

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 703**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 10188289 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2293076**

54 Título: **Utilización de la procalcitonina (PCT) en la estratificación de riesgo y el pronóstico de los pacientes con una enfermedad primaria no infecciosa**

30 Prioridad:

03.08.2007 EP 07015271

12.03.2008 EP 08152651

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

23.04.2013

73 Titular/es:

B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)

**Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE**

72 Inventor/es:

**STRUCK, JOACHIM y
BERGMANN, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 401 703 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

Utilización de la procalcitonina (PCT) en la estratificación de riesgo y el pronóstico de los pacientes con una enfermedad primaria no infecciosa.

El objeto de la presente invención es el diagnóstico *in vitro*, el pronóstico y la estratificación de riesgo de un paciente que presenta una enfermedad primaria no infecciosa, siendo el nivel de Procalcitonina (PCT) en una muestra de un fluido corporal de dicho paciente un indicativo del riesgo del paciente de contraer otra enfermedad o afección.

Antecedentes de la invención

La Procalcitonina (PCT) se ha convertido en un biomarcador bien establecido para el diagnóstico de la sepsis. La PCT refleja la gravedad de la infección bacteriana y se utiliza en particular para controlar la progresión de la infección a sepsis, sepsis severa, o choque séptico. Las concentraciones de la PCT en la sepsis, sepsis severa o choque séptico, son superiores, típicamente, a 1 ng/ml. Es posible utilizar la PCT para cuantificar la actividad de la infección asociada a la respuesta inflamatoria sistémica, para controlar el éxito terapéutico, y estimar el pronóstico (Assicot M. *et al.*; High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*, 1993, 341:515-8; Clec'h C *et al.*; Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004; 32:1166-9; Lee Y J *et al.*: Predictive comparisons of procalcitonin (PCT) level, arterial ketone body ratio, APACHE III score and multiple organ dysfunction score (MODS) in systemic inflammatory response syndrome (SIRS), *Yonsei Med J* 2004, 45, 29-37; Meisner M: Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr Opin Crit Care*, 2005, 11, 473-480; Wunder C *et al.*: Are IL-6, IL-10 and PCT plasma concentrations reliable for outcome prediction in severe sepsis? A comparison with APACHE III and SAPS II. *Inflamm Res* 2004, 53, 158-163). El aumento de los niveles de PCT en pacientes con sepsis se correlaciona con la mortalidad (Oberhoffer M *et al.*: Outcome prediction by traditional and new biomarkers of inflammation in patients with sepsis. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 363-368).

Un número creciente de estudios considera el papel potencial de PCT en enfermedades infecciosas no sépticas como la neumonía, la meningitis bacteriana y la malaria (Bugden SA *et al.*: The potential role of procalcitonin in the emergency department management of febrile young adults during a sustained meningococcal epidemic. *Emerg Med Australas* 2004, 16, 114-119; Chiwakata CB *et al.*: Procalcitonin as a parameter of disease severity and risk of mortality in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 2001, 183, 1161-1164; Schwarz S *et al.*: Serum procalcitonin levels in bacterial and abacterial meningitis, *Crit Care Med* 2000, 28, 1828-1832).

Los estudios *in vitro* han mostrado que la PCT desempeña una función importante durante la adhesión y migración de los monocitos y, además, posee un efecto sobre la expresión inducible del gen de la óxido nítrico sintasa (iNOS) (Linscheid P. *et al.*: Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes, *Crit Care Med* 2004, 32, 1715-1721. Wiedermann F.J. *et al.*: Migration of human monocytes in response to procalcitonin, *Crit Care Med* 2002, 30, 1112-1117; Hoffmann G. *et al.*: Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells, *Crit Care Med* 2002, 30, 2091-2095).

La PCT se ha utilizado para guiar la terapia antibiótica (Christ-Crain M *et al.*: Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial, *Lancet*, 21 de febrero de 2004; 363 (9409): 600-7). En pacientes con síntomas de infecciones del tracto respiratorio inferior, que se presentaron en el servicio de urgencias, se midió la PCT, y sólo los pacientes con concentraciones de PCT >0,25 ng/ml, o > 0,5 ng/ml, se trataron con antibióticos. Aparentemente, este régimen condujo a un resultado clínico indistinguible del grupo de control, en el que también recibieron antibióticos muchos pacientes con concentraciones de PCT < 0,25 ng/ml. Debe mencionarse que, en este estudio, los pacientes con comorbilidades importantes, como, por ejemplo, insuficiencia cardíaca, fueron excluidos. Así, no está claro si la presencia de una primera enfermedad añadida a una infección, influirá en la interpretación de las concentraciones de PCT inferiores a 0,25 ng/ml. Una enfermedad primaria importante podría añadir una carga adicional al sistema inmunológico, y los biomarcadores de infección, tales como la PCT, podrían en dicha situación indicar una infección en un intervalo distinto de concentración, por ejemplo, más bajo, que en la ausencia de una enfermedad primaria importante.

En individuos sanos, la concentración de PCT es correcta por debajo de 0,25 ng/ml. Se ha determinado que la concentración media es de 0,014 ng/ml. (Morgenthaler NG *et al.*: Sensitive immunoluminometric assay for the detection of procalcitonin. *Clin. Chem.* mayo de 2002, 48(5):788-90).

En el documento WO 2008/040328 A2, se describe un método para el diagnóstico de enfermedades infecciosas o inflamatorias de las vías aéreas y pulmonares, asociadas con insuficiencia cardíaca, en el que el marcador procalcitonina se determina en un paciente.

