

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 087**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2016** E 16182825 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020** EP 3279665

54 Título: **ESM-1 (endocan) circulante en la evaluación de la fibrilación auricular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.04.2021

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (33.3%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH;
UNIVERSITEIT MAASTRICHT (33.3%) y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT
(33.3%)

72 Inventor/es:

KARL, JOHANN;
KASTNER, PETER;
LATINI, ROBERTO;
MASSON, SERGE;
WIENHUES-THELEN, URSULA-HENRIKE;
ZIEGLER, ANDRE;
DIETRICH, MANUEL y
SCHOTTEN, ULI

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 817 087 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

ESM-1 (endocan) circulante en la evaluación de la fibrilación auricular

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la fibrilación auricular en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de determinar la cantidad de ESM-1 en una muestra del sujeto y comparar la cantidad de ESM-1 con una cantidad de referencia, con lo que se evalúa la fibrilación auricular.

10 La fibrilación auricular (FA) es el tipo más común de arritmia cardíaca y una de las afecciones más extendidas entre la población anciana. La fibrilación auricular se caracteriza por latidos cardíacos irregulares y, a menudo, comienza con breves periodos de latidos anómalos que se pueden incrementar en el tiempo y se puede convertir en una afección permanente. Se estima que 2,7-6,1 millones de personas en los Estados Unidos tienen fibrilación auricular y aproximadamente 33 millones de personas a nivel mundial (Chugh SS. *et al*, *Circulation* 2014;129:837-47). Los pacientes con FA tienen una mayor tasa de apoplejía y tienen mayor riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca congestiva en comparación con los pacientes en ritmo sinusal.

15 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. Las pautas para la clasificación de la fibrilación auricular de acuerdo con el American College of Cardiology (ACC), la American Heart Association (AHA) y la European Society of Cardiology (ESC) se basan principalmente en la simplicidad y en la pertinencia clínica. La primera categoría se llama "FA detectada por primera vez". A las personas en esta categoría se les diagnostica inicialmente FA y pueden haber tenido o no episodios previos no detectados. Si un episodio detectado por primera vez se interrumpe por sí solo en menos de una semana, pero más tarde está seguido de otro episodio, la categoría cambia a "FA paroxística". Aunque los pacientes en esta categoría tienen episodios que duran hasta 7 días, en la mayoría de los casos de FA paroxística los episodios se interrumpirán en menos de 24 horas. Si el episodio dura más de una semana, se clasifica como "FA persistente". Si un episodio de este tipo no se puede interrumpir, es decir, por cardioversión eléctrica o farmacológica, y continúa durante más de un año, la clasificación se cambia a "FA permanente". Se desea enormemente un diagnóstico precoz de fibrilación auricular debido a que la fibrilación auricular es un importante factor de riesgo para apoplejía y embolia sistémica (Hart *et al.*, *Ann Intern Med* 2007; 20 146(12): 857-67; Go AS *et al.* *JAMA* 2001; 285(18): 2370-5). Los documentos WO2013/057135 y WO2014/072500 divulgan el uso de un péptido natriurético en el diagnóstico de FA.

25 ESM-1 (también conocido como endocan) es un proteoglicano compuesto por un polipéptido maduro de 20 kDa y una cadena de glucano unida a O de 30 kDa (Bechard D *et al.*, *J Biol Chem* 2001; 276(51):48341-48349). Tanto los carboxilatos como los sulfatos de la cadena de glucano están cargados de forma negativa a pH fisiológico, proporcionando así sitios de unión para las moléculas de señalización que comprenden aminoácidos cargados de forma positiva, tales como factores de crecimiento y citocinas (Roudnicky F *et al.*, *Cancer Res.* 2013; 73(3): 1097-106). La expresión biológica de ESM-1 y liberación de las células endoteliales está altamente inducida por los mediadores angiogénicos VEGF-A, VEGF-C, FGF-2, PI3K y citocinas implicados en la progresión del cáncer, pero también por los procesos inflamatorios (sepsis) (Kali A *et al.*; *Indian J Pharmacol.* 2014 46(6): 579-583). ESM-1 se une a y regula por incremento factores de crecimiento proangiogénicos tales como FGF-2 y HGF mediando, de este modo, en la migración y proliferación incrementadas de células endoteliales. Las variantes de endocan que carecen de la cadena de glucano no lograron inducir la activación de HGF, lo que pone de relieve el papel del glucano (Delehedde M *et al.*; *Int J Cell Biol.* 2013:705027). ESM-1 se une a la integrina LFA-1 (CD11a/CD18) sobre la superficie celular de linfocitos, monocitos, células Jurkat sanguíneas con el reclutamiento de linfocitos circulantes en sitios inflamatorios y la adhesión y activación de leucocitos dependientes de LFA-1.

35 Se ha descubierto el ESM soluble como un marcador de riesgo de disfunción endotelial en diferentes tipos de cáncer. Además, se evaluó el marcador en relación con diferentes afecciones o enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, se ha medido ESM-1 en relación con la hipertensión (Balta S *et al.*; *Angiology.* 2014; 65(9):773-7), arteriopatía coronaria, así como infarto de miocardio (Kose M *et al*; *Angiology.* 2015, 66(8):727-31). ESM-1 es un marcador inmunoinflamatorio potencial que se puede vincular a cardiovascular patología (Balta S. *et al*: "Endocan: A novel inflammatory indicator in cardiovascular disease?", *Atherosclerosis*, 243 (1), sep. 2015, 339-343). Además, se midió el marcador en diabéticos (Arman Y *et al.*, *Angiology.* Mar. de 2016; 67(3):239-44). La medición en diversos estadios de nefropatía crónica dio lugar a la conclusión de que este marcador también podría ser útil para predecir acontecimientos cardiovasculares y la mortalidad en la nefropatía crónica (Yilmaz MI *et al.*, *Kidney Int.* 2014; 86(6): 1213-20).

40 Mosevoll *et al.* (Springerplus. 30 de sep. de 2014; 3:571) analizaron endocan y E-selectina en pacientes con sospecha de flebotrombosis profunda. Los niveles plasmáticos de endocan y E-selectina no difirieron entre pacientes con trombosis, los controles sanos y los pacientes sin trombosis verificada (es decir, pacientes con otras causas de sus síntomas, incluyendo diversas afecciones inflamatorias y no inflamatorias). Sin embargo, se pudo usar el uso combinado de biomarcadores endoteliales, proteína C-reactiva y dímero D para identificar subconjuntos de pacientes con diferentes frecuencias de flebotrombosis. Los niveles incrementados de endocan en pacientes con embolia pulmonar masiva se debieron principalmente a la embolia en lugar de a la trombosis original y/o la circulación afectada con hipertensión pulmonar/insuficiencia cardíaca derecha. Los autores llegan a la conclusión

de que "los niveles incrementados de endocan en pacientes con embolia pulmonar masiva se deben principalmente a la embolia en lugar de a la trombosis original y/o la circulación afectada con hipertensión pulmonar/insuficiencia cardíaca derecha" (Mosevoll *et al.* SpringerPlus 2014, 3:571).

5 Además, la liberación de endocan en la sangre también se ha considerado un biomarcador de disfunción endotelial, alteraciones en la permeabilidad vascular y gravedad de la sepsis (Chelazzi C *et al.*; Crit Care. 2015; 19(1): 26). Además de los procesos inflamatorios, también se ha demostrado que endocan se expresa durante el proceso de angiogénesis (Matano F *et al.*; J Neurooncol. Mayo de 2014; 117(3):485-91).

10 Un resumen de la conferencia de Menon *et al.* describe el efecto de la inactivación para ESM-1 en el modelo de ratón. Los autores observaron aurículas dilatadas. Además, también se observó una regulación por incremento de nppa, nppb y myh7 en corazones con genes inactivados. Los autores llegan a la conclusión de que la alteración de ESM-1 daría como resultado la disfunción cardíaca (Abstract 19140: Targeted Disruption of Endothelial Specific Molecule (ESM)-1 Results in Atrioventricular Valve Malformations Leading to Cardiac Dysfunction. Prashanthi Menon, Katherine Spokes, David Beeler, Lauren Janes y William Aird, Circulation. 2012; 126: A19140, volumen 126, suplemento del ejemplar 21; 20 de noviembre de 2012/Abstracts From the American Heart Association 2012 Scientific Sessions and Resuscitation Science Symposium)

20 Chang Xiong *et al.* midieron los niveles de endocan en pacientes con hipertensión. Se describió que el marcador se incrementaba en pacientes hipertensos frente a los no hipertensos. Entre el grupo con hipertensión, aquellos pacientes con arteriopatía coronaria AC tenían mayores niveles que aquellos sin ella (Chang Xiong *et al.*, Elevated Human Endothelial Cell-Specific Molecule-1 Level and Its Association With Coronary Artery Disease in Patients With Hypertension. J Investig Med. Oct. de 2015; 63(7):867-70)

25 Qiu *et al.* midieron ESM1 en pacientes con diabetes *mellitus* de tipo 2 con infarto agudo de miocardio IAMCEST (Qiu *et al.*, Angiology. 28 de feb. 2016, pii: 0003319716634581). Los autores describen una diferencia en el nivel sérico de ESM-1 entre el grupo con diabetes *mellitus* de tipo 2 con IAMCEST (infarto de miocardio con elevación del segmento ST) y un grupo con diabetes *mellitus* de tipo 2 sin enfermedad vascular. La determinación de la disfunción endotelial predice el riesgo cardiovascular como para infarto de miocardio.

30 Cimen *et al.* investigaron la relación entre la arteriopatía coronaria (AC) obstructiva, la angina microvascular (AMV) y los niveles plasmáticos de endocan (Angiology. 6 de enero de 2016, pii: 0003319715625827). Los pacientes, por ejemplo, con fibrilación auricular no se analizaron. Los pacientes con AC con angina microvascular AMV mostraron un incremento de Esm1 en comparación con los controles con AC. Los autores proponen que el marcador podría servir como indicador de disfunción endotelial antes de cardiovasculopatías sintomáticas.

40 Madhivathanan *et al.* analizaron la cinética de endocan en pacientes con cirugía cardíaca con respecto a lesión pulmonar aguda como una complicación de la cirugía cardíaca (cirugía de revascularización, así como compleja). Los autores llegan a la conclusión de que las concentraciones de endocan de referencia son mayores en pacientes hipertensos con estenosis crítica de la arteria coronaria y de que las concentraciones de endocan se incrementarían después de la inducción de la anestesia, pero disminuirían cuatro horas después de la separación de CEC (Cytokine. Julio de 2016; 83: 8-12. doi: 10.1016/j.cyto.2016.03.006).

45 El documento WO1999/45028 describe dos anticuerpos monoclonales específicos para detectar ESM-1.

El documento WO2002/39123 describe un kit para detectar la proteína ESM-1 y el uso de ESM-1 para detectar las degeneraciones *in vitro* en la pared vascular endotelial en seres humanos para la cuantificación de la proteína ESM-1 *in vitro* en un paciente tratado con un compuesto inmunosupresor y para la cuantificación *in vitro* de ESM-1 en un paciente que padece cáncer.

50 El documento WO2012/098219 describe ESM- como un marcador para predecir el riesgo de insuficiencia respiratoria, insuficiencia renal y trombocitopenia en un paciente séptico.

