

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 310**

51 Int. Cl.:

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 10188287 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2301626**

54 Título: **Antibiótico para su utilización en una infección local**

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:

17.05.2013

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 2 403 310 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

Antibiótico para su utilización en una infección local.

- 5 El objeto de la presente memoria descriptiva es entre otros el diagnóstico, el pronóstico y la estratificación del riesgo *in vitro* de un paciente que presenta una enfermedad primaria, no infecciosa, indicando así el nivel de procalcitonina (PCT) en una muestra de un fluido corporal del paciente el riesgo de que el paciente contraiga una afección o enfermedad adicionales.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La procalcitonina (PCT) se ha convertido en un biomarcador bien establecido para el diagnóstico de septicemia: la PCT refleja la gravedad de la infección bacteriana y se utiliza en particular para monitorizar la progresión de la infección a septicemia, septicemia grave o choque septicémico. Las concentraciones de PCT en septicemia, septicemia grave o choque septicémico son normalmente superiores a 1 ng/ml. Es posible utilizar la PCT para medir la actividad de la respuesta inflamatoria sistémica asociada a la infección, para controlar el éxito de la terapia y para 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 YJ *et al.*: Predictive comparisons of procalcitonin (PCT) level, arterial ketone body ratio (AKBR), 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, 1L-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 septicemia 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).

30 Un número creciente de estudios mencionan el posible papel de la PCT en enfermedades infecciosas no septicémicas como neumonía, meningitis bacteriana y 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).

35 Estudios *in vitro* mostraron que la PCT desempeña un papel importante durante la migración y adhesión de monocitos y además presenta un efecto sobre la expresión génica de óxido nítrico sintasa inducible (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 FJ *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.).

45 Se ha utilizado PCT para guiar la terapia con antibióticos (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.): Se midió la PCT en pacientes con síntomas de infecciones de las vías respiratorias inferiores que acudían al servicio de urgencias, y sólo se trataron con antibióticos pacientes con concentraciones de PCT >0,25 ng/ml o >0,5 ng/ml. Aparentemente, este régimen condujo a un desenlace clínico indistinguible del grupo control, en el que también muchos pacientes con concentraciones de PCT <0,25 ng/ml recibieron antibióticos. Debe apreciarse, en este estudio, se excluyeron pacientes con comorbilidades relevantes como por ejemplo insuficiencia cardiaca. Por tanto, no está claro hasta la fecha si la presencia de una enfermedad primaria además de una infección influiría en la interpretación de concentraciones de PCT por debajo de 0,25 ng/ml. Una enfermedad primaria relevante podría suponer una carga adicional sobre el sistema inmunitario, y biomarcadores de infección, tales como PCT, en una situación de este tipo podrían ser indicativos de una infección en un intervalo de concentración diferente, es decir, inferior, que en ausencia de una enfermedad primaria relevante.

55 En individuos sanos, la concentración de PCT está muy por debajo de 0,25 ng/ml: se ha determinado que la mediana de la concentración 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.)