Remskar Mojca *et al.*: "Procalcitonin in patients with acute myocardial infarction", *Wiener Klinische Wochenschrift*, New York, NY, US, vol. 114, nº 5-6, 1 de enero de 2002 (01-01-2002), páginas 205-210, describe un ensayo

ultrasensible que presenta una unidad inferior de detección. Se mide la procalcitonina en pacientes con infarto agudo de miocardio.

Sumario de la invención

5 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que en las muestras de los pacientes con una enfermedad primaria no infecciosa, se detectaron frecuentemente, niveles (concentraciones) ligeramente elevados de procalcitonina y que presentan significado diagnóstico. Sorprendentemente, se ha identificado un gran número de muestras con niveles séricos superiores a 0,03 ng/ml, (26,0%) y 0,05 ng/ml (14,7%, respectivamente), de un total de 10 4997 muestras de pacientes con una enfermedad primaria no infecciosa. Los niveles de PCT ligeramente elevados se relacionan con los niveles de PCT en el intervalo de 0,02 a 0,25 ng/ml aproximadamente, preferentemente de entre 0,02 y 0,1 ng/ml. La presencia de niveles ligeramente elevados de PCT puede ser indicadora del riesgo de que un paciente aquejado de una enfermedad primaria no infecciosa adquiera una enfermedad o una afección que todavía no se hayan manifestado y/o no presente todavía síntomas. Dicha enfermedad o afección adicional puede 15 estar relacionada con una infección, o ésta puede facilitar, acelerar y/o potenciar el riesgo de contraer o adquirir dicha enfermedad o afección.

El objeto de la presente invención es la utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible que presenta un límite inferior de detección inferior a 0,05 ng/ml para determinar en un paciente que presente una enfermedad 20 primaria que no sea una infección el riesgo del paciente de contraer unas enfermedad o afección adicionales que no se han manifestado todavía y/o no resultan todavía sintomáticas en la que el nivel de procalcitonina o de sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos de longitud es determinado en una muestra seleccionada de entre el grupo que comprende una muestra sanguínea, una muestra sérica y una muestra plasmática o un extracto de cualquier muestra mencionada anteriormente obtenida a partir de dicho paciente y en el que dicho nivel de 25 procalcitonina o de sus fragmentos es correlacionado con el riesgo del paciente de contraer una enfermedad o afección adicionales que no se han manifestado todavía y/o no son todavía sintomáticas, en la que dicha etapa de correlación del método *in vitro* comprende comparar dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos con un nivel umbral, estando dicho paciente, cuando dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos supera dicho nivel umbral, predispuesto a dicho riesgo y en la que dicho nivel umbral es de entre 0,02 y 0,25 ng/ml. Resulta preferido que el 30 nivel de procalcitonina o de sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos de longitud o de una mezcla de procalcitonina y/o de sus fragmentos, es determinado en una muestra sérica de dicho paciente.

En una forma de realización preferida el ensayo es utilizado para estratificar el riesgo de contraer una enfermedad o afección adicionales en un paciente que presenta una enfermedad primaria. 35

En otra forma de realización el ensayo es utilizado para el control del tratamiento o de la prevención de dicha enfermedad o afección adicionales.

En una forma de realización preferida dichos tratamiento o prevención comprenden la administración de un antibiótico al paciente. 40

En otra forma de realización preferida el ensayo es un ensayo de tipo sándwich que comprende dos anticuerpos contra diferentes fracciones de la procalcitonina.

En una forma de realización muy preferida un anticuerpo es contra la fracción de calcitonina de la procalcitonina, y el otro anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra la fracción de catacalcina de la procalcitonina. 45

Breve descripción de las figuras

50 La Figura 1 representa un histograma piloto de la frecuencia de los intervalos de los niveles de procalcitonina en muestras de los pacientes. Estas fueron 4997 muestras no seleccionadas que, por parte de diversos médicos de varias especialidades, fueron enviadas consecutivamente a un laboratorio privado para varios tipos de análisis, pero no de PCT.

55 La Figura 2 representa la distribución de los niveles de PCT superiores a 0,05 ng/ml, en relación con la especialidad médica del profesional sanitario asesor que proporcionó la muestra respectiva. Se indican los valores medios en todos los grupos.

Descripción detallada de la invención

60 El objeto de la presente invención es la utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible que presenta un límite inferior de detección inferior a 0,05 ng/ml para determinar en un paciente que presente una enfermedad principal que no sea una infección el riesgo del paciente de contraer unas enfermedad o afección adicionales que no se han manifestado todavía y/o no resultan todavía sintomáticas en la que el nivel de procalcitonina o de sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos de longitud es determinado en una muestra seleccionada de entre el grupo que comprende una muestra sanguínea, una muestra sérica y una muestra plasmática o un extracto de 65