55 El documento WO 2014/135488 describe ESM-1 como un marcador para identificar un síndrome gestacional (por ejemplo, preeclampsia y RCIU).

Latini *et al.* (J Intern Med. Feb. de 2011; 269(2): 160-71) midieron diversos biomarcadores circulantes en pacientes con fibrilación auricular.

60 Existe una necesidad de obtener procedimientos fiables para la evaluación de la fibrilación auricular, incluyendo el diagnóstico de fibrilación auricular, la estratificación del riesgo de pacientes con fibrilación auricular, la evaluación de la gravedad de la fibrilación auricular y la evaluación de un tratamiento en pacientes con fibrilación auricular.

65 El problema técnico que subyace a la presente invención se puede ver como la provisión de procedimientos para satisfacer las necesidades mencionadas anteriormente. El problema técnico se resuelve por los modos de realización caracterizados en las reivindicaciones y a continuación en el presente documento.

De forma ventajosa, en el contexto de los estudios de la presente invención, se descubrió que la determinación de la cantidad de ESM-1 en una muestra de un sujeto permite una evaluación de la fibrilación auricular mejorada. Gracias a la presente invención, se puede diagnosticar, por ejemplo, si un sujeto padece fibrilación auricular o no. Además, se puede diferenciar, por ejemplo, entre fibrilación auricular paroxística y persistente en un sujeto que padece fibrilación auricular.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la fibrilación auricular en un sujeto, que comprende las etapas de

- a) determinar la cantidad de ESM-1 en una muestra del sujeto, y
- b) comparar la cantidad de ESM-1 con una cantidad de referencia, con lo que se evalúa la fibrilación auricular.

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

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la fibrilación auricular en un sujeto, que comprende las etapas de

- a) determinar las cantidades de ESM-1 y la cantidad de un péptido natriurético en una muestra del sujeto, y
- b) comparar las cantidades con las cantidades de referencia, con lo que se evalúa la fibrilación auricular.

La evaluación de la fibrilación auricular (FA) se basará en los resultados de la etapa b) de comparación.

En consecuencia, la presente invención comprende preferentemente las etapas de

- a) determinar la cantidad de ESM-1, y opcionalmente la cantidad de un péptido natriurético, en una muestra del sujeto,
- b) comparar la cantidad de ESM-1 con una cantidad de referencia y opcionalmente comparar la cantidad del péptido natriurético con una cantidad de referencia, y
- c) evaluar la fibrilación auricular en base a los resultados de la etapa b) de comparación.

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*. Además, puede comprender etapas además de las mencionadas anteriormente de forma explícita. Por ejemplo, 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 manualmente o estar asistido por automatización. Preferentemente la etapa (a), (b) y/o (c) puede estar asistida total o parcialmente por 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).

De acuerdo con la presente invención, se evaluará la fibrilación auricular. El término "evaluar la fibrilación auricular" como se usa en el presente documento se refiere preferentemente al diagnóstico de fibrilación auricular, la diferenciación entre fibrilación auricular paroxística y persistente, la predicción de un riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular o la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular.

Como se entenderá por los expertos en la técnica, la evaluación de la presente invención normalmente no pretende ser correcta para un 100 % de los sujetos que se van a someter a prueba. El término requiere preferentemente que se pueda realizar una evaluación correcta (tal como el diagnóstico, diferenciación, identificación de la predicción o evaluación de un tratamiento como se hace referencia en el presente documento) para una parte estadísticamente significativa de sujetos. Se puede determinar si una parte es estadísticamente significativa sin más preámbulos 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, New York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son al menos de 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 se podrían incrementar en diversas enfermedades y trastornos.

5 Esto también se aplica a ESM-1 que, por ejemplo, es conocido que se incrementa en pacientes con cáncer. Sin embargo, esto se tiene en cuenta por el experto en la técnica. En consecuencia, la "evaluación de la fibrilación auricular" se entiende como una ayuda en la evaluación de la fibrilación auricular, y, por tanto, como una ayuda en el diagnóstico de fibrilación auricular, una ayuda en la diferenciación entre fibrilación auricular paroxística y persistente, una ayuda en la predicción de un riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular, o como una ayuda en la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular.

10 En un modo de realización preferente de la presente invención, la evaluación de la fibrilación auricular es el diagnóstico de fibrilación auricular. En consecuencia, se diagnostica si un sujeto padece fibrilación auricular o no.

En consecuencia, la presente invención contempla un procedimiento para diagnosticar la fibrilación auricular en un sujeto, que comprende las etapas de

- 15 a) determinar la cantidad de ESM-1 en una muestra del sujeto, y
 b) comparar la cantidad de ESM-1 con una cantidad de referencia, con lo que se diagnostica la fibrilación auricular.

20 En un modo de realización, el procedimiento mencionado anteriormente comprende las etapas de:

- 20 a) determinar las cantidades de ESM-1 y un péptido natriurético en una muestra del sujeto, y
 b) comparar las cantidades de ESM-1 y el péptido natriurético con las cantidades de referencia, con lo que se diagnostica la fibrilación auricular.

25 Preferentemente el sujeto que se va a someter a prueba en relación con el procedimiento para el diagnóstico de fibrilación auricular es un sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular. Sin embargo, también se contempla que al sujeto ya se le haya diagnosticado previamente como que padecía FA y que el diagnóstico previo se confirme llevando a cabo el procedimiento de la presente invención.

30 En otro modo de realización preferente de la presente invención, la evaluación de la fibrilación auricular es la diferenciación entre fibrilación auricular paroxística y persistente. En consecuencia, se determina si un sujeto padece fibrilación auricular paroxística o persistente.

35 En consecuencia, la presente invención contempla un procedimiento para diferenciar entre fibrilación auricular paroxística y persistente en un sujeto, que comprende las etapas de

- 40 a) determinar la cantidad de ESM-1 en una muestra del sujeto, y
 b) comparar la cantidad de ESM-1 con una cantidad de referencia, con lo que se diferencia entre fibrilación auricular paroxística y persistente.

En un modo de realización, el procedimiento mencionado anteriormente comprende las etapas de:

- 45 a) determinar las cantidades de ESM-1 y un péptido natriurético en una muestra del sujeto, y
 b) comparar las cantidades de ESM-1 y el péptido natriurético con las cantidades de referencia, con lo que se diferencia entre fibrilación auricular paroxística y persistente.

50 En otro modo de realización preferente de la presente invención, la evaluación de la fibrilación auricular es la predicción del riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular. En consecuencia, se predice si un sujeto tiene riesgo y/o no tiene riesgo de dicho acontecimiento adverso.

55 Por tanto, la presente invención contempla un procedimiento para predecir el riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular en un sujeto, que comprende las etapas de

- 60 a) determinar la cantidad de ESM-1 en una muestra del sujeto, y
 b) comparar la cantidad de ESM-1 con una cantidad de referencia, con lo que se predice el riesgo del acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular.

En un modo de realización, el procedimiento mencionado anteriormente comprende las etapas de:

- 65 a) determinar las cantidades de ESM-1 y un péptido natriurético en una muestra del sujeto, y
 b) comparar las cantidades de ESM-1 y el péptido natriurético con las cantidades de referencia, con lo que se

predice el riesgo del acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular.

En otro modo de realización preferente de la presente invención, la evaluación de la fibrilación auricular es la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular.

5

En consecuencia, la presente invención contempla un procedimiento para la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular en un sujeto, que comprende las etapas de

a) determinar la cantidad de ESM-1 en una muestra del sujeto, y

10

b) comparar la cantidad de ESM-1 con una cantidad de referencia, con lo que se evalúa el tratamiento para la fibrilación auricular.

En un modo de realización, el procedimiento mencionado anteriormente comprende las etapas de:

15

a) determinar las cantidades de ESM-1 y un péptido natriurético en una muestra del sujeto, y

20

b) comparar las cantidades de ESM-1 y el péptido natriurético con las cantidades de referencia, con lo que se evalúa el tratamiento para la fibrilación auricular.

25

Preferentemente el sujeto en relación con la diferenciación mencionada anteriormente, la predicción mencionada anteriormente y la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular es un sujeto que padece fibrilación auricular, en particular, que se sabe que padece fibrilación auricular (y, por tanto, que tiene antecedentes conocidos de fibrilación auricular). Sin embargo, con respecto al procedimiento de predicción mencionado anteriormente, también se contempla que el sujeto no tenga antecedentes conocidos de fibrilación auricular.

30

El término "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. 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 desorganizados y rápidos que dan como resultado latidos cardíacos irregulares. Los síntomas de fibrilación auricular son palpitations 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.

35

40

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

45

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. El episodio de fibrilación auricular cesa de forma espontánea, es decir, sin intervención médica. Tanto la FA persistente como paroxística pueden ser recidivantes, con lo que se proporciona la distinción de FA paroxística y persistente por las lecturas de ECG: cuando un paciente ha tenido 2 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.

50

55

60

El "sujeto" como se hace referencia en el presente documento es preferentemente un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (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). Preferentemente el sujeto es un sujeto humano.

65

Preferentemente el sujeto que se va a someter a prueba tiene cualquier edad, más 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.

5 En un modo de realización preferente del procedimiento de evaluación de la fibrilación auricular, el sujeto que se va a someter a prueba padecerá fibrilación auricular. En consecuencia, el sujeto tendrá antecedentes conocidos de fibrilación auricular. Por tanto, el sujeto habrá experimentado episodios de fibrilación auricular antes de obtener la muestra de prueba y al menos uno de los episodios previos de fibrilación auricular se habrá diagnosticado, por ejemplo, por ECG. Por ejemplo, se contempla que el sujeto padece fibrilación auricular si la evaluación de la fibrilación auricular es la diferenciación entre fibrilación auricular paroxística y persistente, o si la evaluación de la fibrilación auricular es la predicción de un riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular o si la evaluación de la fibrilación auricular es la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular.

10 En otro modo de realización preferente del procedimiento de evaluación de la fibrilación auricular, se sospecha que el sujeto que se va a someter a prueba padece fibrilación auricular, por ejemplo, si la evaluación de la fibrilación auricular es el diagnóstico de fibrilación auricular.

15 Preferentemente un sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular es un sujeto que ha mostrado al menos un síntoma de fibrilación auricular antes de llevar a cabo el procedimiento para evaluar la fibrilación auricular. 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. Preferentemente el sujeto ha mostrado al menos un síntoma de fibrilación auricular dentro de los seis meses antes de obtener la muestra.

20 De forma alternativa o adicionalmente, un sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular será un sujeto que tiene 70 años o más.

25 Preferentemente el sujeto que se sospecha que padece fibrilación auricular no tendrá antecedentes conocidos de fibrilación auricular.

30 De acuerdo con la presente invención, un sujeto que no tiene antecedentes conocidos de fibrilación auricular es preferentemente un sujeto al que no se le ha diagnosticado como que padecía fibrilación auricular previamente, 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.

35 En un modo de realización preferente de la presente invención, el sujeto que se va a someter a prueba no padece fibrilación auricular permanente. Por tanto, es preferente que el término "fibrilación auricular" solo se refiera a fibrilación auricular paroxística y persistente.

