

La presente invención se refiere además a un procedimiento de ayuda en el diagnóstico de fibrilación auricular,

65

comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) determinar la cantidad del biomarcador FABP-3 y, opcionalmente, la cantidad de un péptido de tipo BNP en una muestra proporcionada u obtenida de un sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular paroxística, y

b) proporcionar información sobre la cantidad determinada del biomarcador FABP-3 y, opcionalmente, sobre la cantidad determinada del péptido de tipo BNP al médico especialista del sujeto, ayudando, de este modo, en el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística en dicho sujeto.

El médico especialista será el médico que requirió la determinación del/de los biomarcador(es). El procedimiento mencionado anteriormente ayudará al médico especialista en el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística.

La etapa a) del procedimiento mencionado anteriormente de obtención de la muestra no engloba la extracción de la muestra del sujeto. Preferentemente la muestra se obtiene recibiendo una muestra de dicho sujeto. Por tanto, la muestra se puede haber suministrado.

La presente divulgación se refiere además a un procedimiento que comprende:

a) proporcionar una prueba para el biomarcador FABP-3 y, opcionalmente, una prueba para el péptido de tipo BNP, y

b) proporcionar instrucciones para el uso de los resultados analíticos obtenidos u obtenibles mediante dicha o dichas pruebas en el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística.

La finalidad del procedimiento mencionado anteriormente es, preferentemente, la ayuda en el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística.

Las instrucciones contendrán un protocolo para llevar a cabo el procedimiento de diagnóstico de fibrilación auricular paroxística descrito en el presente documento anteriormente. Además, las instrucciones contendrán al menos un valor para una cantidad de referencia para FABP-3 y, opcionalmente, al menos un valor para una cantidad de referencia para un péptido de tipo BNP.

La "prueba" es, preferentemente, un kit adaptado para llevar a cabo el procedimiento de diagnóstico de fibrilación auricular paroxística. Dicho kit comprenderá al menos un agente de detección para el biomarcador FABP-3 y, opcionalmente, al menos un agente de detección para un péptido de tipo BNP. Los agentes de detección para los dos biomarcadores se pueden proporcionar en un solo kit o en dos kits separados.

El resultado analítico obtenido u obtenible mediante dicha prueba es el valor para la cantidad del biomarcador o biomarcadores en la muestra del sujeto.

Además, la presente invención se refiere al uso

i) del biomarcador FABP-3 y, opcionalmente, de un péptido de tipo BNP y/o

ii) al menos un agente de detección que se une específicamente a FABP-3 y, opcionalmente, al menos un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo BNP,

en una muestra de un sujeto para diagnosticar fibrilación auricular paroxística (en dicho sujeto).

El uso mencionado anteriormente puede englobar además el uso de un dispositivo de ECG portátil y/o registros de ECG intermitentes obtenidos al usar un dispositivo de ECG portátil de dicho sujeto durante un período de al menos una semana usando un dispositivo de ECG portátil.

Los términos y expresiones mencionados en relación con el uso mencionado anteriormente, tales como "muestra", "sujeto", "agente de detección", "FABP-3", "unión específica", "fibrilación auricular paroxística" se han definido en relación con el procedimiento para diagnosticar fibrilación auricular. Las definiciones y explicaciones se aplican en consecuencia.

En las figuras:

Fig. 1: Diagnóstico de FA paroxística con niveles elevados de FABP-3 circulante (valores de mediana: 1,92 ng/ml en muestras de 30 pacientes que no padecen FA, 2,84 ng/ml en muestras de 14 pacientes con FA paroxística; 2,75 ng/ml en muestras de 16 pacientes con FA persistente).

Fig. 2: Resultados de NT-proBNP en muestras de plasma de los pacientes descritos en la leyenda de la figura 1.

Fig. 3: Resultados de PCRhs (muestras de plasma) en muestras de plasma de los 14 pacientes que padecen FA paroxística y en muestras de plasma de los 30 pacientes que no padecen FA descritos en la leyenda de la figura 1.