- 5 cualquier muestra mencionada anteriormente obtenida a partir de dicho paciente y en la que dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos es correlacionado con el riesgo del paciente de contraer una enfermedad o afección adicionales que no se han manifestado todavía y/o no son todavía sintomáticas, en la que dicha etapa de correlación del método *in vitro* comprende comparar dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos con un nivel umbral, estando dicho paciente, cuando dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos supera dicho nivel umbral, predispuesto a dicho riesgo y en la que dicho nivel umbral es de entre 0,02 y 0,25 ng/ml. Resulta preferido que el nivel de procalcitonina o de sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos de longitud o de una mezcla de procalcitonina y/o de sus fragmentos, es determinado en una muestra sérica de dicho paciente.
- 10 En una forma de realización preferida el ensayo es utilizado para estratificar el riesgo de contraer una enfermedad o afección adicionales en un paciente que presenta una enfermedad primaria.
- En otra forma de realización el ensayo es utilizado para el control del tratamiento o la prevención de dicha enfermedad o afección adicionales.
- 15 En una forma de realización preferida dichos tratamiento o prevención comprenden la administración de un antibiótico al paciente.
- 20 En otra forma de realización preferida el ensayo es un ensayo de tipo sándwich que comprende dos anticuerpos contra diferentes fracciones de la procalcitonina.
- En una forma de realización muy preferida un anticuerpo es contra la fracción de calcitonina de la procalcitonina, y el otro anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra la fracción de catacalcina de la procalcitonina.
- 25 Mediante "Pacientes", según la invención, se hace referencia a todas las personas o animales, sin tener en cuenta si muestran o no cambios patológicos, si no se establece lo contrario. En una forma de realización preferida, el paciente, según la invención, es un animal humano.
- 30 Preferentemente, el paciente, en el contexto de la presente invención, presenta una enfermedad primaria que no es infecciosa, y el nivel de la procalcitonina o de sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos de longitud, en las muestras plasmáticas o séricas de dicho paciente, es inferior a 0,25 ng/ml.
- 35 En la presente invención, el término "pronóstico" denota una predicción de cómo progresará la situación médica de un individuo (por ejemplo, de un paciente). Esto puede incluir una estimación de la posibilidad de recuperación, o de la posibilidad de un resultado adverso para dicho individuo.
- 40 Tal como se menciona en la presente memoria en el contexto de proteínas o péptidos, el término "fragmento" se refiere a proteínas o péptidos más pequeños que pueden derivarse de proteínas o péptidos más grandes, que, por lo tanto, comprenden una secuencia parcial de la proteína o péptido más grande. Dichos fragmentos pueden obtenerse a partir de proteínas o péptidos más grandes mediante saponificación de uno o varios de los enlaces peptídicos.
- 45 La procalcitonina es un péptido que comprende 116 aminoácidos. También existen variantes más pequeñas, tales como por ejemplo, PCT 3-116 y otras. De este modo, la longitud de los fragmentos de la procalcitonina es de por lo menos 12 aminoácidos, preferentemente de más de 50 aminoácidos y más preferentemente de más de 110 aminoácidos.
- 50 Preferentemente en la presente memoria, dicho riesgo de contraer otra enfermedad o mostrar una afección determinada, se relaciona con una infección bacteriana existente, particularmente, una infección local. Una infección local puede facilitar, acelerar y/o potenciar el riesgo de contraer o adquirir otra enfermedad o de mostrar otra afección, en un paciente que muestre una enfermedad primaria no infecciosa.
- 55 En las formas de realización particularmente preferidas del método *in vitro*, dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos, indica una infección bacteriana en el paciente.
- Resulta además preferido que dicha infección sea una infección local.
- 60 Una infección local en la presente memoria hace referencia a todas las infecciones que sean menos graves que una sepsis. Una sepsis se define como una infección que se asocia con el "Síndrome Sistémico de Respuesta Inflamatoria" ("SIRS") (Levy MM *et al*, 2001, SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, Crit Care Med, abril 2003; 31(4):1250-6).
- 65 La infección local puede ser, por ejemplo, una infección de la cavidad bucal, en los dientes o en sus raíces, una infección en heridas, en el tracto respiratorio, o hemorroidal, u otras. Dicha infección local en estos lugares puede tratarse administrando un antibiótico. El tratamiento de la infección local conlleva una disminución del riesgo del paciente para que se establezca otra enfermedad o para que se instituya otra afección. Por lo tanto, en una forma preferida del método *in vitro*, dicha infección bacteriana puede tratarse con un antibiótico. En este caso resulta

preferido que el riesgo de contraer otra enfermedad o de que aparezca otra afección, disminuya cuando el paciente es tratado con un antibiótico.

5 Dicho nivel umbral se encuentra entre 0,02 y 0,25 ng/ml, más preferentemente entre 0,02 y 0,1 ng/ml, todavía más preferentemente, de 0,05 (+/- 0,01) ng/ml aproximadamente, y muy preferentemente de 0,03 (+/-0,01) ng/ml aproximadamente. La puntualización de estos niveles umbral procede del análisis de la distribución de la frecuencia de los intervalos del nivel de PCT, que se muestra en el histograma de la Figura 1 y del Ejemplo 1 que se adjuntan.

10 En una forma de realización particular, dicha enfermedad primaria no es la arteriosclerosis. En otra forma de realización, dicha enfermedad primaria no es la insuficiencia cardíaca. En algunas formas de realización de la invención, dicha enfermedad primaria no es un síndrome coronario agudo. Además, en una forma de realización particularmente preferida, dicha enfermedad primaria no es una enfermedad coronaria. En una forma de realización particular, la otra enfermedad o afección no se seleccionan de entre el grupo que comprende síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca o infarto miocárdico.

15 En una forma de realización, la otra enfermedad o la afección no es una infección, particularmente no es una infección pulmonar o de las vías aéreas.

20 En otra forma de realización del método *in vitro* según la invención, dicha enfermedad primaria es seleccionada de entre, pero no se limita, al grupo que comprende cáncer, diabetes, enfermedades gastrointestinales crónicas, enfermedades renales crónicas, hipertensión, enfermedades ortopédicas incluyendo osteoporosis, y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer.