40 Como se expone anteriormente, el biomarcador ESM-1 se podría incrementar en diversas enfermedades y trastornos distintos de fibrilación auricular. En un modo de realización de la presente invención, se contempla que el sujeto no padezca dichas enfermedades y trastornos. Por ejemplo, se contempla que el sujeto no padecerá nefropatía crónica, diabetes, cáncer, arteriopatía coronaria, hipertensión y/o insuficiencia renal que requiera diálisis. Además, se contempla que el sujeto no tenga antecedentes de apoplejía.

45 En un modo de realización de la evaluación de la fibrilación auricular, el sujeto que se va a someter a prueba de acuerdo con el procedimiento de evaluación de la fibrilación auricular no padece insuficiencia cardíaca. El término "insuficiencia cardíaca" se define en relación con el procedimiento de diagnóstico de insuficiencia cardíaca. La definición se aplica en consecuencia.

50 En un modo de realización alternativo de la evaluación de la fibrilación auricular, el sujeto puede padecer o padece insuficiencia cardíaca.

55 El sujeto que se va a someter a prueba puede experimentar o no episodios de fibrilación auricular cuando se obtiene la muestra. Por tanto, en un modo de realización preferente de la evaluación de la fibrilación auricular (tal como en el diagnóstico de fibrilación auricular), el sujeto no experimenta episodios de fibrilación auricular cuando se obtiene la muestra. Por tanto, el sujeto tendrá un ritmo sinusal normal cuando se obtiene la muestra. Por tanto, es posible el diagnóstico de fibrilación auricular incluso en ausencia (temporal) de fibrilación auricular. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la elevación de endocan se debe mantener después del episodio de fibrilación auricular y, por tanto, proporciona un diagnóstico de un sujeto que ha padecido fibrilación auricular. Preferentemente el diagnóstico de FA dentro de aproximadamente tres días, dentro de aproximadamente un mes, dentro de aproximadamente tres meses o dentro de aproximadamente 6 meses después de llevar a cabo el procedimiento de la presente invención (o, para ser más precisos, después de que se haya obtenido la muestra). En un modo de realización preferente, es viable el diagnóstico de fibrilación auricular dentro de aproximadamente seis meses después del episodio. En un modo de realización preferente, es viable el diagnóstico de fibrilación auricular dentro de aproximadamente seis meses después del episodio. En consecuencia, la evaluación de la fibrilación auricular como se hace referencia en el presente documento, en particular, el diagnóstico, la predicción del riesgo o la diferenciación como se hace referencia en el presente documento en relación con la evaluación de

la fibrilación auricular se lleva a cabo preferentemente después de aproximadamente tres días, más preferentemente después de aproximadamente un mes, incluso más preferentemente después de aproximadamente tres meses y lo más preferentemente después de aproximadamente seis meses después del último episodio de fibrilación auricular. En consecuencia, se contempla que la muestra que se va a someter a prueba se obtenga preferentemente después de aproximadamente tres días, más preferentemente después de aproximadamente un mes, incluso más preferentemente después de aproximadamente tres meses y lo más preferentemente después de aproximadamente seis meses después del último episodio de fibrilación auricular. En consecuencia, el diagnóstico de fibrilación auricular también engloba preferentemente el diagnóstico de episodios de fibrilación auricular que se produjeron preferentemente dentro de aproximadamente tres días, más preferentemente dentro de aproximadamente tres meses y lo más preferentemente dentro de aproximadamente seis meses antes de que se obtuviera la muestra.

Sin embargo, también se contempla que el sujeto experimente episodios de fibrilación auricular cuando se obtiene la muestra (por ejemplo, con respecto a la predicción de apoplejía).

El procedimiento de la presente invención también se puede usar para el cribado de poblaciones de sujetos más grandes. Por lo tanto, se contempla que se evalúen al menos 100 sujetos, en particular, al menos 1000 sujetos con respecto a fibrilación auricular. Por tanto, se determina la cantidad del biomarcador en muestras de al menos 100, o, en particular, de al menos 1000 sujetos. Además, se contempla que se evalúen al menos 10.000 sujetos.

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 muestras de sangre, plasma, suero, orina, líquido linfático, esputo, ascitis o cualquier otra secreción corporal o derivado de la misma. Se pueden obtener muestras de tejidos u órganos 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. Por ejemplo, se pueden obtener muestras de células, tejidos u órganos de las células, tejidos u órganos que expresan o producen el biomarcador. La muestra puede estar congelada, fresca, fijada (por ejemplo, fijada con formol), centrifugada y/o incluida (por ejemplo, incluida en parafina), etc. La muestra de células, por supuesto, se puede someter a una variedad de técnicas preparativas y de almacenamiento bien conocidas posteriores a su recogida (por ejemplo, extracción de ácidos nucleicos y/o proteína, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación, etc.) antes de evaluar la cantidad del/de los biomarcador(es) en la muestra.

En un modo de realización preferente de la presente invención, 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).

El biomarcador molécula específica de células endoteliales 1 (abreviado ESM-1) es bien conocido en la técnica. El biomarcador también se denomina con frecuencia endocan. La proteína secretada ESM-1 se expresa en las células endoteliales en los tejidos pulmonar y renal humanos. Los datos de dominio público sugieren en tejido tiroideo, pulmonar y renal, aunque también cardíaco, véase, por ejemplo, la entrada para ESM-1 en la base de datos de ProteinAtlas (M. Uhlén *et al.*, Science 347, 1260419 (2015). DOI: 10.1126/science.1260419). La expresión de este gen se regula por las citocinas. ESM-1 es un proteoglicano compuesto por un polipéptido maduro de 20 kDa y una cadena de glucano unida a O de 30 kDa (Bechard D *et al.*, J Biol Chem 2001; 276(51):48341-48349).

En un modo de realización preferente de la presente invención, la cantidad del polipéptido ESM-1 humano se determina en una muestra del sujeto. La secuencia del polipéptido ESM-1 humano es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Lassale *et al.* J. Biol. Chem. 271:20458-20464 (1996) y se puede evaluar, por ejemplo, por medio de Uniprot, véase Q9NQ30 (ESM1_HUMAN). Dos isoformas de ESM-1 producidas por empalme alternativo, la isoforma 1 (que tiene el identificador de Uniprot Q9NQ30-1) y la isoforma 2 (que tiene el identificador de Uniprot Q9NQ30-2). La isoforma 1 tiene una longitud de 184 aminoácidos. En la isoforma 2, faltan los aminoácidos de 101 a 150 de la isoforma 1. Los aminoácidos 1 a 19 forman el péptido señal (que se podría escindir).

En un modo de realización preferente, se determina la cantidad de isoforma 1 del polipéptido ESM-1, es decir, la isoforma 1 que tiene una secuencia como se muestra bajo el número de acceso a UniProt Q9NQ30-1.

En otro modo de realización preferente, se determina la cantidad de isoforma 2 del polipéptido ESM-1, es decir, la isoforma 2 que tiene una secuencia como se muestra bajo el número de acceso a UniProt Q9NQ30-2.

En otro modo de realización preferente, se determina la cantidad de isoforma 1 e isoforma 2 del polipéptido ESM-1, es decir, el ESM-1 total.

Por ejemplo, se podría determinar la cantidad de ESM-1 con un anticuerpo monoclonal (tal como un anticuerpo de ratón) frente a los aminoácidos de 85 a 184 del polipéptido ESM-1 y/o con un anticuerpo policlonal de cabra.

El término "péptido natriurético" comprende péptidos de tipo péptido natriurético auricular (ANP) y de tipo péptido natriurético cerebral (BNP). Por tanto, los péptidos natriuréticos de acuerdo con la presente invención comprenden péptidos de tipo ANP y de tipo BNP y variantes de los mismos (véase, por ejemplo, Bonow, R. O. (1996). *New insights into the cardiac natriuretic peptides*. *Circulation* 93: 1946-1950).

Los péptidos de tipo ANP comprenden pre-proANP, proANP, NT-proANP y ANP.

Los péptidos de tipo BNP comprenden pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP y BNP.

El 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, 28 aminoácidos en el caso de ANP).

Los péptidos natriuréticos preferentes de acuerdo con la presente invención son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP. ANP y BNP son las hormonas activas y tienen una semivida más corta que sus respectivas homólogas inactivas, NT-proANP y NT-proBNP. BNP se metaboliza en la sangre, mientras que NT-proBNP circula en la sangre como una molécula intacta y, como tal, se elimina por vía renal.

Los procedimientos preanalíticos son más sólidos con NT-proBNP, lo que permite un fácil transporte de la muestra a un laboratorio central (Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. *Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples*. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 942-4.). Las muestras de sangre se pueden almacenar a temperatura ambiente durante varios días o se pueden enviar por correo o hacer llegar sin pérdida en su obtención. Por el contrario, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4 °C da lugar a una pérdida de concentración de al menos un 20 % (Mueller T, Gegenhuber A, *et al.*, *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 942-4, *supra*; Wu A H, Packer M, Smith A, Bijou R, Fink D, Mair J, Wallentin L, Johnston N, Feldcamp C S, Haverstick D M, Ahnadi C E, Grant A, Despres N, Bluestein B, Ghani F. *Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study*. *Clin Chem* 2004; 50: 867-73.). Por lo tanto, dependiendo de la evolución en el tiempo o propiedades de interés, cualquier medición de las formas activas o bien de las inactivas del péptido natriurético puede ser ventajosa.

Los péptidos natriuréticos lo más preferentes de acuerdo con la presente invención son NT-proBNP y BNP, en particular, NT-proBNP. Como se analiza anteriormente en resumen, el NT-proBNP humano como se hace referencia de acuerdo con la presente invención es un polipéptido que comprende preferentemente 76 aminoácidos de longitud correspondientes a la parte 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, los documentos WO 02/089657, WO 02/083913 y Bonow 1996, *New Insights into the cardiac natriuretic peptides*. *Circulation* 93: 1946-1950. 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 término "determinar" la cantidad de un biomarcador como se hace referencia en el presente documento (tal como ESM-1 o el péptido natriurético) se refiere a la cuantificación del biomarcador, por ejemplo, para medir 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 de manera intercambiable.

En un modo de 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.

Los biomarcadores como se hace referencia en el presente documento (tal como ESM-1) se pueden detectar usando procedimientos, en general, conocidos 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 inmunoelectrotransferencias e inmunoanálisis, como ELISA, RIA, inmunoanálisis basados en fluorescencia y luminiscencia y ensayos por extensión de proximidad, que están disponibles comercialmente. Otros procedimientos adecuados para detectar biomarcadores 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,

5 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™).

10 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.ºs 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.

15 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.

20 En un modo de 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 un modo de 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 un modo de realización, dicho marcador de iridio es un complejo como se divulga en el documento WO 2012/107419.

25 En un modo de realización del ensayo de tipo sándwich para la determinación de ESM-1, el ensayo comprende un primer anticuerpo monoclonal biotilado que se une específicamente a ESM-1 (como anticuerpo de captura) y un fragmento F(ab')₂ rutenilado de un segundo anticuerpo monoclonal que se une específicamente a ESM-1 como anticuerpo de detección. Los dos anticuerpos forman complejos de inmunoanálisis de tipo sándwich con ESM-1 en la muestra.

30 En un modo de realización del ensayo de tipo sándwich para la determinación del péptido natriurético, el ensayo comprende un primer anticuerpo monoclonal biotilado que se une específicamente al péptido natriurético (como anticuerpo de captura) y un fragmento F(ab')₂ rutenilado de un segundo anticuerpo monoclonal que se une específicamente al péptido natriurético como anticuerpo de detección. Los dos anticuerpos forman complejos de inmunoanálisis de tipo sándwich con el péptido natriurético en la muestra.