60 Se describe un método para el diagnóstico de infecciones o enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias y los pulmones con insuficiencia cardiaca asociada, en el que se determina el biomarcador procalcitonina en un paciente, en el documento WO 2008/040328 A2.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que en muestras de pacientes con una enfermedad primaria, no infecciosa, se han detectado niveles (concentraciones) de procalcitonina (PCT) ligeramente elevados con mucha frecuencia y son de relevancia diagnóstica. Notablemente, se han identificado un gran número de muestras que presentan niveles séricos por encima de 0,03 ng/ml (26,0%) y 0,05 ng/ml (14,7%), respectivamente, a partir de un total de 4997 muestras de pacientes que presentan una enfermedad primaria, no infecciosa. Niveles de PCT ligeramente elevados se refiere a niveles de PCT en el intervalo de desde aproximadamente 0,02 a 0,25 ng/ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,02 y 0,1 ng/ml. La presencia de niveles de PCT ligeramente elevados puede ser indicativa del riesgo de que un paciente que presenta una enfermedad primaria no infecciosa adquiera una afección o enfermedad adicionales aún no manifestado clínicamente y/o aún asintomático. Una afección o enfermedad adicionales de este tipo pueden estar relacionadas con una infección local o la infección local puede facilitar, acelerar y/o potenciar el riesgo de contraer o adquirir la afección o enfermedad adicionales. La presente invención proporciona un método para el pronóstico del riesgo de que un paciente adquiera una afección o enfermedad adicionales además de una enfermedad primaria no infecciosa. Esto también permite la adaptación del tratamiento de estos pacientes, por ejemplo mediante una terapia con antibióticos adicional que el paciente no habría recibido necesariamente si no se hubiese detectado el nivel de PCT elevado. Debe indicarse que, hasta la fecha, no se examinan de manera rutinaria pacientes con enfermedades primarias no infecciosas para determinar sus niveles de PCT durante el diagnóstico. Se enseña mediante la presente invención que los pacientes con una enfermedad primaria que no es una infección deben someterse a ensayo para determinar su nivel de PCT para permitir el pronóstico del riesgo de adquirir una afección o enfermedad adicionales y en última instancia para permitir la adaptación de la terapia.

La invención en su forma más amplia se define mediante la reivindicación independiente 1:

Antibiótico para la utilización en el tratamiento de una infección local para la prevención de una afección o enfermedad adicionales que aún no se ha manifestado en un paciente que presenta una enfermedad primaria, en el que dicha enfermedad primaria no es una infección y en el que el antibiótico se administra cuando el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos de longitud, en una muestra del paciente seleccionada del grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma, está entre 0,02 y 0,25 ng/ml.

Se encuentra una forma de realización preferida en la reivindicación 2.

La presente memoria descriptiva proporciona un método *in vitro* para el pronóstico de un paciente que presenta una enfermedad primaria que no es una infección, comprendiendo el método: determinar el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos de longitud, preferiblemente más de 50 aminoácidos de longitud, más preferiblemente más de 110 aminoácidos de longitud, en una muestra obtenida de dicho paciente; y correlacionar dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con un riesgo de que el paciente contraiga una afección o enfermedad adicionales que aún no se ha manifestado y/o aún no es sintomático.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un gráfico de histograma de la frecuencia de intervalos de niveles de procalcitonina en muestras de pacientes. Éstas eran 4997 muestras no seleccionadas enviadas consecutivamente por médicos de diversas especialidades a un laboratorio privado para diversos tipos de análisis, pero no PCT,

la figura 2 muestra la distribución de niveles de PCT por encima de 0,05 ng/ml en relación al campo médico del médico especialista de consulta que proporcionó la muestra respectiva. Se indican las medianas en todos los grupos.

Descripción detallada de la invención

La presente memoria descriptiva se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de un paciente que presenta una enfermedad primaria que no es una infección, comprendiendo el método: determinar el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos de longitud, preferiblemente más de 50 aminoácidos de longitud, más preferiblemente más de 110 aminoácidos de longitud, en una muestra obtenida de dicho paciente; y correlacionar dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con un riesgo de que el paciente contraiga una afección o enfermedad adicionales que aún no se ha manifestado y/o aún no es sintomático.

“Pacientes” en el significado de la invención se entiende que son todas las personas o animales, independientemente de si muestran o no cambios patológicos, a menos que se establezca lo contrario. En una realización preferida el paciente según la invención es un ser humano.

Preferiblemente, el paciente en el contexto de la presente invención presenta una enfermedad primaria que no es una infección y el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos de longitud, en muestras de suero o plasma de dicho paciente está por debajo de 0,25 ng/ml.

5 En la presente invención, el término “pronóstico” indica una predicción de cómo progresará la afección de un sujeto (por ejemplo de un paciente). Esto puede incluir una estimación de la posibilidad de recuperación o la posibilidad de un desenlace adverso para dicho sujeto.

10 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 las proteínas o péptidos más grandes mediante saponificación de uno o más de sus enlaces peptídicos.