25 Además, en otra forma de realización, la otra enfermedad o la afección se selecciona de entre el grupo que comprende enfermedades cardíacas, que se seleccionan, de manera no limitativa, al grupo que incluye aterosclerosis, síndromes coronarios agudos e insuficiencia cardíaca.

30 La enfermedad primaria en la presente memoria se refiere a una enfermedad que ya se ha manifestado y/o ya ha mostrado síntomas. La otra enfermedad o la aparición de la afección se refiere a una enfermedad que todavía no se ha manifestado o que todavía no provoca síntomas.

35 La muestra del paciente puede ser seleccionada por ejemplo de entre el grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra sérica, o una muestra de plasma, o un extracto de cualquiera de las muestras anteriormente mencionadas.

40 En una forma de realización preferida de la invención, el método *in vitro* comprende, además, la combinación de dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos, de forma matemática, con el nivel de uno o más biomarcadores de pronóstico adicionales, por lo que, dicha combinación de los niveles de procalcitonina o de sus fragmentos, con dicho nivel de biomarcadores de pronóstico adicionales, incrementa el valor predictivo de dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos o el nivel de dicho biomarcador relacionado, con respecto el riesgo de contraer otra enfermedad o la aparición de otra afección.

45 En el contexto de la presente invención, un "algoritmo" o "algoritmo matemático", se refiere a la utilización de un método o modelo matemático o estadístico que se usa para comparar, con valores de una población de referencia, cierto valor que se ha medido, con objeto de estratificar éste. Este valor puede ser, por ejemplo, el nivel promedio de una cierta entidad, en un conjunto de muestras predeterminadas, lo que significa que el nivel medido de dicha entidad se compara con la media matemática del nivel de dicha entidad en un número determinado de muestras. El número de muestras que se utiliza para determinar la media, no está particularmente limitado, pero será suficiente para asegurar el significado estadístico de la media. El número de muestras que se utilice para determinar la media, puede incluso aumentar a lo largo del tiempo, pues los resultados obtenidos de otros valores de medida a partir de las muestras clínicas, se añaden para aumentar la significación estadística de la media. Preferentemente, el número de muestras se selecciona de modo que la significación estadística de la media esté asegurada. Así, dicha media se utiliza como un valor de referencia, por lo que el nivel medido de la entidad anteriormente mencionada, puede correlacionarse estadísticamente con un cierto estado fisiológico, por ejemplo, la propensión de un resultado adverso para un paciente, que depende del nivel relativo superior o inferior a la media, y del grado de desviación del valor medido a partir de dicho valor medio. En lugar de la media, otros métodos estadísticos, como la determinación de observaciones estadísticas de frecuencia (por ejemplo, cuartiles o percentiles) o modelos matemáticos, preferentemente la Regresión de Cox, pueden utilizarse análogamente a la descripción anterior, para obtener el valor de referencia mencionado anteriormente y/o determinar de otro modo el significado de un valor medido con respecto al estado fisiológico de un individuo dado, a partir del cual se obtuvo la muestra. Dichos métodos o modelos matemáticos o estadísticos son bien conocidos por los expertos en la materia, y su utilización en el contexto de las aplicaciones médicas está bien establecido.

65 El término "biomarcador" (marcador biológico) se refiere a parámetros biológicos medibles y cuantificables (por ejemplo, concentración enzimática específica, concentración hormonal específica, distribución fenotípica génica específica en una población, presencia de sustancias biológicas), que actúan como índices para las evaluaciones

relacionadas con la salud y la fisiología, tales como riesgos patológicos, alteraciones psiquiátricas, exposición medioambiental y sus efectos, diagnósticos patológicos, procesos metabólicos, abuso de sustancias, embarazo, desarrollo de progenies celulares, estudios epidemiológicos, etc. Además, un biomarcador se define como una característica que es medida y evaluada objetivamente como un indicador de los procesos biológicos normales, de los procesos patogénicos, o de las respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Un biomarcador puede medirse en una muestra biológica (como una prueba sanguínea, urinaria o hística), pudiendo consistir también en un registro que se obtiene de una persona (presión sanguínea, ECG, o Holter), o en una prueba en la que esté implicada una imagen (ecocardiograma o rastreo CT) (Vasan *et al*, 2006, *Circulation* 113:2335-2362).

Los biomarcadores pueden indicar diversas características patológicas o de salud, incluyendo el nivel o tipo de exposición a un factor medioambiental, susceptibilidad genética, respuestas genéticas a exposiciones, biomarcadores de enfermedades clínicas o subclínicas, o indicadores de respuestas a la terapia. Así, una forma fácil de juzgar los biomarcadores consiste en considerarlos como indicadores de características patológicas, (factor de riesgo o biomarcador de riesgo), de estados patológicos (preclínicos o clínicos) o de la "tasa" patológica (progresión de la enfermedad). De acuerdo con esto, los biomarcadores pueden clasificarse como biomarcadores de antecedentes (que identifican el riesgo de desarrollar una enfermedad), biomarcadores de cribado (que criban la enfermedad subclínica), biomarcadores de diagnóstico (que reconocen la enfermedad evidente), biomarcadores de estadificación (que clasifican la gravedad de la enfermedad) o los biomarcadores de pronóstico (que predicen el curso futuro de la enfermedad, incluyendo las recidivas y la respuesta terapéutica, y que controlan la eficacia de la terapia). Los biomarcadores pueden servir también como criterios indirectos de valoración. Un criterio indirecto de valoración es uno que puede utilizarse como un resultado en los ensayos clínicos para evaluar la seguridad y la eficacia de las terapias, en lugar de medir el verdadero resultado de interés. El principio que subyace a esta aseveración es que las alteraciones en el criterio indirecto de valoración siguen rigurosamente los cambios en el resultado de interés. Los criterios indirectos de valoración tienen la ventaja de que pueden reunirse en un intervalo de tiempo más corto y con menos coste que los criterios de valoración de morbilidad y mortalidad, que requieren de grandes ensayos clínicos para su evaluación. Otros valores de los criterios indirectos de valoración incluyen el hecho de que se encuentran más próximos a la exposición/intervención de interés y puede ser más fácil relacionarlos causalmente que los eventos clínicos más distantes. Una desventaja importante de los criterios indirectos de valoración es que si el resultado clínico de interés es influido por numerosos factores, (además del criterio indirecto de valoración), la confusión residual puede reducir la validez del criterio indirecto de valoración. Se ha sugerido que la validez de un criterio indirecto de valoración es mayor, si puede explicar, por lo menos, el 50% del efecto de una exposición o intervención sobre el resultado de interés. Por ejemplo, un biomarcador puede ser una proteína, un péptido o una molécula ácido nucleica.