35 La medición de la cantidad de un polipéptido (tal como ESM-1 o el péptido natriurético) 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 un modo de 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 de analizador de dicho sistema o por más de una unidad de analizador en comunicación funcional entre sí. Por ejemplo, de acuerdo con un modo de realización específico, dicho sistema divulgado en el presente documento puede incluir una primera unidad de analizador para realizar dichas etapas de poner en contacto y retirar y una segunda unidad de analizador, conectada de forma funcional a dicha primera unidad de analizador por una unidad de transporte (por ejemplo, un brazo robot), que realiza dicha etapa de medir.

40 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) de un agente de unión terciario que se une al agente de unión secundario. Los agentes de unión secundario y de mayor orden 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 mayor orden. Las marcas adecuadas incluyen biotina, digoxigenina, marca His, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, marcador 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-nitroazul-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 pueden determinar 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, rojo Texas, 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 determinar, también preferentemente, como sigue: (a) poner 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) medir 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. Aún en un 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.

Los términos "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", "agentes de detección", "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 (ANP) o compuesto químico. Un agente preferente es un anticuerpo que se une específicamente al biomarcador que se va a determinar. 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

multiespecíficos (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 (o un fragmento de unión a antígeno del mismo). Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal (o un fragmento de unión a antígeno, por lo tanto, además, como se describe en otra parte en el presente documento, se contempla que se usen dos anticuerpos monoclonales que se unen en diferentes posiciones de ESM-1 (en un inmunoanálisis de tipo sándwich). Por tanto, se usa al menos un anticuerpo para la determinación de la cantidad de ESM-1.

En un modo de realización, el al menos un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de ratón. En otro modo de realización, el al menos un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de conejo. En otro modo de realización, el anticuerpo es anticuerpo policlonal de cabra. En incluso otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal de oveja.

El término "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.

En un modo de realización, el procedimiento de la presente invención se basa en la detección de un complejo de proteína que comprende ESM-1 humano y un agente de unión específica para ESM-1 no humano o quimérico. En dicho modo de realización, la presente invención se lee sobre un procedimiento para evaluar la fibrilación auricular en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de (a) incubar una muestra de dicho sujeto con un agente de unión específica para ESM-1 no humano (b) medir el complejo entre el agente de unión específica para ESM-1 y ESM-1 formado en (a) y (c) comparar la cantidad medida del complejo con una cantidad de referencia. Una cantidad del complejo en o por encima de la cantidad de referencia es indicativa para el diagnóstico (y, por tanto, la presencia) de fibrilación auricular, la presencia de fibrilación auricular persistente o un sujeto que tiene riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular. Una cantidad del complejo por debajo de la cantidad de referencia es indicativa para la ausencia de fibrilación auricular, la presencia de fibrilación auricular paroxística o un sujeto que no tiene riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular.

El término "cantidad" como se usa en el presente documento engloba la cantidad absoluta de un biomarcador como se hace referencia en el presente documento (tal como ESM-1 o el péptido natriurético), la cantidad o concentración relativa del dicho biomarcador, así como cualquier valor o parámetro que se correlacione con la misma o se pueda obtener de la misma. 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 determinadas a partir de sistemas de lectura biológicos en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidas de ligandos unidos específicamente. 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 biomarcador (tal como ESM-1 y el péptido natriurético, tal como NT-proBNP o BNP) en la muestra del sujeto con la cantidad de referencia del biomarcador especificada en otra parte en esta descripción. 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 determinada 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 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, proporcionar automáticamente la valoración deseada en un formato de salida adecuado. 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.

De acuerdo con la presente invención, la cantidad del biomarcador ESM-1 y opcionalmente la cantidad del péptido natriurético se compararán con una referencia. La referencia es preferentemente una cantidad de referencia. El término "cantidad de referencia" se entiende bien por el experto en la técnica. Se debe entender que la cantidad de referencia permitirá la evaluación de la fibrilación auricular descrita en el presente documento. Por ejemplo, en relación con el procedimiento para diagnosticar la fibrilación auricular, la cantidad de referencia se refiere preferentemente a una cantidad que permite la asignación de un sujeto (i) al grupo de sujetos que padecen fibrilación auricular o bien (ii) al grupo de sujetos que no padecen fibrilación auricular. 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.

Se debe entender que la cantidad de ESM-1 se compara con una cantidad de referencia para ESM-1, mientras que la cantidad del péptido natriurético se compara con una cantidad de referencia del péptido natriurético. Si se determinan las cantidades de dos marcadores, también se contempla que se calcule una puntuación combinada en base a las cantidades de ESM-1 y el péptido natriurético. En una etapa posterior, se compara la puntuación con una puntuación de referencia.

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 que se dirige a diagnosticar un acontecimiento, o no, se describe mejor por su eficacia diagnóstica (ROC) (véase, especialmente Zweig 1993, Clin. Chem. 39:561-577). El gráfico ROC es una curva de todos los pares sensibilidad frente a especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión en todo el intervalo de datos observados. Los resultados clínicos de un procedimiento de diagnóstico dependen de su exactitud, es decir, su capacidad de asignar correctamente sujetos a un determinado pronóstico o diagnóstico. La curva ROC indica el solapamiento entre las dos distribuciones al representar la sensibilidad frente a $1 -$ especificidad para el intervalo completo de umbrales adecuados para realizar una distinción. En el eje y está la sensibilidad, o la fracción de 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. Se calcula exclusivamente 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 de positivos falsos. Es un índice de especificidad y se calcula en su totalidad a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de positivos verdaderos 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 (ningún solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene una curva ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, donde la fracción de positivos verdaderos es 1,0 o un 100 % (sensibilidad perfecta) y la fracción de positivos falsos es 0 (especificidad perfecta). La curva teórica para una prueba sin ninguna discriminación (distribuciones de resultados idénticas para los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha. 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, la referencia que se va a usar para el procedimiento de la presente invención, es decir, un umbral que permite evaluar la fibrilación auricular, se puede generar preferentemente estableciendo una ROC para dicha cohorte como se describe anteriormente y obteniendo 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, por ejemplo, excluir a un sujeto de que padezca fibrilación auricular (es decir, un descarte), mientras que se contempla una especificidad óptima para que se evalúe a un sujeto como que padece fibrilación auricular (es decir, una inclusión). En un modo de realización, el procedimiento de la presente invención permite la predicción de que un sujeto tenga riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular, tal como la manifestación o recidiva de fibrilación auricular y/o apoplejía.

En un modo de realización preferente, el término "cantidad de referencia" en el presente documento se refiere a un valor predeterminado. Dicho valor predeterminado permitirá evaluar la fibrilación auricular y, por tanto, diagnosticar la fibrilación auricular, diferenciar entre fibrilación auricular paroxística y persistente, predecir el riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular o la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular. Se debe entender que la cantidad de referencia puede diferir en base al tipo de evaluación. Por ejemplo, la cantidad de referencia para ESM-1 para la diferenciación de FA normalmente será mayor que la cantidad de referencia para el diagnóstico de FA. Sin embargo, esto se tendrá en cuenta por el experto en la técnica.

Como se expone anteriormente, el término "evaluar la fibrilación auricular" se refiere preferentemente al

diagnóstico de fibrilación auricular, la diferenciación entre fibrilación auricular paroxística y persistente, la predicción de un riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular o la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular. A continuación, estos modos de realización del procedimiento de la presente invención se describirán en más detalle. Las definiciones anteriores se aplican en consecuencia.

5

Procedimiento para diagnosticar la fibrilación auricular

El término "diagnosticar" como se usa en el presente documento significa evaluar si un sujeto como se hace referencia de acuerdo con el procedimiento de la presente invención padece fibrilación auricular (FA) o no. En un modo de realización, se diagnostica que un sujeto padece FA. En un modo de realización alternativo, se diagnostica que un sujeto no padece FA.

10

El diagnóstico real de si un sujeto padece FA o no puede comprender otras etapas, tales como la confirmación de un diagnóstico (por ejemplo, por ECG, tal como Holter ECG). Por tanto, la presente invención permite evaluar la probabilidad de que un paciente padezca fibrilación auricular. Es probable que un sujeto que tiene una cantidad de ESM-1 por encima de la cantidad de referencia padezca fibrilación auricular, mientras que no es probable que un sujeto que tiene una cantidad de ESM-1 por debajo de la cantidad de referencia padezca fibrilación auricular. En consecuencia, el término "diagnosticar" en el contexto de la presente invención también engloba ayudar al médico a evaluar si un sujeto padece fibrilación auricular o no.

15

Preferentemente una cantidad de ESM-1 (y opcionalmente una cantidad del péptido natriurético) en la muestra de un sujeto de prueba que se incrementa(n) en comparación con la cantidad de referencia (o con las cantidades de referencia) es indicativa para un sujeto que padece fibrilación auricular, y/o una cantidad de ESM-1 (y opcionalmente una cantidad del péptido natriurético) en la muestra de un sujeto que disminuye(n) en comparación con la cantidad de referencia (o las cantidades de referencia) es indicativa para un sujeto que no padece fibrilación auricular.

20

25

En un modo de realización preferente, la cantidad de referencia, es decir, la cantidad de referencia para ESM-1 y, si se determina un péptido natriurético, la cantidad de referencia para el péptido natriurético, permitirá diferenciar entre un sujeto que padece fibrilación auricular y un sujeto que no padece fibrilación auricular. Preferentemente dicha cantidad de referencia es un valor predeterminado.

30

En un modo de realización, el procedimiento de la presente invención permite el diagnóstico de un sujeto que padece fibrilación auricular. Preferentemente el sujeto padece FA si la cantidad de ESM-1 (y opcionalmente la cantidad del péptido natriurético) está(n) por encima de la cantidad de referencia. En un modo de realización, el sujeto padece FA si la cantidad de ESM-1 está por encima de un límite superior de referencia (LSR) de un determinado percentil (por ejemplo, el percentil 99) de una cantidad de referencia.

35

En otro modo de realización preferente, el procedimiento de la presente invención permite el diagnóstico de que un sujeto no padezca fibrilación auricular. Preferentemente el sujeto no padece FA si la cantidad de ESM-1 (y opcionalmente una cantidad del péptido natriurético) está(n) por debajo de la cantidad de referencia (tal como el LSR de un determinado percentil). Por tanto, en un modo de realización, el término "diagnosticar la fibrilación auricular" se refiere a "descartar la fibrilación auricular".

40

Descartar la fibrilación auricular es de particular interés, puesto que se pueden evitar otras pruebas de diagnóstico para el diagnóstico de fibrilación auricular, tal como una prueba de ECG. Por tanto, gracias a la presente invención, se pueden evitar costes sanitarios innecesarios.

45

En consecuencia, la presente invención también se refiere a un procedimiento para descartar la fibrilación auricular, que comprende las etapas de

50

- a) determinar la cantidad de ESM-1 en una muestra del sujeto, y
- b) comparar la cantidad de ESM-1 con una cantidad de referencia, con lo que se descarta la fibrilación auricular.

55

Preferentemente una cantidad del biomarcador ESM-1 en la muestra del sujeto que disminuye en comparación con la cantidad de referencia (tal como una referencia para descartar la fibrilación auricular) es indicativa para un sujeto que no padece fibrilación auricular, y, por tanto, para descartar la fibrilación auricular en el sujeto.