15 La procalcitonina es un péptido que comprende 116 aminoácidos. Existen también variantes más pequeñas, tales como por ejemplo PCT 3-116 y otras. Por tanto, la longitud de los fragmentos de procalcitonina es de al menos 12 aminoácidos, preferiblemente más de 50 aminoácidos, más preferiblemente más de 110 aminoácidos.

20 Preferiblemente, en la presente memoria, dicho riesgo de contraer una afección o enfermedad adicionales está relacionado con una infección bacteriana existente, particularmente una infección local. Una infección local puede facilitar, acelerar y/o potenciar el riesgo de contraer o adquirir una afección o enfermedad adicionales en un paciente que presenta una enfermedad primaria no infecciosa.

25 En las formas de realización particularmente preferidas del método *in vitro*, dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma es indicativo de una infección bacteriana en el paciente.

Se prefiere adicionalmente que dicha infección sea una infección local.

30 Una infección local en la presente memoria se refiere a todas las infecciones que son menos graves que una septicemia. Una septicemia se define como una infección que está asociada con el “síndrome de respuesta inflamatoria sistémica” (“SRIS”) (Levy MM *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. Abril de 2003; 31 (4): 1250-6).

35 La infección local puede ser por ejemplo una infección en la cavidad oral, en los dientes o la raíz de los dientes, infección en heridas, infección en las vías respiratorias o hemorroides, u otras. Dicha infección local en la presente memoria puede tratarse mediante la administración de un antibiótico. El tratamiento de la infección local conduce a una disminución del riesgo de que el paciente adquiera la afección o enfermedad adicionales. Por tanto, en una forma de realización preferida del método *in vitro*, dicha infección bacteriana puede tratarse con un antibiótico. En este caso se prefiere que el riesgo de contraer una afección o enfermedad adicionales disminuya cuando el paciente se trata con un antibiótico.

40 La etapa de correlación del método *in vitro* de la presente invención comprende preferiblemente comparar dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con un nivel umbral, mediante lo cual, cuando dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma supera dicho nivel umbral, dicho paciente está predispuesto a dicho riesgo.

45 Dicho nivel umbral está preferiblemente entre 0,02 y 0,25 ng/ml, más preferiblemente entre 0,02 y 0,1 ng/ml, incluso más preferiblemente a aproximadamente 0,05 (+/- 0,01) ng/ml, y lo más preferiblemente a aproximadamente 0,03 (+/- 0,01) ng/ml. La definición de estos niveles umbral proviene del análisis de la distribución de frecuencia de los intervalos de niveles de PCT mostrados en el histograma de la figura 1 y el ejemplo 1 adjuntos.

50 En una forma de realización particular, dicha enfermedad primaria no es la arteriosclerosis. En otra forma de realización, dicha enfermedad primaria no es insuficiencia cardíaca. En algunas formas de realización de la invención, dicha enfermedad primaria no es un síndrome coronario agudo. Además, en una realización particular preferida, dicha enfermedad primaria no es una enfermedad coronaria. En una realización particular, la afección o enfermedad adicionales no se selecciona del grupo que comprende síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca o infarto de miocardio.

En una forma de realización, dicha afección o enfermedad adicionales no es una infección, particularmente no una infección de las vías respiratorias y los pulmones.

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

Además, en otra realización, dicha afección o enfermedad adicionales se selecciona del grupo que comprende enfermedades cardiológicas seleccionadas de manera no limitativa de entre el grupo que comprende aterosclerosis, síndromes coronarios agudos e insuficiencia cardíaca.

5 La enfermedad primaria en la presente memoria se refiere a una enfermedad que ya se manifiesta y/o ya es sintomática. La afección o enfermedad adicionales se refiere a una enfermedad que aún no se manifiesta y/o aún no es sintomática.

10 La muestra del paciente puede seleccionarse por ejemplo del grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma y una muestra de orina o un extracto de cualquiera de las muestras mencionadas anteriormente.