Fig. 4: Expresión diferencial de FABP-3 en muestra de tejido de la orejuela derecha de pacientes con FA (caso) o en ritmo sinusal (control) en función de los análisis de secuencia de ARN aplicando los algoritmos RSEM y DESEQ2. Factor de cambio en la expresión (FC) = 1,279; FDR (tasa de descubrimientos falsos) = 0,009 (análisis de muestras de tejido de 39 pacientes que no padecen FA y 11 pacientes con FA).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustrarán la invención. Sin embargo, no se interpretarán como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Detección de FA paroxística

Se han determinado los niveles de FABP3, NT-proBNP y PCRhs en muestras de plasma de $n = 60$ pacientes con la sangre separada en muestras y los biomarcadores analizados antes de una cirugía a tórax abierta debido a un injerto de revascularización coronaria o una cirugía valvular. Se generaron pruebas de diferentes tipos de FA, FA paroxística y FA persistente o RS (controles) durante la cirugía con distribución endoepicárdica de activación de alta densidad simultánea. Los pacientes con FA, FA paroxística o FA persistente y los controles se emparejaron con respecto al sexo, la edad y las comorbilidades.

La distribución epicárdica de alta densidad es un medio diferente para discriminar entre subgrupos de ritmo sinusal, FA paroxística y persistente de acuerdo con diferentes patrones de conducción de ondas de fibrilación resultantes de activaciones eléctricas (véase Eckstein *et al.* y van Marion *et al.*, ambos citados anteriormente).

La distribución epicárdica de alta densidad, por ejemplo, permite el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística incluso en ausencia de un episodio de fibrilación auricular. Por tanto, permite una diferenciación fiable entre sujetos que no padecen FA, sujetos que padecen FA paroxística y sujetos que padecen FA persistente.

En el momento de la toma de muestras de sangre,

- los pacientes que padecen FA paroxística, opcional en ritmo sinusal; $n = 14$ pacientes
- los pacientes con FA persistente no estaban en ritmo sinusal; $n = 16$ pacientes
- los pacientes de control estaban en ritmo sinusal; $n = 30$ pacientes.

La evaluación de los datos mostró que los pacientes con niveles de FABP3 (independiente de otros biomarcadores) por encima de un valor de referencia (*en el estudio* $>2,3 \text{ ng/ml}$) son sospechosos de tener fibrilación auricular paroxística y se pueden beneficiar de anticoagulación. Como se muestra en la figura 1, el área bajo la curva observada de FABP3 para la detección de FA paroxística fue de 0,718. El área bajo la curva observada para FA persistente fue de 0,718. Sorprendentemente, incluso se muestra que no se pudo detectar un incremento progresivo de los niveles de FABP3 circulante desde pacientes con FA paroxística hasta pacientes con FA persistente. La mediana observada de los valores de FABP3 circulante fue de 1,92 ng/ml en muestras de 30 pacientes que no padecían FA, 2,84 ng/ml en muestras de 14 pacientes que padecían FA paroxística; 2,75 ng/ml en muestras de 16 pacientes con FA persistente.

A diferencia de FABP3, para NTproBNP se observó un incremento progresivo de los niveles circulantes entre los subgrupos de pacientes desde fibrilación auricular paroxística hasta persistente o permanente, como se muestra en la figura 2. El área bajo la curva observada de NTproBNP para la detección de FA paroxística fue de 0,636 y 0,873 para la detección de FA persistente. Por tanto, en los pacientes analizados en el presente documento, el biomarcador FABP3 permite un diagnóstico mejorado de FA paroxística.

La mediana observada de los valores de NTproBNP circulante fue de 154,31 pg/ml en muestras de 30 pacientes en ritmo sinusal; 263,93 pg/ml en muestras de 14 pacientes con FA paroxística; 1829,35 pg/ml en muestras de 16 pacientes con FA persistente.