60

Cuando se determinan el biomarcador ESM-1 y el péptido natriurético en combinación, se puede lograr un descarte incluso más fiable. En consecuencia, las etapas a) y b) son preferentemente como sigue:

65

- a) determinar la cantidad de ESM-1 y la cantidad de un péptido natriurético en una muestra del sujeto, y
- b) comparar las cantidades de ESM-1 y el péptido natriurético con las cantidades de referencia, con lo que se

descarta la fibrilación auricular.

Preferentemente las cantidades de ambos biomarcadores, es decir, la cantidad del biomarcador ESM-1 y la cantidad del péptido natriurético, en la muestra del sujeto, que disminuyen en comparación con la respectiva cantidad de referencia (tal como una cantidad de referencia para descartar la fibrilación auricular) son indicativas para un sujeto que no padece fibrilación auricular y, por tanto, para descartar la fibrilación auricular en el sujeto.

En un modo de realización del procedimiento de diagnóstico de fibrilación auricular, dicho procedimiento comprende además una etapa de recomendar y/o iniciar un tratamiento para la fibrilación auricular en base a los resultados del diagnóstico. Preferentemente se recomienda o inicia un tratamiento si se diagnostica que el sujeto padece FA. Los tratamientos preferentes para la fibrilación auricular se divulgan en otra parte en el presente documento.

Procedimiento para diferenciar entre fibrilación auricular paroxística y persistente

El término "diferenciar" como se usa en el presente documento significa distinguir entre fibrilación auricular paroxística y persistente en un sujeto. El término como se usa en el presente documento incluye preferentemente diagnosticar de forma diferencial la fibrilación auricular paroxística y persistente en un sujeto. Por tanto, el procedimiento de la presente invención permite evaluar si un sujeto con fibrilación auricular padece fibrilación auricular paroxística o fibrilación auricular persistente. La diferenciación real puede comprender otras etapas, tales como la confirmación de la diferenciación. Por tanto, el término "diferenciación" en el contexto de la presente invención también engloba ayudar al médico a diferenciar entre FA paroxística y persistente.

Preferentemente una cantidad de ESM-1 (y opcionalmente una cantidad del péptido natriurético) en la muestra de un sujeto que se incrementa(n) en comparación con la cantidad de referencia (o con las cantidades de referencia) es indicativa para un sujeto que padece la fibrilación auricular persistente y/o una cantidad de ESM-1 (y opcionalmente una cantidad del péptido natriurético) en la muestra de un sujeto que disminuye(n) en comparación con la cantidad de referencia (o con las cantidades de referencia) es indicativa para un sujeto que padece fibrilación auricular paroxística.

En un modo de realización preferente, la(s) cantidad(es) de referencia permitirá(n) diferenciar entre un sujeto que padece fibrilación auricular paroxística y un sujeto que padece fibrilación auricular persistente. Preferentemente dicha cantidad de referencia es un valor predeterminado.

Procedimiento para predecir un riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular

El riesgo de un acontecimiento adverso como se expone en el presente documento puede ser la predicción de cualquier acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular. Preferentemente dicho acontecimiento adverso se selecciona de recidiva de fibrilación auricular (tal como la recidiva de fibrilación auricular después de cardioversión) y apoplejía. En consecuencia, se predecirá el riesgo de que un sujeto que padece fibrilación auricular en el futuro padezca un acontecimiento adverso (tal como apoplejía o recidiva de fibrilación auricular).

Además, se contempla que dicho acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular sea la manifestación de fibrilación auricular en un sujeto que no tiene antecedentes conocidos de fibrilación auricular.

Preferentemente el término "predecir el riesgo" como se usa en el presente documento se refiere a evaluar la probabilidad de acuerdo con la que el sujeto padecerá un acontecimiento adverso como se hace referencia en el presente documento. Típicamente se predice si un sujeto tiene riesgo (y, por tanto, tiene riesgo elevado) o no tiene riesgo (y, por tanto, tiene riesgo reducido) de padecer dicho acontecimiento adverso. En consecuencia, el procedimiento de la presente invención permite diferenciar entre un sujeto que tiene riesgo y un sujeto que no tiene riesgo de padecer dicho acontecimiento adverso.

Como se expone anteriormente, se predecirá el riesgo (y la probabilidad) de padecer dicho acontecimiento adverso dentro de un determinado margen de tiempo. En un modo de realización preferente de la presente invención, el margen predictivo es un periodo de aproximadamente tres meses, aproximadamente seis meses o aproximadamente un año. Preferentemente se calcula dicho margen predictivo a partir de la finalización del procedimiento de la presente invención. Más preferentemente, se calcula dicho margen predictivo a partir del punto de tiempo en el que se ha obtenido la muestra que se va a someter a prueba. Como se entenderá por los expertos en la técnica, la predicción de un riesgo normalmente no pretende ser correcta para un 100 % de los sujetos. Sin embargo, el término requiere que se pueda realizar una predicción para una parte estadísticamente significativa de sujetos de una manera apropiada y correcta. Se puede determinar si una parte es estadísticamente significativa sin más preámbulos por el experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de periodos 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, New York 1983. Los periodos de confianza preferentes son al menos de un 90 %, al menos de un 95 %, al menos de un 97 %, al menos de un 98 % o al menos de un 99 %. Los valores de p son preferentemente

0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

En un modo de realización preferente, la expresión "predecir el riesgo de padecer dicho acontecimiento adverso" significa que el sujeto que se va a analizar por el procedimiento de la presente invención se asigna al grupo de sujetos que tienen riesgo de padecer dicho acontecimiento adverso o bien al grupo de sujetos que no tienen riesgo de padecer dicho acontecimiento adverso. Por tanto, se predice si el sujeto tiene riesgo o no tiene riesgo de padecer dicho acontecimiento adverso. Como se usa en el presente documento, "un sujeto que tiene riesgo de padecer dicho acontecimiento adverso" tiene preferentemente un riesgo elevado de padecer dicho acontecimiento adverso (preferentemente dentro del margen predictivo). Preferentemente dicho riesgo es elevado en comparación con el riesgo promedio en una cohorte de sujetos. Como se usa en el presente documento, "un sujeto que no tiene riesgo de padecer dicho acontecimiento adverso" tiene preferentemente un riesgo reducido de padecer dicho acontecimiento adverso (preferentemente dentro del margen predictivo). Preferentemente dicho riesgo es reducido en comparación con el riesgo promedio en una cohorte de sujetos. Un sujeto que tiene riesgo de padecer dicho acontecimiento adverso tiene preferentemente un riesgo de padecer dicho acontecimiento adverso de al menos un 20 % o más, preferentemente de al menos un 30 %, preferentemente dentro de un margen predictivo de aproximadamente un año. Un sujeto que no tiene riesgo de padecer dicho acontecimiento adverso tiene preferentemente un riesgo menor de un 12 %, más preferentemente menor de un 10 %, de padecer dicho acontecimiento adverso, preferentemente dentro de un margen predictivo de un año.

Preferentemente una cantidad de ESM-1 (y opcionalmente una cantidad del péptido natriurético) en la muestra de un sujeto que se incrementa(n) (en comparación con la cantidad de referencia (o con las cantidades de referencia) es indicativa para un sujeto que tiene riesgo del acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular y/o una cantidad de ESM-1 (y opcionalmente una cantidad del péptido natriurético) en la muestra de un sujeto que disminuye en comparación con la cantidad de referencia (o con las cantidades de referencia) es indicativa para un sujeto que no tiene riesgo del acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular.

En un modo de realización preferente, la cantidad de referencia permitirá diferenciar entre un sujeto que tiene riesgo de un acontecimiento adverso como se hace referencia en el presente documento y un sujeto que no tiene riesgo de dicho acontecimiento adverso. Preferentemente dicha cantidad de referencia es un valor predeterminado.

En un modo de realización preferente del procedimiento mencionado anteriormente, se predice el riesgo de apoplejía. Dicha apoplejía se asociará con fibrilación auricular, preferentemente la apoplejía se provocará por fibrilación auricular.

La apoplejía que se va a predecir es preferentemente una apoplejía cardioembólica.

Procedimiento para la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular

Como se usa en el presente documento, el término "evaluar un tratamiento para la fibrilación auricular" se refiere preferentemente a la evaluación de un tratamiento que se dirige a tratar la fibrilación auricular.

El tratamiento que se va a evaluar puede ser cualquier tratamiento que se dirija a tratar la fibrilación auricular. Preferentemente, dicho tratamiento se selecciona del grupo que consiste en la administración de al menos un anticoagulante, control del ritmo, control de la frecuencia, cardioversión y ablación. Dichos tratamientos son bien conocidos en la técnica y, por ejemplo, se revisan en Fuster V *et al.* Circulation 2011; 123:e269-e367.

En un modo de realización, el tratamiento es la administración de al menos un anticoagulante. La administración de al menos un anticoagulante se dirigirá a reducir o evitar la coagulación de sangre y apoplejía relacionada. En un modo de realización, se selecciona al menos un anticoagulante 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 e inhibidores de trombina (de tipo anti-IIa).

En un modo de realización preferente, la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular es el seguimiento de dicho tratamiento. En este modo de realización, la cantidad de referencia es preferentemente la cantidad para ESM-1 en una muestra obtenida anteriormente (es decir, en una muestra que se haya obtenido antes de la muestra de prueba en la etapa a).

Opcionalmente, la cantidad de un péptido natriurético se determina además de la cantidad de ESM-1.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para realizar un seguimiento de un tratamiento para la fibrilación auricular en un sujeto, padeciendo preferentemente dicho sujeto fibrilación auricular, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de

a) determinar la cantidad de ESM-1 (y opcionalmente la cantidad de un péptido natriurético) en una muestra

del sujeto, y

b) comparar la cantidad de ESM-1 con una cantidad de referencia, en el que dicha cantidad de referencia es la cantidad de ESM-1 en una muestra que se ha obtenido de dicho sujeto antes de la muestra en la etapa a), y opcionalmente comparar la cantidad del péptido natriurético con una cantidad de referencia, en el que dicha cantidad de referencia es la cantidad del péptido natriurético en una muestra que se ha obtenido de dicho sujeto antes de la muestra en la etapa a)

La muestra en la etapa a) también se denomina en el presente documento "muestra de prueba", la muestra en la etapa b) se denomina en el presente documento "muestra de referencia".

El término "realizar un seguimiento" como se usa en el presente documento se refiere preferentemente a evaluar los efectos de un tratamiento como se hace referencia en el presente documento en otra parte. Por tanto, se realiza un seguimiento de la eficacia de un tratamiento (tal como un tratamiento de anticoagulación).

El procedimiento mencionado anteriormente puede comprender otra etapa de realizar un seguimiento del tratamiento en base a los resultados de la etapa de comparación llevada a cabo en la etapa c). Como se entenderá por los expertos en la técnica, la predicción de un riesgo normalmente no pretende ser correcta para un 100 % de los sujetos. Sin embargo, el término requiere que se pueda realizar una predicción para una parte estadísticamente significativa de sujetos de una manera apropiada y correcta. Por tanto, el seguimiento real puede comprender otras etapas, tales como la confirmación.