15 En una realización particular de la memoria descriptiva, el método *in vitro* comprende además combinar matemáticamente dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con el nivel de uno o más biomarcadores de pronóstico adicionales, mediante lo cual la combinación de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con dicho nivel de biomarcador(es) de pronóstico adicional(es) aumenta el valor predictivo de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma o el nivel de dicho biomarcador relacionado para dicho riesgo de contraer una afección o enfermedad adicionales.

20 En el contexto de la presente memoria descriptiva, un “algoritmo” o “algoritmo matemático” se refiere a la utilización de un modelo o método estadístico o matemático utilizado para comparar un determinado valor medido con valores de una población de referencia con el fin de estratificar dicho valor medido. Éste puede ser por ejemplo la mediana del nivel de una determinada entidad en un conjunto de muestras predeterminadas, lo que significa que el nivel medido de dicha entidad se compara con la mediana matemática del nivel de dicha entidad en un número de
25 muestras dado. El número de muestras utilizado para determinar la mediana no está limitado particularmente, pero debe ser suficiente con el fin de garantizar la significación estadística de la mediana. El número de muestras utilizadas para determinar la mediana puede incluso aumentar a lo largo del transcurso del tiempo, ya que se añaden los resultados de valores de medición adicionales de muestras clínicas con el fin de amentar la significación estadística de la mediana. Preferiblemente, el número de muestras se elige de manera que se garantice la significación estadística de la mediana. Por tanto, dicha mediana se utiliza como valor de referencia, mediante lo cual el nivel medido de la entidad mencionada anteriormente puede correlacionarse estadísticamente con un determinado estado fisiológico, por ejemplo, la propensión de un desenlace adverso para un paciente, dependiendo del nivel relativo por encima o por debajo de la mediana y el grado de desviación del valor medido con respecto a dicha mediana. En lugar de la mediana, otros métodos estadísticos, tales como la determinación de cuantiles (por
35 ejemplo cuantiles o percentiles) o modelos matemáticos, preferiblemente regresión Cox pueden utilizarse de manera análoga a la descripción anterior con el fin de obtener el valor de referencia mencionado anteriormente y/o determinar por lo demás la significación de un valor medido con respecto al estado fisiológico de un sujeto dado del que se ha obtenido la muestra. Dichos modelos o métodos estadísticos o matemáticos son bien conocidos por el experto en la materia y la utilización de los mismos en el contexto de aplicaciones médicas está bien establecida.

40 El “término” biomarcador (marcador biológico) se refiere a parámetros biológicos medibles y cuantificables (por ejemplo, concentración de enzimas específicas, concentración de hormonas específicas, distribución fenotípica de genes específicos en una población, presencia de sustancias biológicas) que sirven como índices para evaluaciones relacionadas con la fisiología y la salud, tales como riesgo de enfermedad, trastornos psiquiátricos, exposición medioambiental y sus efectos, diagnóstico de enfermedades, procesos metabólicos, drogadicción, embarazo, desarrollo de líneas celulares, estudios epidemiológicos, etc. Además, un biomarcador se define como una característica que se mide y se evalúa de manera objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Un biomarcador puede medirse en una muestra biológica (como una prueba de sangre, orina o tejido), puede ser un registro obtenido de una persona (tensión arterial, ECG o Holter), o puede ser una prueba de obtención de imágenes (ecocardiograma o tomografía
50 computarizada) (Vasan *et al.* 2006, *Circulation* 113:2335-2362).