Uno de dichos biomarcadores de pronóstico es preferentemente proBNP o sus fragmentos, en una muestra obtenida en dicho paciente. Más preferentemente, dicho fragmento de proBNP es NT pro-BNP o BNP.

En una forma de realización particular, el método *in vitro* comprende además la determinación del nivel de uno o más biomarcadores pronóstico adicionales en una muestra obtenida a partir de dicho paciente, y correlacionando dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos, y dicho nivel de uno o más de los biomarcadores de pronóstico adicionales para dicha predisposición a un riesgo, por lo que la combinación de dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos, con dicho nivel de uno o más de los biomarcadores adicionales pronóstico, aumenta el valor predictivo de dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos, con respecto a dicho riesgo.

El biomarcador de pronóstico adicional puede, por ejemplo, seleccionarse de entre un grupo que comprende troponina, mieloperoxidasa, CRP, neopterin, GDF-15, ST2, cistatina-C, así como los péptidos siguientes en forma de sus formas maduras, prohormonas (precursores) y fragmentos prohormonales asociados: péptidos natriuréticos, adrenomedulina, endotelinas, vasopresina. Preferentemente, la correlación entre dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos, y dicho nivel de uno o más biomarcadores de pronóstico adicionales, se lleva a cabo mediante un algoritmo matemático.

El objeto de la presente invención es la utilización de un ensayo ultrasensible de la procalcitonina, que presenta un nivel más bajo de detección, inferior a 0,05 ng/ml, preferentemente inferior a 0,04 ng/ml aproximadamente, más preferentemente, inferior a 0,03 ng/ml aproximadamente, y muy preferentemente, inferior a 0,02 ng/ml aproximadamente, para determinar, en un paciente que exhiba una enfermedad primaria que no sea una infección, el riesgo del paciente de contraer otra enfermedad o para mostrar una afección determinada que todavía no se haya manifestado y/o no presente aún síntomas.

En una forma de realización preferida de la utilización del ensayo ultrasensible de la procalcitonina, el nivel de procalcitonina o de sus fragmentos de, por lo menos, 12 aminoácidos de longitud, o de una mezcla de procalcitonina y/o de sus fragmentos, se determina en una muestra de dicho paciente.

En una forma de realización, se determina el nivel de sólo un fragmento. En otra forma de realización, se determina el nivel de una mezcla de procalcitonina y/o de sus fragmentos.

Tal como se menciona en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo diagnóstico" de cualquier tipo puede aplicarse en el ámbito diagnóstico, que comprende de manera no limitativa métodos de ensayo que se basen en reacciones enzimáticas, luminiscencia, fluorescencia o sustancias químicas radioactivas. Los métodos preferidos de selección comprenden ensayos rápidos (ensayos de cabecera), radioinmunoensayos, inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, ensayos de inmunotransferencia, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), ensayos en series de microesferas basados en Luminex, y ensayos de microconjuntos proteicos. Los tipos de ensayo pueden basarse además en placas de microtitulación, en microprocesadores, en microesferas, en las que los biomarcadores pueden estar en solución o unirse a la superficie. Los ensayos pueden ser homogéneos o heterogéneos, ensayos de sándwich, ensayos competitivos y no competitivos. En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo es uno que se adapta a la forma de "ensayo de sándwich", que es un inmunoensayo no competitivo, en el que la molécula que va a detectarse y/o cuantificarse, se une a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede estar unido a una fase sólida, por ejemplo, una microesfera, una superficie de un pocillo u otro contenedor, una tira reactiva o un microprocesador, y el segundo anticuerpo es uno que está marcado, por ejemplo, con un colorante, con un radioisótopo, o una mitad reactiva o catalíticamente activa. La cantidad de anticuerpo marcado en el sitio se mide entonces mediante un método adecuado. La composición general y los métodos implicados en ensayos "de intercalación o emparedado", están bien establecidos y son conocidos por los expertos en la materia (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford, 3ª edición (mayo 2005), ISBN-13:978-0080445267; Hultschig C *et al.*, Cur Opin Chem Biol, febrero 2006, 10 (1):4-10.PMID: 16376134), que se incorpora en la presente memoria como referencia.