Preferentemente al llevar a cabo el procedimiento de la presente invención se puede evaluar si el sujeto responde a dicho tratamiento o no. Un sujeto responde a un tratamiento si la afección del sujeto mejora entre la obtención de la primera y de la segunda muestra. Preferentemente un sujeto no responde al tratamiento si la afección empeoró entre la obtención de la primera y de la segunda muestra.

Preferentemente la muestra de referencia se obtiene antes del inicio de dicho tratamiento. Más preferentemente, la muestra se obtiene dentro de una semana, en particular, dentro de dos semanas antes del inicio de dicho tratamiento. Sin embargo, también se contempla que la muestra de referencia se pueda obtener después del inicio de dicho tratamiento (pero antes de que se obtenga la muestra de prueba). En este caso, se realiza un seguimiento de un tratamiento en curso.

Por tanto, la muestra de prueba se obtendrá después de la muestra de referencia. Se debe entender que la muestra de prueba se obtendrá después del inicio de dicho tratamiento.

Además, se contempla, en particular, que la muestra de prueba se obtenga después de un periodo de tiempo razonable después de obtener la muestra de referencia. Se debe entender que las cantidades de biomarcadores a las que se hace referencia en el presente documento no cambian de forma instantánea (por ejemplo, dentro de 1 minuto o 1 hora). Por lo tanto, "razonable" en este contexto se refiere a los intervalos entre la obtención de la primera muestra y la de prueba, permitiendo estos intervalos que el/los biomarcador(es) se ajuste(n). Por lo tanto, la muestra de prueba se obtiene preferentemente al menos un mes después de dicha muestra de referencia, al menos tres meses, o, en particular, al menos seis meses después de dicha muestra de referencia.

Preferentemente un incremento, y más preferentemente un incremento significativo, y lo más preferentemente un incremento estadísticamente significativo de la(s) cantidad(es) del/de los biomarcador(es), es decir, de ESM-1 y opcionalmente del péptido natriurético en la muestra de prueba en comparación con la(s) cantidad(es) del/de los biomarcador(es) en la muestra de referencia es indicativo para un sujeto que responde al tratamiento. Por tanto, el tratamiento es eficaz. También preferentemente una disminución, más preferentemente una disminución significativa, lo más preferentemente una disminución estadísticamente significativa de la(s) cantidad(es) del/de los biomarcador(es) en la muestra de prueba en comparación con la(s) cantidad(es) del/de los biomarcador(es) en la muestra de referencia es indicativa para un sujeto que no responde al tratamiento. Por tanto, el tratamiento no es eficaz.

Se considera que un sujeto responde al tratamiento si el tratamiento reduce el riesgo de recidiva de fibrilación auricular del sujeto. Se considera que un sujeto no responde al tratamiento si el tratamiento no reduce el riesgo de recidiva de fibrilación auricular del sujeto.

En un modo de realización, la intensidad del tratamiento se incrementa si el sujeto no responde al tratamiento. Además, se contempla que la intensidad del tratamiento disminuya si un sujeto responde al tratamiento. Por ejemplo, la intensidad de un tratamiento se puede incrementar incrementando la dosificación del medicamento administrado. Por ejemplo, la intensidad de un tratamiento se puede disminuir disminuyendo la dosificación del medicamento administrado.

En otro modo de realización preferente, la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular es la supervisión de un tratamiento para la fibrilación auricular. El término "supervisión" como se usa en el presente documento se

refiere preferentemente a ajustar la intensidad de un tratamiento, tal como incrementar o disminuir la dosis de anticoagulación oral, en base a la determinación del biomarcador, es decir, ESM-1, durante el tratamiento.

5 En otro modo de realización preferente, la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular es la estratificación de un tratamiento para la fibrilación auricular. Por tanto, se identificará un sujeto que sea apto para un determinado tratamiento para la fibrilación auricular. El término "estratificación" como se usa en el presente documento se refiere preferentemente a seleccionar un tratamiento adecuado en base al riesgo particular, la vía molecular identificada y/o eficacia esperada del fármaco o procedimiento particular. Dependiendo del riesgo detectado, en particular, los pacientes con ningún síntoma o síntomas mínimos relacionados con la arritmia serán
10 aptos para controlar la frecuencia ventricular, cardioversión o ablación, que, de otro modo, solo recibirían tratamiento antitrombótico.

15 Los términos "significativo" y "estadísticamente significativo" son conocidos por el experto en la técnica. Por tanto, se puede determinar si un incremento o disminución es significativo o estadísticamente significativo sin más preámbulos por el experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas. Por ejemplo, un incremento o disminución significativo es un incremento o disminución de al menos un 10 %, en particular, de al menos un 20 %.

20 La presente invención se refiere además a un procedimiento de ayuda en la evaluación de la fibrilación auricular, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) obtener una muestra de un sujeto como se hace referencia en el presente documento en relación con el procedimiento de evaluación de la fibrilación auricular,
- 25 b) determinar la cantidad del biomarcador ESM-1 y opcionalmente la cantidad de un péptido natriurético en dicha muestra, y
- c) proporcionar información sobre la cantidad determinada del biomarcador ESM-1 y opcionalmente sobre la cantidad determinada del péptido natriurético al médico especialista del sujeto, ayudando, de este modo, en la
30 evaluación de la fibrilación auricular en dicho sujeto.

35 El médico especialista será el médico que requirió la determinación del/de los biomarcador(es). El procedimiento mencionado anteriormente ayudará al médico especialista en la evaluación de la fibrilación auricular. Por tanto, el procedimiento no engloba el diagnóstico, predicción, seguimiento, diferenciación, identificación como se hace referencia anteriormente en relación con el procedimiento de evaluación de la fibrilación auricular.

40 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.

Además, la presente invención se refiere al uso

- i) del biomarcador ESM-1 y opcionalmente un péptido natriurético y/o
 - 45 ii) de al menos un agente de detección que se une específicamente a ESM-1 y opcionalmente al menos un agente de detección que se une específicamente a un péptido natriurético,
- en una muestra de un sujeto para evaluar la fibrilación auricular.

50 Los términos mencionados en relación con el uso mencionado anteriormente, tal como "muestra", "sujeto", "agente de detección", "ESM-1", "unión específica", "fibrilación auricular" y "evaluación de la fibrilación auricular" se han definido en relación con el procedimiento para evaluar la fibrilación auricular. Las definiciones y explicaciones se aplican en consecuencia.

55 Preferentemente el uso mencionado anteriormente es un uso *in vitro*. Además, el agente de detección es preferentemente un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal (o un fragmento de unión a antígeno del mismo).

60 La presente invención también se refiere al uso de un kit que comprende un agente que se une específicamente a ESM-1 y un agente que se une específicamente a un péptido natriurético (tal como NT-proBNP), para evaluar la fibrilación auricular. Opcionalmente, dicho kit comprende instrucciones para llevar a cabo el dicho procedimiento.

65 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 dentro de único recipiente. El recipiente también comprende instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. Estas instrucciones pueden estar en forma de manual o se pueden proporcionar por un código de programa informático que pueda llevar a

cabo los cálculos y comparaciones a los que se hace referencia en los procedimientos de la presente invención y establecer la evaluación o 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 puede comprender preferentemente cantidades estándar para el biomarcador ESM-1 para propósitos de calibración. En un modo de realización preferente, el kit comprende además cantidades estándar para el péptido natriurético para propósitos de calibración.

En un modo de realización, se usa dicho kit para evaluar la fibrilación auricular *in vitro*.

Cálculo de una proporción de ESM-1 y un péptido natriurético

La fibrilación auricular y la insuficiencia cardíaca comparten factores de riesgo comunes que predisponen al desarrollo de la enfermedad, tal como arteriopatía coronaria. También forma parte del conocimiento establecido que los pacientes con insuficiencia cardíaca a menudo desarrollan fibrilación auricular y viceversa.

Los ejemplos muestran que ESM-1 es un marcador tanto para la fibrilación auricular como para la insuficiencia cardíaca (véase la figura 6). Por tanto, se puede usar el biomarcador para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca y para la evaluación de la fibrilación auricular. Por ejemplo, se puede descartar la presencia de insuficiencia cardíaca o fibrilación auricular en un sujeto en base a la determinación de ESM-1 (como se describe anteriormente).

Si el nivel de ESM-1 se incrementa en comparación con la cantidad de referencia, el sujeto, en principio, podría padecer fibrilación auricular o insuficiencia cardíaca, o ambas. En este caso, sería ventajoso diferenciar entre insuficiencia cardíaca y fibrilación auricular. Se podría realizar la diferencia calculando una proporción de la cantidad del péptido natriurético (por ejemplo, NT-proBNP o BNP) en la muestra del sujeto con respecto a la cantidad de ESM-1 en la muestra del sujeto.

Aunque la cantidad de péptidos natriuréticos se incrementa en muestras de sujetos que padecen fibrilación auricular, la cantidad de péptidos natriuréticos es, en general, mucho mayor en muestras de pacientes con insuficiencia cardíaca que en pacientes con fibrilación auricular. Por ejemplo, en muestras de sujetos que padecían fibrilación auricular, pero no insuficiencia cardíaca, se observaron niveles de hasta 3000 pg/ml de NT-proBNP en los estudios que subyacen a la presente invención. Por el contrario, los sujetos que padecen insuficiencia cardíaca tenían niveles de NT-proBNP de hasta 15000 pg/ml.

Debido a las diferencias en el nivel de los péptidos natriuréticos, en particular, de NT-proBNP, en sujetos que padecen fibrilación auricular y en sujetos que padecen insuficiencia cardíaca, es posible diferenciar entre insuficiencia cardíaca y fibrilación auricular en sujetos con un nivel incrementado de ESM-1 (es decir, en sujetos que tienen una cantidad de ESM-1 en una muestra que se incrementa en comparación con la cantidad de referencia).

Preferentemente, el diagnóstico de insuficiencia cardíaca o fibrilación auricular se respalda o verifica además llevando a cabo otra etapa de calcular una proporción de la cantidad de un péptido natriurético con respecto a la cantidad de ESM-1 como se determina en la etapa a) del procedimiento de evaluación de la fibrilación auricular descrito anteriormente. En otra etapa, dicha proporción calculada se compara con una proporción de referencia (de la cantidad de un péptido natriurético con respecto a la cantidad de ESM-1). Dicha proporción de referencia permitirá la diferenciación entre insuficiencia cardíaca y fibrilación auricular (en particular, los sujetos que tienen una cantidad incrementada de ESM-1).

Por tanto, el procedimiento de evaluación de la fibrilación auricular (tal como el procedimiento de diagnóstico de fibrilación auricular) puede comprender otras etapas de

- calcular una proporción de la cantidad del péptido natriurético como se determina en la etapa con respecto a la cantidad de ESM-1 como se determina en la etapa a), y
- comparar dicha proporción calculada con una proporción de referencia.

La etapa de cálculo es preferentemente la etapa c), la etapa de comparación es preferentemente la etapa d).

Si se llevan a cabo las etapas c) y d), las cantidades del biomarcador ESM-1 y de un péptido natriurético se determinan en la etapa a) del procedimiento para evaluar la fibrilación auricular. Sin embargo, en este caso, no se requiere en la etapa b) comparar las cantidades del péptido natriurético con una cantidad de referencia. El procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo con y sin esta comparación en la etapa b).

De este modo, se verifica, confirma o respalda el diagnóstico de fibrilación auricular. En particular, la proporción

permite reducir el número de positivos falsos.