Los biomarcadores pueden indicar una variedad de características de salud o enfermedad, incluyendo el nivel o tipo de exposición a un factor medioambiental, susceptibilidad genética, respuestas genéticas a exposiciones,
55 biomarcadores de enfermedad clínica o subclínica, o indicadores de respuesta a la terapia. Por tanto, un modo simplista de pensar en biomarcadores es como indicadores de rasgo de enfermedad (factor de riesgo o biomarcador de riesgo), estado de enfermedad (preclínica o clínica) o tasa de enfermedad (progresión). Por consiguiente, los biomarcadores pueden clasificarse como biomarcadores de antecedentes (que identifican el riesgo de desarrollar una enfermedad), biomarcadores de selección (que seleccionan la enfermedad subclínica), biomarcadores de diagnóstico (que reconocen una enfermedad manifiesta), biomarcadores de estadificación (que clasifican la gravedad de la enfermedad) o biomarcadores de pronóstico (que predicen el futuro transcurso de la enfermedad, incluyendo la recidiva y la respuesta a la terapia, y que monitorizan la eficacia de la terapia). Los biomarcadores también pueden servir como criterios de valoración sustitutos. Un criterio de valoración sustituto es uno que puede utilizarse como desenlace en ensayos clínicos para evaluar la seguridad y eficacia de terapias en vez de la medición
60 del desenlace verdadero de interés. El principio subyacente es que alteraciones en el criterio de valoración sustituto siguen estrechamente los cambios en el desenlace de interés. Los criterios de valoración sustitutos presentan la

ventaja de que pueden recogerse en un lapso de tiempo más corto y con menos gastos que criterios de valoración tales como morbilidad y mortalidad, que requieren grandes ensayos clínicos para su evaluación. Los valores adicionales de criterios de valoración sustitutos incluyen el hecho de que están más próximos a la exposición/intervención de interés y pueden ser más fáciles de relacionar causalmente que acontecimientos clínicos más distantes. Una desventaja importante de los criterios de valoración sustitutos es que si el desenlace clínico de interés es influido por numerosos factores (además del criterio de valoración sustituto), la confusión residual puede reducir la validez del criterio de valoración sustituto. Se ha sugerido que la validez de un criterio de valoración sustituto es mayor si puede explicar al menos el 50% del efecto de una exposición o intervención sobre el desenlace de interés. Por ejemplo un biomarcador puede ser una proteína, un péptido o una molécula de ácido nucleico.

Uno de dicho(s) biomarcador(es) de pronóstico es preferiblemente proBNP o fragmentos del mismo en una muestra obtenida de dicho paciente. Más preferiblemente, dicho fragmento de proBNP es NT pro-BNP o BNP.

En una realización particular, el método *in vitro* comprende además determinar el nivel de uno o más biomarcadores de pronóstico adicionales en una muestra obtenida de dicho paciente, y correlacionar tanto dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma como dicho nivel de uno o más biomarcadores de pronóstico adicionales con dicha predisposición a un riesgo, mediante lo cual la combinación de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con dicho nivel de uno o más biomarcadores de pronóstico adicionales aumenta el valor predictivo de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma para dicho riesgo.

El biomarcador de pronóstico adicional puede seleccionarse por ejemplo de un grupo que comprende troponina, mieloperoxidasa, CRP, neopterina, GDF-15, ST2, cistatina-C, así como los siguientes péptidos en forma de sus péptidos maduros, prohormonas (precursores) y fragmentos de prohormonas asociados: péptidos natriuréticos, adrenomedulina, endotelinas, vasopresina.

Preferiblemente, la correlación entre dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma y dicho nivel de uno o más biomarcadores de pronóstico adicionales se realiza con un algoritmo matemático.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a la utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible que presenta un límite de detección inferior de por debajo de aproximadamente 0,05 ng/ml, preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,04 ng/ml, más preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,03 ng/ml, lo más preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,02 ng/ml para determinar en un paciente que presenta una enfermedad primaria que no es una infección el riesgo de que el paciente contraiga una afección o enfermedad adicionales que aún no se ha manifestado y/o aún no es sintomático.

En una realización preferida de la utilización del ensayo de procalcitonina ultrasensible, el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos de longitud o una mezcla de procalcitonina y/o fragmentos de la misma, se determina en una muestra de dicho paciente. En una realización se determina el nivel de sólo un fragmento. En otra realización se determina el nivel de una mezcla de procalcitonina y/o fragmentos de la misma.