Como se muestra en la figura 3, el área bajo la curva observada de PCRhs para la detección de FA paroxística fue de 0,608. El área bajo la curva observada de PCRhs para la detección de FA persistente fue de 0,644.

Se concluye que FABP3 muestra un rendimiento beneficioso frente a PCRhs y, por tanto, individualmente y/o en combinación con NT-proBNP puede ayudar en la detección de episodios de fibrilación auricular paroxística. Se sospecha que los pacientes con niveles de FABP3 por encima de un valor de referencia (*en el estudio* $>2,3 \text{ ng/ml}$)

en combinación con niveles elevados de NT-proBNP tienen fibrilación auricular paroxística y se pueden beneficiar de anticoagulación.

5 Por tanto, el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística en pacientes que se presentan en ritmo sinusal se puede conseguir con la detección de niveles potenciados de FABP3 sola o en combinación con NT-proBNP.

Ejemplo 2: Expresión diferencial de FABP3 en tejido cardíaco de pacientes con FA

10 Se han determinado los niveles de expresión diferencial de FABP3 en muestras de tejido miocárdico de la orejuela derecha de n = 39 pacientes.

Análisis de secuencia de ARN

15 Se tomaron muestras de tejido auricular durante una cirugía de tórax abierta debido a un injerto de revascularización coronaria o cirugía valvular. Se generaron pruebas de FA o RS (controles) durante la cirugía con distribución endoepicárdica de activación de alta densidad simultánea. Los pacientes con FA y los controles se emparejaron con respecto al sexo, la edad y las comorbilidades.

20 Se prepararon muestras de tejido auricular para

- pacientes con FA; n = 11 pacientes
- pacientes de control en RS; n = 39 pacientes.

25 La expresión diferencial de FABP3 se determinó en análisis de secuencia de ARN aplicando los algoritmos RSEM y DESEQ2.

30 Como se muestra en la figura 4, se encontró que la expresión de FABP3 estaba regulada por incremento en los tejidos auriculares analizados de los 11 pacientes con FA persistente frente a los 39 pacientes de control.

35 El factor de cambio en la expresión (FC) fue 1,279. La FDR (tasa de descubrimientos falsos) fue 0,009. La expresión alterada de FABP3 se determinó en el órgano final dañado, el tejido auricular. Los niveles de ARNm de FABP3 se compararon con los resultados de la distribución de alta densidad del tejido auricular. Se detectaron niveles elevados de ARNm de FABP3 en muestras de tejido auricular con alteraciones de la conducción caracterizadas por distribución eléctrica. Las alteraciones de la conductancia pueden estar provocadas por infiltración de grasa o por fibrosis intersticial. La expresión diferencial observada de FABP3 en tejido auricular de pacientes que padecen fibrilación auricular respalda que FABP se libera en la circulación desde el miocardio, en particular desde la orejuela derecha y las concentraciones séricas/plasmáticas elevadas ayudan a la detección de episodios de FA.