Las etapas de cálculo y comparación establecidas anteriormente se llevan a cabo preferentemente en sujetos en los que su cantidad de ESM-1 en la muestra como se determina en la etapa a) se incrementa en comparación con la cantidad de referencia.

Con respecto al procedimiento de evaluación de la fibrilación auricular, en particular, con respecto al diagnóstico de fibrilación auricular, se aplica lo siguiente: preferentemente una proporción que disminuye en comparación con la proporción de referencia es indicativa, es decir, indicativa además, para un sujeto que padece fibrilación auricular. En consecuencia, dicha proporción confirma el diagnóstico de fibrilación auricular en base a las etapas a) y b). Una proporción que se incrementa en comparación con la proporción de referencia es indicativa para insuficiencia cardíaca. Por tanto, dicha proporción indica que el sujeto podría no padecer fibrilación auricular. Por tanto, se recomendarán o iniciarán otras medidas de diagnóstico, tales como ECG para el diagnóstico de fibrilación auricular.

Con respecto al procedimiento de diagnóstico de insuficiencia cardíaca, se aplica lo siguiente: preferentemente una proporción que se incrementa en comparación con la proporción de referencia es indicativa para un sujeto que padece insuficiencia cardíaca. Por tanto, la proporción incrementada confirma el diagnóstico de insuficiencia cardíaca en base a las etapas a) y b). Una proporción que disminuye en comparación con la proporción de referencia es indicativa para el diagnóstico de que el sujeto no padece insuficiencia cardíaca. Por tanto, dicha proporción indica que el sujeto no padece fibrilación auricular.

Por tanto, la presente invención informa de un procedimiento para diagnosticar ambas enfermedades y detectar dichos factores de riesgo en un sujeto que comprende las etapas de determinar la cantidad de ESM-1 y NT-proBNP en una muestra del sujeto y comparar las cantidades de ESM-1 y NT-proBNP como una proporción. Un sujeto que se sospecha que padece insuficiencia cardíaca tendrá una mayor proporción de NT-proBNP/ESM en comparación con un sujeto que padece fibrilación auricular.

Las figuras muestran:

Fig. 1: Medición de ELISA para ESM-1 en la cohorte de Mapping

Fig. 2: Curva ROC para ESM1 en fibA paroxística de la cohorte de Mapping; ABC = 0,61

Fig. 3: Curva ROC para ESM1 en fibA persistente de la cohorte de Mapping; ABC = 0,89

Fig. 4: Valor pronóstico de ESM-1 en el subpanel de FibA de PREDICTOR

Fig. 5: Valor pronóstico de ESM-1 en el subpanel de FibA de PREDICTOR; ABC = 0,68

Fig. 6: ESM-1 en la diferenciación de insuficiencia cardíaca y fibrilación auricular

Fig. 7: ESM-1 en la diferenciación de insuficiencia cardíaca; curva ROC para ESM1; ABC = 0,81

Fig. 8: ESM-1 en la diferenciación de fibrilación auricular; curva ROC para ESM1 en fibA; ABC = 0,98

EJEMPLOS

Ejemplo 1: ensayo Mapping: diagnosticar a los pacientes fibrilación auricular en comparación con los pacientes en base a sus diferentes niveles de ESM-1 circulante

El estudio MAPPING se relacionó con pacientes que se sometían a cirugía torácica abierta. Se obtuvieron muestras antes de la anestesia y cirugía. Los pacientes se caracterizaron de forma electrofisiológica usando localización epicárdica de alta densidad con conjuntos de múltiples electrodos (localización de alta densidad). El ensayo comprendió 14 pacientes con fibrilación auricular paroxística, 16 pacientes con fibrilación auricular permanente y 30 controles, emparejados lo mejor posible (en cuanto a edad, sexo, enfermedades concomitantes). Se determinó ESM-1 en muestras del estudio MAPPING. Se observaron niveles elevados de ESM-1 en pacientes con fibrilación auricular frente a los controles. Los niveles de ESM-1 fueron elevados en pacientes con fibrilación auricular paroxística frente a los controles emparejados, así como en pacientes con fibrilación auricular permanente frente a los controles.

Además, se determinó el biomarcador NT-proBNP en muestras de la cohorte de MAPPING. De forma interesante, se demostró que la determinación combinada de ESM-1 y NT-proBNP permitía un incremento del ABC a 0,91 para la diferenciación entre FA persistente frente al RS (ritmo sinusal).

Ejemplo 2: cohorte de PREDICTOR: cribar e identificar pacientes con fibrilación auricular, especialmente

en una población general anciana

El estudio PREDICTOR fue un ensayo basado en población en ancianos (≥ 65 años), sujetos aparentemente sanos (n=2001). Los participantes se remitieron a centros de cardiología para su examen clínico y ecocardiografía Doppler exhaustiva y medidas de electrocardiograma. Los pacientes padecían predominantemente el estadio B de insuficiencia cardíaca. Sin embargo, algunos pacientes padecían el estadio A o C de insuficiencia cardíaca. La subcohorte de fibrilación auricular comprende 40 sujetos con un episodio activo de fibrilación auricular durante su consulta y 116 controles emparejados. 33 pacientes mostraron factores de riesgo de estadio A de IC y, de estos, 11 presentaron fibrilación auricular activa en el momento del muestreo. 80 pacientes mostraron cardiopatía estructural, estadio B de IC y, de estos, 21 presentaron fibrilación auricular activa en el momento del muestreo. 37 pacientes padecieron estadio C de IC y, de estos, 6 presentaron fibrilación auricular activa en el momento del muestreo.

Se determinaron ESM-1 y NTproBNP en la subcohorte de fibrilación auricular seleccionada del estudio PREDICTOR. Se observaron niveles elevados de ESM-1 circulante en muestras de sujetos con fibrilación auricular activa frente a los controles. Se observaron niveles ligeramente elevados de ESM-1 circulante en pacientes con anomalías miocárdicas estructurales y funcionales (IC en estadio C) frente a los controles. Se observaron niveles elevados de NTproBNP circulante, por encima de 120 pg/ml en sujetos con fibrilación auricular activa frente a los controles. Se observaron niveles elevados de NTproBNP circulante, por encima de 120 pg/ml en pacientes con IC en estadio C frente a los controles.

En pacientes con insuficiencia cardíaca (estadio C) y altas proporciones (NTproBNP/ESM-1) de fibrilación auricular activa, se observaron por encima de 0,5. En pacientes sin insuficiencia cardíaca (estadio C) y proporciones intermedias (NTproBNP/ESM-1) de fibrilación auricular activa, se observaron por debajo de 0,5 y por encima de 1,5. La presencia de estadio C de IC y/o fibrilación auricular activa se pudo excluir en pacientes con el hallazgo de las proporciones (NTproBNP/ESM-1) por debajo de 1,5.

Ejemplo 3: panel de insuficiencia cardíaca

El panel de insuficiencia cardíaca incluyó a 60 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. De acuerdo con los criterios de las pautas de la ESC, se diagnosticó insuficiencia cardíaca en pacientes con signos y síntomas típicos y pruebas objetivas de una anomalía estructural o funcional del corazón en reposo. Los pacientes entre 18 y 80 años con miocardiopatía isquémica o dilatada o enfermedad valvular significativa y que pudieron firmar el formulario de consentimiento se incluyeron en el estudio. Se excluyeron los pacientes con infarto de miocardio agudo, embolia pulmonar o apoplejía en los últimos 6 meses, además de con hipertensión pulmonar grave e insuficiencia renal terminal. Los pacientes padecían predominantemente los estadios II-IV según NYHA de insuficiencia cardíaca.

La cohorte de fibrilación auricular incluyó a 10 pacientes ancianos (>60 años), incluyendo aquellos con hipertensión y trastornos cardíacos diagnosticados.

La cohorte de controles sanos incluyó a 56 sujetos. Se verificó el estado sano y se obtuvieron un ECG y una ecocardiografía. Se excluyeron los participantes con alguna anomalía. Se observaron niveles elevados de ESM-1 en pacientes con insuficiencia cardíaca frente a los controles.

Ejemplo 4: ensayo GISSI-FA

El ensayo GISSI-FA era un ensayo multicéntrico, aleatorizado, controlado con placebo y con enmascaramiento doble que había incluido a 1442 pacientes en ritmo sinusal con antecedentes conocidos de fibrilación auricular, documentada por al menos dos o más episodios de fibrilación auricular sintomática documentada por ECG en los 6 meses previos o cardioversión eléctrica o farmacológica con éxito entre 14 días y 48 h antes de la aleatorización.

El fundamento, el diseño y los resultados del ensayo ya se han publicado en detalle anteriormente (ref.: Disertori M, *et al.*, J Cardiovasc Med. 2006; 7:29-38; ref. Staszewsky L *et al.*, Cardiovasc Drugs Ther 2015; 29:551-561) y en Clinical Trials.gov (con el identificador NCT00376272).

Todos los pacientes tenían una edad > 40 años y habían recibido un tratamiento estable para la fibrilación auricular y cualquier trastorno cardiovascular subyacente durante al menos 1 mes antes de la inclusión. Se les permitió que continuaran tomando los inhibidores de ACE, los betabloqueantes y la amiodarona recetados previamente para las enfermedades cardiovasculares concomitantes. Los pacientes se aleatorizaron para recibir valsartán o placebo

Los principales criterios de valoración en el ensayo principal fueron evaluar el efecto del bloqueante del receptor de angiotensina II de tipo 1, valsartán, sobre (a) el tiempo hasta la primera recidiva de fibrilación auricular y (b) la proporción de pacientes con más de un episodio de fibrilación auricular en el periodo de observación de 1 año. El subestudio con biomarcador (N = 382) comprendió 203 sujetos con y 179 controles sin fibrilación auricular recidivante durante el periodo de seguimiento de 12 meses (Masson S *et al.*, Heart. 2010; 96:1909-14; Latini R *et*

a, J Intern Med. 2011; 269:160-71). Se extrajeron muestras de sangre en la aleatorización y después de 6 y 12 meses de seguimiento.

El biomarcador ESM-1 se mide en las muestras del subestudio con biomarcador.