En una forma de realización particularmente preferida, el ensayo comprende dos moléculas de captura (sondas de captura), preferentemente anticuerpos, que se encuentran ambos presentes como dispersiones en una mezcla líquida reactiva, en la que un primer componente marcador está unido a la primera molécula de captura, en la que dicho primer componente marcador forma parte de un sistema de marcado que se basa en la extinción o amplificación de la señal fluorescente o quimioluminiscente, y un segundo componente marcador de dicho sistema de marcado que está unido a la segunda molécula de captura, de forma que después de la unión de ambas moléculas de captura al analito que va a detectarse, se genera una señal mensurable que permite la detección de los complejos de sándwich formados en la solución que incluye la muestra.

En el contexto de la presente invención, una sonda de captura puede seleccionarse a partir del grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, particularmente un aptámero, una molécula de hidratos de carbono, una molécula PNA, una proteína, un anticuerpo, un péptido, particularmente un péptido cíclico, o una glicoproteína. Más preferentemente, incluso, dicho sistema de marcado comprende criptatos de tierras raras o quelatos de tierras raras, en combinación con un colorante luminiscente o quimioluminiscente, en particular, un colorante del tipo cianina.

En el contexto de la presente invención, los ensayos que se basan en la fluorescencia incluyen la utilización de colorantes, que pueden seleccionarse, por ejemplo, a partir del grupo que comprende FAM (5-o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, fluoresceínisotiocianato (FITC), IRD-700/800, colorantes de cianina, tales como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2', 7'-dimetodifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirodamina-6G (R6G5), 6-carboxirodamina-6G (RG6), rodamina, rodamina verde, rodamina roja, rodamina 110, colorantes BODIPY, tales como BODIPY TMR, oregon verde, cumarinas tales como umbeliferona, benzimidaz, tales como Hoechst 33258; fenantridinas, como Texas rojo, Yakima amarillo, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina, y similares.

En el contexto de la presente invención, los ensayos que se basan en la quimioluminiscencia comprenden la utilización de colorantes, que se basan en los principios físicos que se describen para los materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 4ª edición, editor ejecutivo J.I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Willey & Sons, 1993, vol 15, págs 518-562, que se incorpora a la presente memoria como referencia, incluyendo las notas en las páginas 551-562. Los colorantes quimioluminiscentes preferidos son los ésteres de acridinio.

En el contexto de la presente invención, el término "ensayo ultrasensible de la procalcitonina" hace referencia a que el ensayo para la detección de la procalcitonina o de sus fragmentos, y/o la cuantificación de su nivel, posee un límite inferior de detección a aproximadamente 0,05 ng/ml, inferior preferentemente, a aproximadamente 0,04 ng/ml, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,03 ng/ml, y muy preferentemente inferior a aproximadamente 0,02 ng/ml.

Un ensayo PCT ultrasensible se lleva a cabo, por ejemplo, con el equipo LIA sensible a PCT (B.R.A.H.M.S. Ag), Hennigsdorf, Alemania, Producto nº 109050). Los niveles de PCT en el contexto de la presente invención pueden determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo como el que se ha descrito anteriormente, preferentemente, con el equipo LIA (Ensayo de Luminiscencia LIA) sensible a PCT (B.R.A.H.M.S. Ag), Hennigsdorf, Alemania, Producto nº 109050), como en el ejemplo 1 o siuguiendo el método general que se describe en el ejemplo 2.

La utilización de un ensayo ultrasensible de la calcitonina se lleva a cabo, preferentemente, para estratificar el riesgo de que un paciente que presente una enfermedad primaria, contraiga otra enfermedad o, también, que exhiba además otra afección.

5 El ensayo ultrasensible de la procalcitonina puede utilizarse para el control del tratamiento o de la prevención de dicha otra enfermedad o dicha otra afección. Preferentemente, dicho tratamiento o dicha prevención comprende la administración al paciente de un antibiótico.

10 El ensayo ultrasensible de la procalcitonina puede consistir, por ejemplo, en un ensayo de sándwich que incluye dos anticuerpos contra distintas mitades de la procalcitonina.

15 En una forma de realización particular de la utilización del ensayo ultrasensible de la procalcitonina, un anticuerpo se dirige a la mitad calcitonina de la procalcitonina y el otro anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra la mitad katacalcina de la procalcitonina.

20 En el contexto de la presente invención, el término "mitad calcitonina de la procalcitonina" se refiere a un polipéptido que incluye los aminoácidos 85-116 de la preprocalcitonina. En el contexto de la presente invención, la "mitad katacalcina de la procalcitonina" a un polipéptido que incluye los aminoácidos 121-141 de la preprocalcitonina. Los números de los anteriores aminoácidos se refieren a la secuencia de la preprocalcitonina humana, tal como se lista en la entrada del banco de datos de proteínas <http://www.expasy.ch/uniprot/PO1258>. También se incluyen secuencias aminoácidas de origen análogo, análogas en otras especies, así como polipéptidos que exhiben, preferentemente, una homología secuencial de, por lo menos, el 90%, más preferentemente por lo menos, del 95%, y muy preferentemente por lo menos, del 98%, con respecto a los polipéptidos humanos mencionados anteriormente.

25 Preferentemente, el paciente muestra una enfermedad primaria no infecciosa siendo el nivel de procalcitonina o de sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos de longitud, [en las muestras séricas o plasmáticas de dicho paciente], inferior a 0,25 ng/ml.