Tal como se menciona en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo de diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo de diagnóstico, que comprende de manera no limitativa métodos de ensayo basados en reacciones enzimáticas, luminiscencia, fluorescencia o compuestos radioquímicos. Los métodos de detección preferidos comprenden pruebas rápidas (pruebas en el centro de atención), radioinmunoensayos, inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, ensayos de inmunotransferencia, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), matrices de perlas basadas en Luminex y ensayos de micromatrices de proteínas. Los tipos de ensayos pueden estar además basados en placas de microtitulación, basados en chips y basados en perlas, en los que los biomarcadores pueden unirse a la superficie o estar en disolución. Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos de tipo "sándwich", ensayos competitivos y no competitivos. En una realización particularmente preferida, el ensayo está en forma de un ensayo de tipo "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 unirse a una fase sólida, por ejemplo una perla, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que está marcado, por ejemplo, con un colorante, con un radioisótopo o un resto reactivo o catalíticamente activo. La cantidad de anticuerpo marcado en el sitio se mide entonces mediante un método apropiado. La composición general y los procedimientos implicados con los "ensayos de tipo sándwich" están bien establecidos y son conocidos por el experto en la materia (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª ed. (mayo de 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C *et al.*, Curr Opin Chem Biol. Febrero de 2006; 10(1):4-10. PMID: 16376134).

En una realización particularmente preferida, el ensayo comprende dos moléculas de captura (sondas de captura), preferiblemente anticuerpos que están ambos presentes como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en el que se une un primer componente de marcado a la primera molécula de captura, en el que dicho primer componente de marcado es parte de un sistema de marcado basado en amplificación o extinción de fluorescencia o quimioluminiscencia, y se une un segundo componente de marcado de dicho sistema de marcado a la segunda molécula de captura, de modo que tras la unión de ambas moléculas de captura al analito que va a detectarse, se

genera una señal medible que permite la detección de los complejos de tipo “sándwich” formados en la disolución que comprende la muestra.

5 En el contexto de la presente memoria descriptiva, puede seleccionarse una sonda de captura del grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, particularmente un aptámero, una molécula de hidrato de carbono, una molécula de PNA, una proteína, un anticuerpo, un péptido, particularmente un péptido cíclico o una glicoproteína.

10 Incluso más preferiblemente, dicho sistema de marcado comprende criptatos de tierras raras o quelatos de tierras raras en combinación con un colorante fluorescente o colorante quimioluminiscente, en particular un colorante del tipo cianina.

15 En el contexto de la presente memoria descriptiva, los ensayos basados en fluorescencia comprenden la utilización de colorantes, que pueden seleccionarse por ejemplo del grupo que comprende FAM (5 ó 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, colorantes de cianina, tales como CY3, CYS, 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-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G (RG6), rodamina, rodamina verde, rodamina roja, rodamina 110, colorantes BODIPY, tales como BODIPY TMR, Oregon Green, cumarinas tales como umbeliferona, bencimidias, tales como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como Texas Red, Yakima Yellow, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina, y similares.

25 En el contexto de la presente memoria descriptiva, los ensayos basados en quimioluminiscencia comprenden la utilización de colorantes, basados en los principios físicos descritos para materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4ª ed., editor ejecutivo, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol. 15, p. 518-552, incorporado en la presente memoria como referencia, incluyendo las citas en las páginas 551-562. Los colorantes quimioluminiscentes preferidos son los ésteres de acridinio.

30 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término “ensayo de procalcitonina ultrasensible” significa que el ensayo para la detección de procalcitonina o fragmentos de la misma y/o la cuantificación del nivel de la misma presenta un límite de detección inferior de por debajo de aproximadamente 0,05 ng/ml, preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,04 ng/ml, más preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,03 ng/ml, lo más preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,02 ng/ml.