40 Se concluye que FABP3 se libera del corazón a la sangre y puede ayudar a la detección de episodios de FA.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar fibrilación auricular paroxística en un sujeto, que comprende:
 - 5 (a) determinar la cantidad de FABP-3 (proteína 3 de unión a ácidos grasos) en una muestra de un sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular paroxística, y
 - (b) comparar la cantidad determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto está en ritmo sinusal en el momento en que se obtiene la muestra.
3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la muestra es una muestra de sangre, suero o plasma.
- 15 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular muestra o ha mostrado al menos un síntoma de fibrilación auricular.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el al menos un síntoma de fibrilación auricular se selecciona de mareos, desmayos, dificultad para respirar y, en particular, palpitaciones del corazón.
- 20 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto no tiene antecedentes conocidos de fibrilación auricular.
- 25 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que una cantidad de FABP-3 en la muestra del sujeto que es mayor que la cantidad de referencia indica que el sujeto padece fibrilación auricular paroxística.
- 30 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que una cantidad de FABP-3 en la muestra del sujeto que es menor que la cantidad de referencia indica que el sujeto no padece fibrilación auricular paroxística.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además, en la etapa a), la determinación de la cantidad de un péptido de tipo BNP en una muestra del sujeto y, en la etapa b), la comparación de la cantidad del péptido de tipo BNP con una cantidad de referencia.
- 35 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además la evaluación de registros de ECG intermitentes obtenidos de dicho sujeto durante un período de al menos una semana usando un dispositivo de ECG portátil.
- 40 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sujeto es un sujeto humano.
12. Un procedimiento de ayuda en el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - 45 a) determinar la cantidad del biomarcador FABP-3 y, opcionalmente, la cantidad de un péptido de tipo BNP en una muestra proporcionada u obtenida de un sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular paroxística, y
 - 50 b) proporcionar información sobre la cantidad determinada del biomarcador FABP-3 y, opcionalmente, sobre la cantidad determinada del péptido de tipo BNP al médico especialista del sujeto, ayudando, de este modo, en el diagnóstico de fibrilación auricular paroxística en dicho sujeto.
- 55 13. Uso
 - i) del biomarcador FABP-3 y, opcionalmente, de un péptido de tipo BNP y/o
 - ii) de al menos un agente de detección que se une específicamente a FABP-3 y, opcionalmente, al menos un agente de detección que se une específicamente a un péptido de tipo BNP,
 - 60 en una muestra de un sujeto para diagnosticar fibrilación auricular paroxística.
14. Uso de la reivindicación 13, en el que el agente de detección es un anticuerpo o fragmento del mismo.
- 65 15. Uso de la reivindicación 13 o 14, en el que

- a) la muestra es una muestra de sangre, suero o plasma,
- b) el sujeto está en ritmo sinusal en el momento en que se obtiene la muestra y/o
- 5 c) el sujeto no tiene antecedentes conocidos de fibrilación auricular.