30 El término "antibiótico" en el contexto de la presente invención, se refiere a una sustancia química, que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento o de eliminar microorganismos. Distintos antibióticos pueden tener varios mecanismos de acción, por ejemplo, uniéndose a las subunidades ribosómicas bacterianas e inhibiendo de este modo la biosíntesis proteica, inhibiendo la síntesis de la pared celular, por ejemplo, inhibiendo la síntesis de los péptidoglicanos, interaccionando con la membrana citoplásmica bacteriana y cambiando, por lo tanto, su permeabilidad, inhibiendo las enzimas girasa o topoisomerasa IV del ADN bacteriano e inhibiendo, por lo tanto, la replicación y transcripción de éste, inhibiendo la biosíntesis del folato, o inhibiendo la transcripción uniéndose a la ARN polimerasa. El antibiótico, en el contexto de la presente invención, puede seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que comprende β -lactamas, glicopéptidos, poliquétidos, antibióticos aminoglicósidos, antibióticos polipéptidos, quinolonas y sulfonamidas. Preferentemente, el término se refiere a compuestos betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas o carbapenemos; tetraciclinas, macrólidos; fluoroquinolonas; sulfonamidas; aminoglicósidos; imidazoles: antibióticos-péptidos y lincosamidas. Más preferentemente, el término se refiere a amoxicilina, flucloxacilina, penicilina G, ampicilina, meticilina, oxacilina, cefoxitina, ceftriaxona, ceftizoxima, imipenem, eritromicina, tilosina, tilmicosín, espiramicina, josamicina, azitromicina, claritromicina, tetraciclina, minociclina, doxiciclina, limeciclina, norfloxacina, enoxacina, ofloxacina, co-trimoxazol, ciprofloxacina, trimetoprim, gentamicina, amikacina, metronidazol, bactiracina, clindamicina o lincomicina. Muy preferentemente, el término se refiere a ampicilina, cefotaxima, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina, co-trimoxazol, gentamicina, metronidazol, bacitracina o clindomicina.

50 Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación de los niveles de procalcitonina en muestras de pacientes con diversas enfermedades primarias.

55 Se analizaron 4997 muestras consecutivas de sueros sanguíneos de los pacientes de un laboratorio clínico, para determinar el nivel de procalcitonina (PCT), utilizando el Kit B.R.A.H.M.S para el ensayo de luminiscencia LIA, sensible a PCT (B.R.A.H.M.S. AG, Hennigsdorf, Alemania, Producto nº 109050). Entonces, los sueros de los pacientes se enviaron al laboratorio de análisis por distintos médicos especialistas asesores de diversos ámbitos clínicos tales como nefrología, urología, oncología, pediatría, medicina interna, medicina general y otros. El ensayo se llevó a cabo según el manual con el que el kit está provisto, considerando que el volumen de la muestra se incrementó de 50 a 100 μ l, con el fin de aumentar la sensibilidad funcional del ensayo (FAS), para determinar adecuadamente las concentraciones de PCT en el intervalo de concentraciones inferior (0,05 a 0,25 ng/ml).

65 Las frecuencias de los niveles de PCT determinados se graficaron en un histograma (véase la figura 1 adjunta). El 66,7% de las muestras séricas mostró niveles de PCT superiores 0,017 ng/ml, el 26,0% de las muestras séricas mostró concentraciones PCT superiores a 0,03 ng/ml, y el 14,0% de las muestras séricas mostró niveles PCT superiores a 0,05 ng/ml. Las muestras con concentraciones de PCT superiores a 0,05 ng/ml, (es decir, 702 muestras

de 4997 muestras), se clasificaron según el ámbito clínico del médico especialista asesor, a partir del cual se había originado la muestra respectiva. Esta correlación se grafica en la figura 2 adjunta.

- 5 El gran número de pacientes que mostraban una enfermedad primaria no infecciosa, pero que, sin embargo, mostraban niveles de PCT superiores a 0,03 ng/ml y 0,05 ng/ml, respectivamente, constituye un hallazgo sorprendente.

Ejemplo 2: Método general para la determinación de niveles de procalcitonina en muestras de pacientes.

- 10 La procalcitonina (PCT) puede medirse tal como se ha descrito en (Morgenthaler NG *et al*: Clin. Chem, mayo de 2002, 48(5):788-790). Los anticuerpos de la oveja se elevaron con respecto a la mitad calcitonina de PCT, y un anticuerpo monoclonal de ratón aumentó con respecto a la mitad katacalcina de PCT. Se revistieron tubos de ensayo con el anticuerpo anti-katacalcina. El anticuerpo anti-calcitonina se marcó con MACN Acridiniumester (InVent GmbH, Hennigsdorf, Alemania), que sirvió como marcador. Las diluciones de PCT recombinante en suero normal de
- 15 caballo sirvieron como estándar. Se incubaron 100 µl de muestra o del estándar durante 30 minutos en los tubos de ensayo que se habían revestido, añadiéndose 200 µl del marcador. Después de incubación durante 2 horas, se lavaron los tubos 4 veces con 1 ml de solución LIA de lavado (B.R.A.H.M.S AG) y se unieron. Se midió la quimioluminiscencia utilizando un luminómetro LB952T (Berthold, Alemania).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible que presenta un límite inferior de detección inferior a 0,05 ng/ml para determinar en un paciente que presente una enfermedad primaria que no sea una infección el riesgo del paciente de contraer una enfermedad o afección adicionales que no se han manifestado todavía y/o no resultan todavía sintomáticas en la que el nivel de procalcitonina o de sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos de longitud es determinado en una muestra seleccionada de entre el grupo que comprende una muestra sanguínea, una muestra sérica y una muestra plasmática o un extracto de cualquier muestra mencionada anteriormente obtenida a partir de dicho paciente y en la que dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos es correlacionado con el riesgo del paciente de contraer una enfermedad o afección adicionales que no se han manifestado todavía y/o no son todavía sintomáticas, en la que dicha etapa de correlación del método *in vitro* comprende comparar dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos con un nivel umbral, estando dicho paciente, cuando dicho nivel de procalcitonina o de sus fragmentos supera dicho nivel umbral, predispuesto a dicho riesgo y en la que dicho nivel umbral es de entre 0,02 y 0,25 ng/ml.
- 15 2. Utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible según la reivindicación 1, en la que el nivel de procalcitonina o de sus fragmentos de por lo menos 12 aminoácidos de longitud o una mezcla de procalcitonina y/o de sus fragmentos, es determinado en una muestra sérica de dicho paciente.
- 20 3. Utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible según la reivindicación 1 o 2, para estratificar el riesgo de contraer una enfermedad o afección adicionales en un paciente que presenta una enfermedad primaria.
- 25 4. Utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible según las reivindicaciones 1 a 3, para el control del tratamiento o de la prevención de dichas enfermedad o afección adicionales.
5. Utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible según la reivindicación 4, en la que dichos tratamiento o prevención comprenden la administración de un antibiótico al paciente.
- 30 6. Utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible según las reivindicaciones 1 a 5, en la que el ensayo es un ensayo de tipo sándwich que comprende dos anticuerpos contra diferentes fracciones de la procalcitonina.
- 35 7. Utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible según las reivindicaciones 1 a 6, en la que un anticuerpo es contra la fracción de calcitonina de la procalcitonina, y el otro anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra la fracción de catacalcina de la procalcitonina.