35 Un ensayo de PCT ultrasensible es por ejemplo el kit de LIA (inmunoensayo de luminiscencia) sensible a PCT (B.R.A.H.M.S AG, Hennigsdorf, Alemania, n.º de producto 109.050). Los niveles de PCT en el contexto de la presente invención pueden determinarse por ejemplo con un ensayo tal como se describió anteriormente, preferiblemente con el kit de LIA (inmunoensayo de luminiscencia) sensible a PCT (B.R.A.H.M.S AG, Hennigsdorf, Alemania, n.º de producto 109.050) como en el ejemplo 1 o siguiendo el procedimiento general descrito en el ejemplo 2.

40 La utilización de un ensayo de procalcitonina ultrasensible es preferiblemente para estratificar el riesgo de contraer una afección o enfermedad adicionales en un paciente que presenta una enfermedad primaria.

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

50 El ensayo de procalcitonina ultrasensible puede ser por ejemplo un ensayo de tipo “sándwich” que comprende dos anticuerpos contra diferentes restos de procalcitonina.

55 En una realización particular de la utilización del ensayo de procalcitonina ultrasensible, un anticuerpo es contra el resto calcitonina de la procalcitonina, y el otro anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra el resto catacalcina de la procalcitonina.

60 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término “resto calcitonina de la procalcitonina” se refiere a un polipéptido que comprende los aminoácidos 85-116 de preprocalcitonina. En el contexto de la presente invención, el “resto catacalcina de la procalcitonina” se refiere a un polipéptido que comprende los aminoácidos 121-141 de preprocalcitonina. Los números de aminoácido anteriores se refieren a la secuencia de preprocalcitonina humana tal como se enumera en la entrada del banco de datos de proteínas <http://www.expasy.ch/uniprot/P01258>. Están asimismo comprendidas las secuencias de aminoácidos de origen análogo análogas en otras especies, así como polipéptidos con preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, lo más preferiblemente al menos el 98% de homología de secuencia con los polipéptidos humanos mencionados anteriormente.

65 Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a un antibiótico para la utilización en el tratamiento de una infección local para la prevención de una afección o enfermedad adicionales que aún no se ha manifestado en un

paciente que presenta una enfermedad primaria, en el que dicha enfermedad primaria no es una infección y en el que el antibiótico se administra cuando el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos de longitud, en una muestra del paciente seleccionada del grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma, está entre 0,02 y 0,25 ng/ml, preferiblemente entre 0,02 y 0,1 ng/ml. Preferiblemente, el riesgo de contraer una afección o enfermedad adicionales disminuye cuando dicho paciente se trata con un antibiótico.

En un aspecto adicional, la memoria descriptiva se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de la presencia de una infección bacteriana en un paciente, comprendiendo el método: determinar el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos de longitud, en una muestra obtenida de dicho paciente:

(i) al menos una vez antes del inicio de dicho tratamiento con antibióticos o en el plazo de seis horas tras el inicio del tratamiento, y

(ii) al menos una vez tras de 12 horas a 1 semana tras el inicio del tratamiento con antibióticos del paciente; y

correlacionar dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con la presencia de una infección bacteriana, en el que una disminución de dicho nivel de al menos el 20% por 24 h ng/ml es indicativa de la presencia de una infección bacteriana en el paciente.

Preferiblemente, el paciente presenta una enfermedad primaria que no es una infección y el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos de longitud, en muestras de suero o plasma de dicho paciente está por debajo de 0,25 ng/ml.