5

Ejemplo 5: mediciones del biomarcador

Se midió ESM-1 en un ensayo basado en placas de microvaloración disponible comercialmente para la molécula específica de células endoteliales 1 (ESM1); kit de ELISA de Abnova, Taiwán.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para evaluar la fibrilación auricular en un sujeto, que comprende las etapas de
 - 5 a) determinar la cantidad de ESM-1 (molécula específica de células endoteliales 1 o endocan) y opcionalmente de un péptido natriurético en una muestra del sujeto, y
 - b) 10 comparar la cantidad de ESM-1 y opcionalmente la cantidad del péptido natriurético con una cantidad de referencia o con las cantidades de referencia, con lo que se evalúa la fibrilación auricular.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se sospecha que el sujeto padece fibrilación auricular, y en el que la evaluación de la fibrilación auricular es el diagnóstico de fibrilación auricular.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que una cantidad de ESM-1 y opcionalmente una cantidad del péptido natriurético en la muestra de un sujeto que se incrementa en comparación con la cantidad de referencia o con las cantidades de referencia es indicativa para un sujeto que padece fibrilación auricular y/o en el que una cantidad de ESM-1 y opcionalmente una cantidad del péptido natriurético en la muestra de un sujeto que disminuye en comparación con la cantidad de referencia o con las cantidades de referencia es indicativa para un sujeto que no padece fibrilación auricular.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cantidad de ESM-1 en la muestra del sujeto se incrementa en comparación con la cantidad de referencia.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que las cantidades de ESM-1 y un péptido natriurético se determinan en la etapa a), y en el que el procedimiento comprende otras etapas de c) calcular una proporción de la cantidad del péptido natriurético como se determina en la etapa a) con respecto a la cantidad de ESM-1 como se determina en la etapa a), y comparar dicha proporción calculada con una proporción de referencia.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que una proporción que disminuye en comparación con la proporción de referencia es además indicativa para un sujeto que padece fibrilación auricular.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto padece fibrilación auricular, y en el que la evaluación de la fibrilación auricular es la diferenciación entre fibrilación auricular paroxística y persistente, en particular, en el que una cantidad de ESM-1 en la muestra de un sujeto que se incrementa en comparación con la cantidad de referencia es indicativa para un sujeto que padece fibrilación auricular persistente y/o en el que una cantidad de ESM-1 en la muestra de un sujeto que disminuye en comparación con la cantidad de referencia es indicativa para un sujeto que padece fibrilación auricular paroxística.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto padece fibrilación auricular, y en el que la evaluación de la fibrilación auricular es la predicción del riesgo de un acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular, en particular, en el que el acontecimiento adverso se selecciona de recidiva de fibrilación auricular y apoplejía.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que una cantidad de ESM-1 en la muestra de un sujeto que se incrementa en comparación con la cantidad de referencia es indicativa para un sujeto que tiene riesgo del acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular y/o en el que una cantidad de ESM-1 en la muestra de un sujeto que disminuye en comparación con la cantidad de referencia es indicativa para un sujeto que no tiene riesgo del acontecimiento adverso asociado con fibrilación auricular.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto padece fibrilación auricular y en el que la evaluación de la fibrilación auricular es la evaluación de un tratamiento para la fibrilación auricular.
11. Uso
 - 55 i) del biomarcador ESM-1 y opcionalmente un péptido natriurético y/o
 - ii) de al menos un agente de detección que se une específicamente a ESM-1 y opcionalmente al menos un agente de detección que se une específicamente a un péptido natriurético, en una muestra de un sujeto para a) evaluar la fibrilación auricular.
- 60 12. Un procedimiento de ayuda en la evaluación de la fibrilación auricular, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - 65 a) determinar la cantidad del biomarcador ESM-1 y opcionalmente la cantidad de un péptido natriurético en una muestra obtenida de un sujeto, y

- b) proporcionar información sobre la cantidad determinada del biomarcador ESM-1 y opcionalmente sobre la cantidad determinada del péptido natriurético al médico especialista del sujeto, ayudando, de este modo, en la evaluación de la fibrilación auricular en dicho sujeto.
- 5 13. Uso de un kit que comprende un agente que se une específicamente a ESM-1 y un agente que se une específicamente a un péptido natriurético para evaluar la fibrilación auricular.

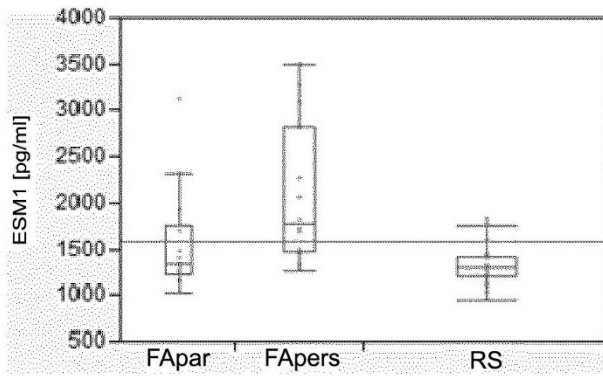


Fig. 1: Medición de ELISA para ESM-1 en la cohorte de Mapping

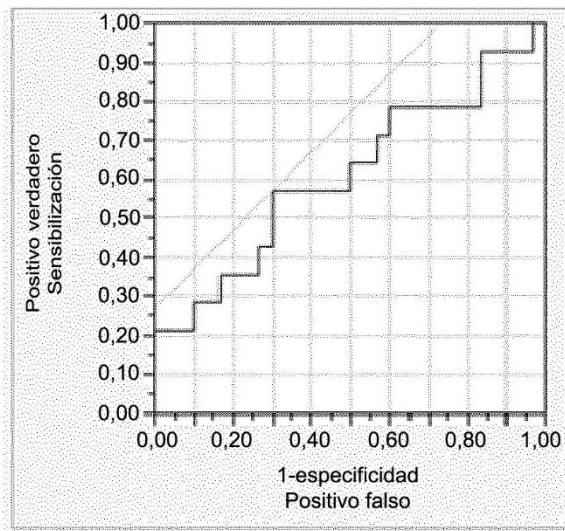


Fig. 2: Curva ROC para ESM1 en fibA paroxística de la cohorte de Mapping; ABC = 0,61

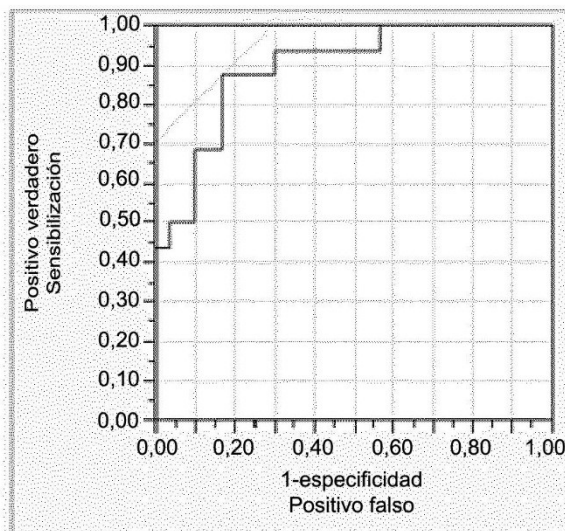


Fig. 3: Curva ROC para ESM1 en fibA persistente de la cohorte de Mapping; ABC = 0,89

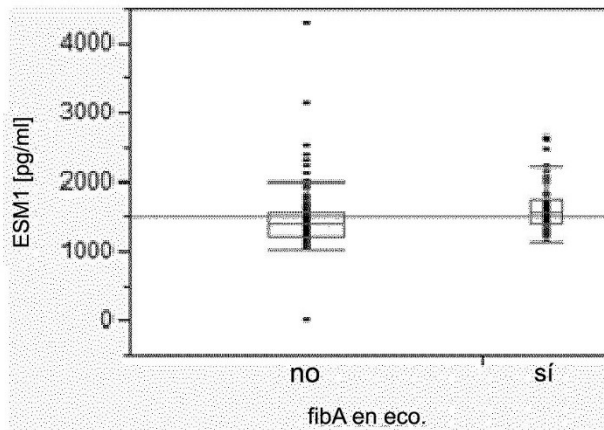


Fig. 4: Valor pronóstico de ESM-1 en el subpanel de FibA de PREDICTOR

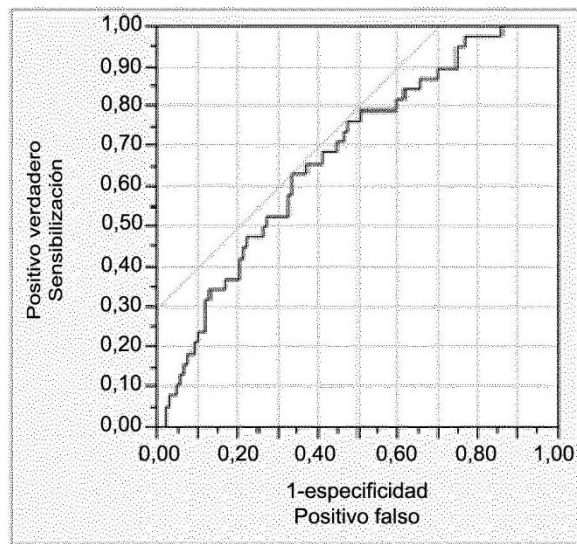


Fig. 5: Valor pronóstico de ESM-1 en el subpanel de FibA de PREDICTOR; ABC = 0,68

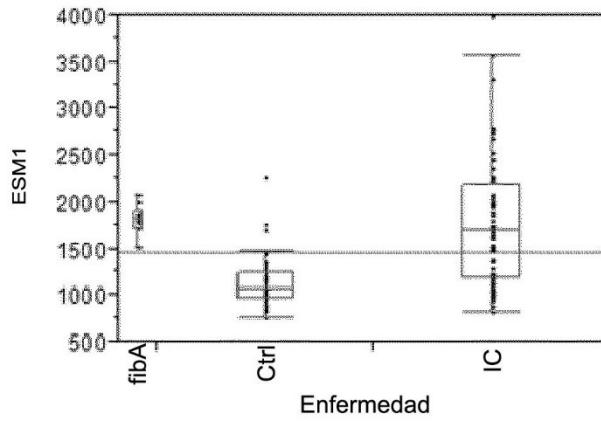


Fig. 6: ESM-1 en la diferenciación de insuficiencia cardíaca y fibrilación auricular

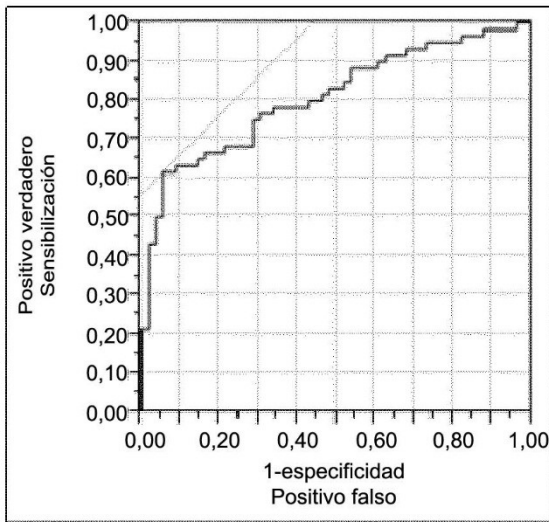


Fig. 7: ESM-1 en la diferenciación de insuficiencia cardíaca; curva ROC para ESM1; ABC = 0,81

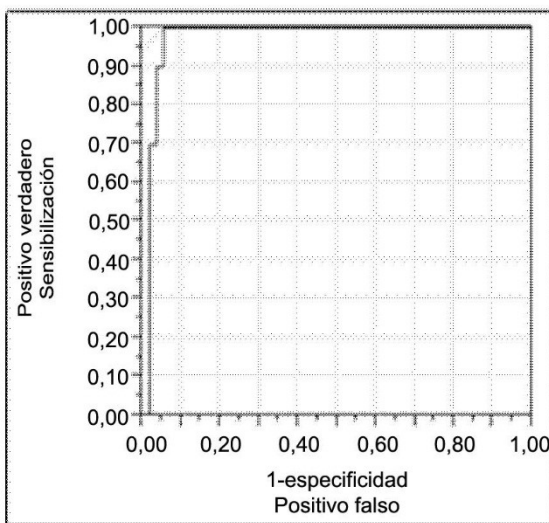


Fig. 8: ESM-1 en la diferenciación de fibrilación auricular; curva ROC para ESM1 en fibA; ABC = 0,98