Fig. 1

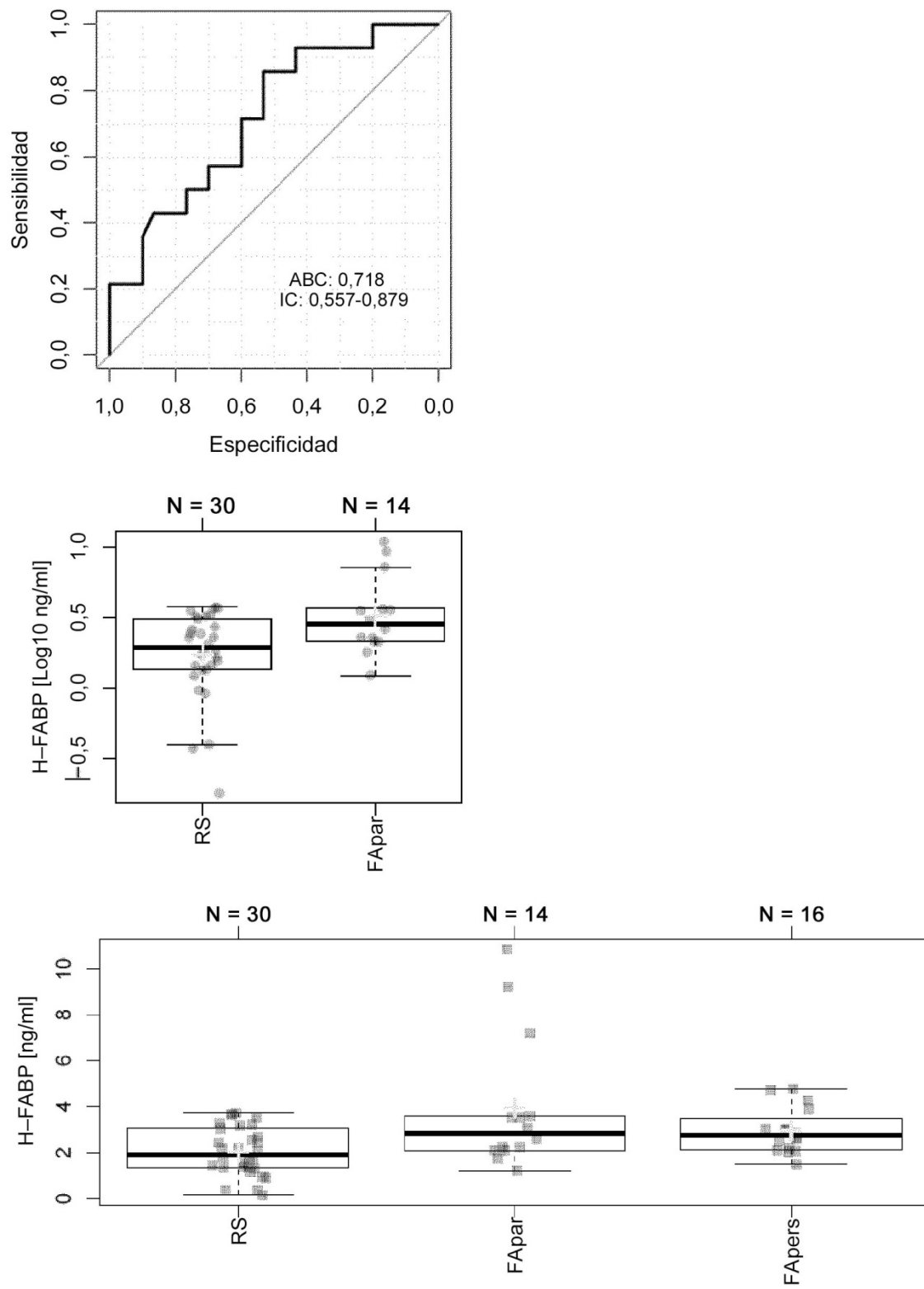


Fig. 2: NTproBNP

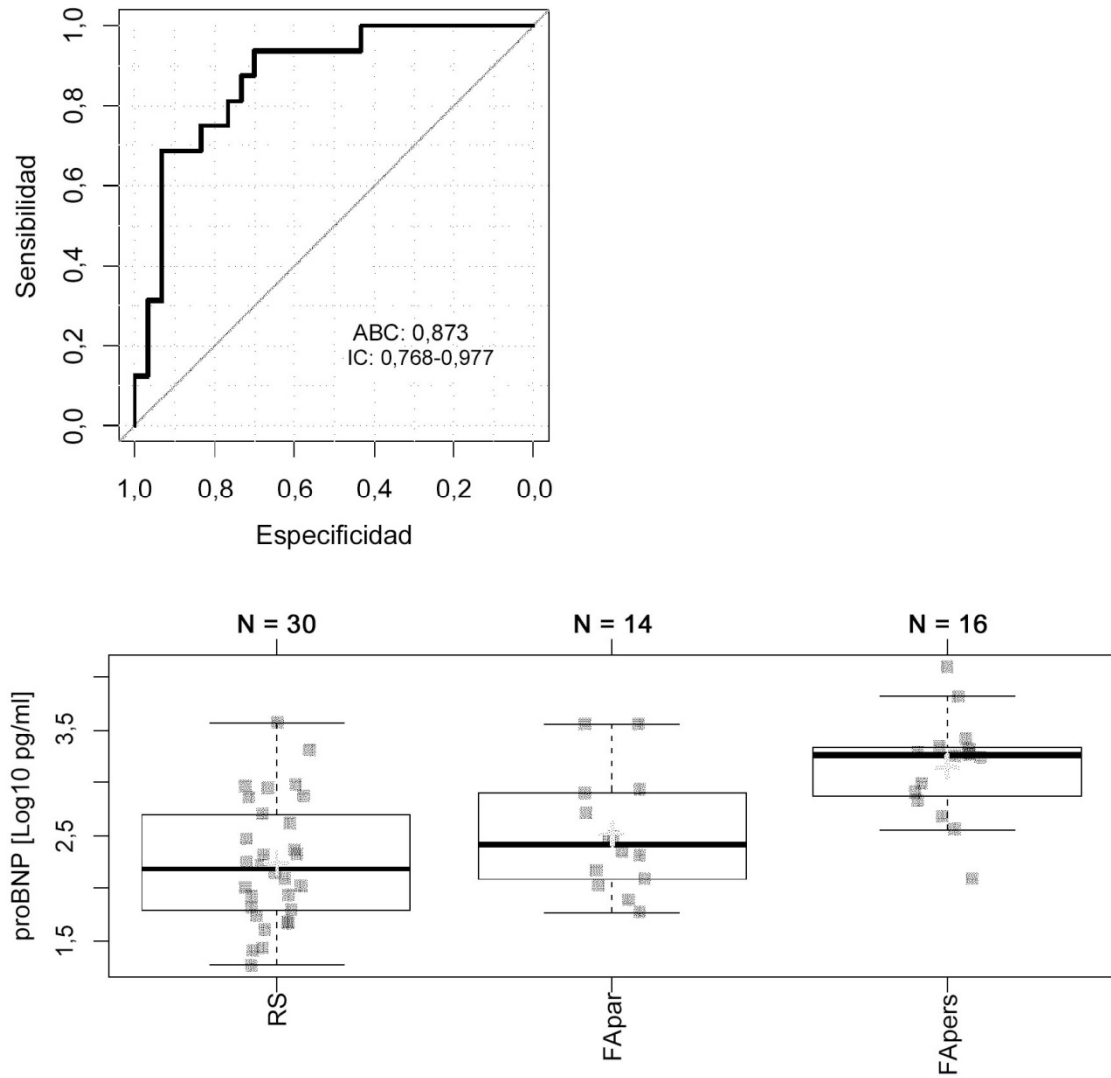