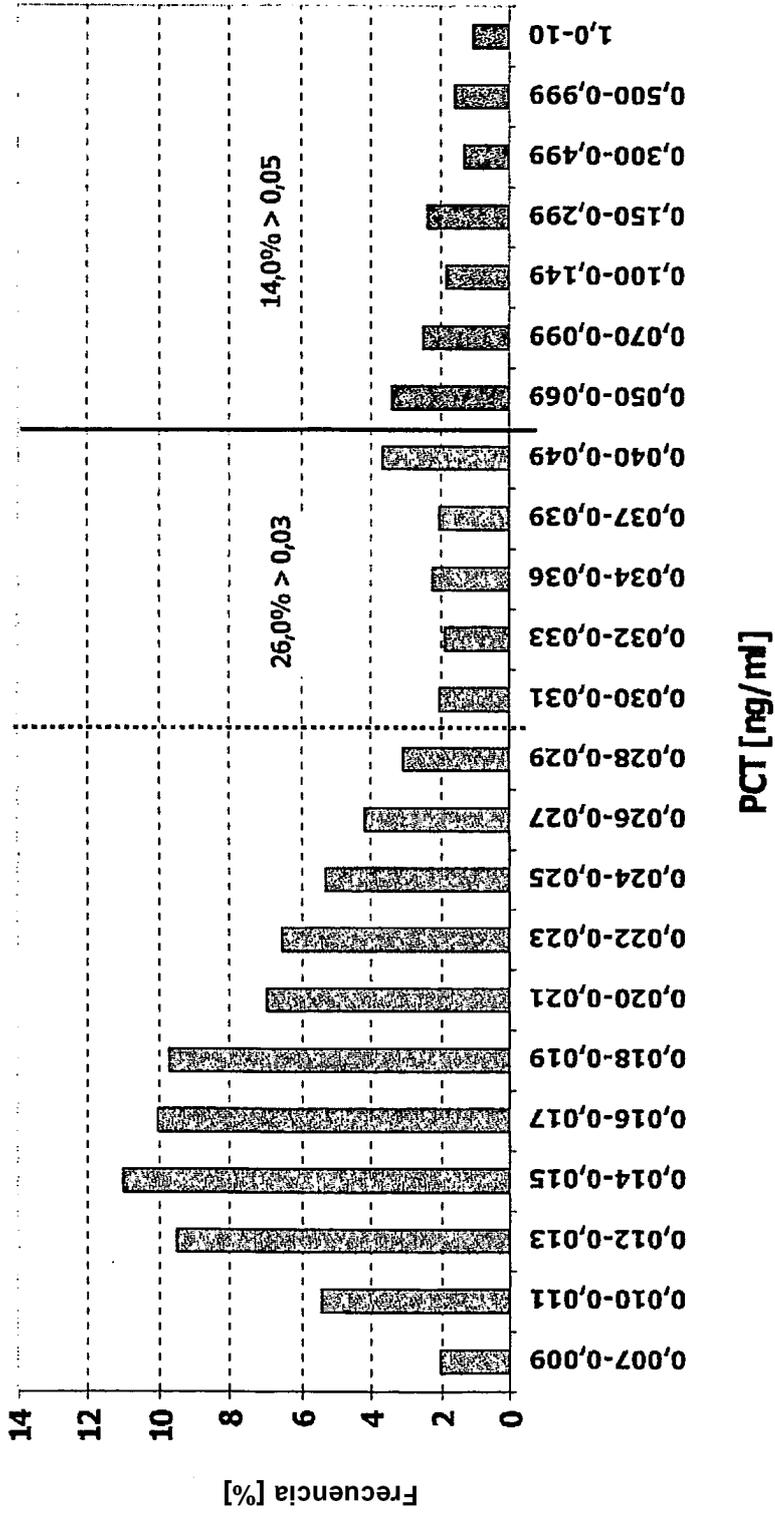


Fig. 1

Fig. 2