Fig. 3: PCR

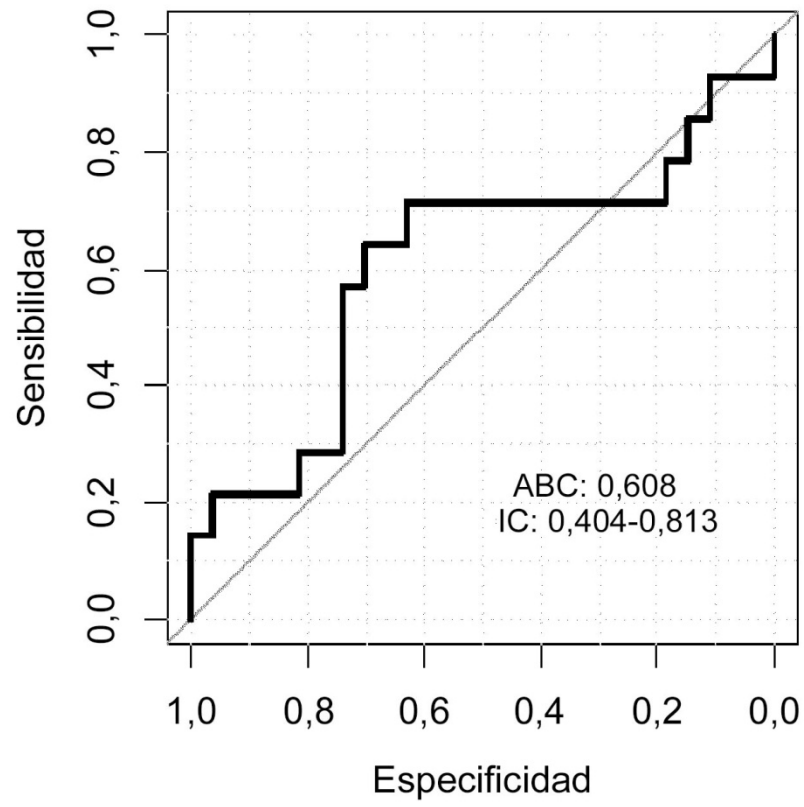


Fig. 4 (transcrito de FABP-3)