El término "antibiótico" en el contexto de la presente invención se refiere a una sustancia química, que presenta la capacidad para inhibir el crecimiento de o destruir microorganismos. Diferentes antibióticos pueden presentar diversos mecanismos de acción, por ejemplo, uniéndose a subunidades ribosómicas bacterianas, inhibiendo de ese modo la biosíntesis de proteínas, inhibiendo la síntesis de la pared celular, por ejemplo inhibiendo la síntesis de peptidoglicanos, interaccionando con la membrana citoplasmática bacteriana, cambiando por ejemplo de ese modo su permeabilidad, inhibiendo la enzima ADN girasa o topoisomerasa IV bacteriana, inhibiendo de ese modo la replicación y transcripción del ADN, inhibiendo la síntesis de folato o inhibiendo la transcripción uniéndose a la ARN polimerasa. El antibiótico en el contexto de la presente invención puede seleccionarse por ejemplo del grupo que comprende β -lactamas, glicopéptidos, poliquétidos, antibióticos de aminoglucósidos, antibióticos polipeptídicos, quinolonas y sulfonamidas. Preferiblemente, el término se refiere a compuestos de beta-lactama como penicilinas, cefalosporinas o carbapenems; tetraciclinas; macrólidos; fluoroquinolonas; sulfonamidas; aminoglucósidos; imidazoles; antibióticos peptídicos y lincosamidas. Más preferiblemente, el término se refiere a amoxicilina, flucloraxilina, penicilina G, ampicilina, meticilina, oxacilina, cefoxitina, ceftriaxona, ceftrizoxima, imipenem, eritromicina, tilosina, tilmicosina, espiramicina, josamicina, azitromicina, claritromicina, tetraciclina, minociclina, doxiciclina, limeciclina, norfloxacin, enoxacin, ofloxacin, cotrimoxazol, ciproflaxacin, trimetoprim, gentamicina, amikacina, metronidazol, bactiracina, clindamicina o lincomicina. Lo más preferiblemente, el término se refiere a ampicilina, cefotaxima, eritromicina, tetraciclina, ciproflaxacin, cotrimoxazol, gentamicina, metronidazol, bacitracina o clindomicina.

Ejemplos

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

Se han analizado 4997 muestras de sueros sanguíneos consecutivas de pacientes de un laboratorio clínico para determinar el nivel de procalcitonina (PCT) utilizando el kit de LIA (inmunoensayo de luminiscencia) sensible a PCT de B.R.A.H.M.S (B.R.A.H.M.S AG, Hennigsdorf, Alemania, n.º de producto. 109.050). Los sueros de los pacientes se han enviado para su análisis al laboratorio por diferentes médicos especialistas de consulta de diversos campos médicos tales como nefrología, urología, oncología, pediatría, medicina interna, medicina general y otros. El ensayo se ha realizado según el manual enviado con el kit, excepto porque el volumen de las muestras se ha aumentado desde 50 μ l hasta 100 μ l para aumentar la sensibilidad funcional del ensayo (FAS) y para determinar de manera fiable las concentraciones de PCT en el intervalo de concentración inferior (de 0,05 a 0,25 ng/ml).

Las frecuencias de los niveles de PCT determinados se han representado gráficamente en un histograma (véase la figura 1 adjunta). El 66,7% de las muestras de sueros mostraban niveles de PCT por encima de 0,017 ng/ml, el 26,0% de las muestras de sueros mostraban concentraciones de PCT de por encima de 0,03 ng/ml y el 14,0% de las muestras de sueros mostraban niveles de PCT de por encima de 0,05 ng/ml. Las muestras que presentaban concentraciones de PCT por encima de 0,05 ng/ml (es decir, 702 muestras de 4997 muestras) se han clasificado según el campo médico del médico especialista de consulta del que se originó la muestra respectiva. Esta correlación se representa gráficamente en la figura 2 adjunta. El alto número de pacientes que presentaban una enfermedad primaria que no era una infección pero que no obstante presentaban niveles de PCT por encima de 0,03 ng/ml y 0,05 ng/ml, respectivamente, es un hallazgo sorprendente.

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

- 5 La procalcitonina (PCT) puede medirse tal como se describe (Morgenthaler NG *et al.*: Clin Chem, mayo de 2002, 48(5), 788-790). Se generaron anticuerpos de oveja contra el resto calcitonina de la PCT, y se generó un anticuerpo monoclonal de ratón contra el resto catacalcina de la PCT. Se recubrieron tubos con el anticuerpo anti-catacalcina. Se marcó el anticuerpo anti-calcitonina con éster de acridinio MACN (InVent GmbH, Hennigsdorf, Alemania) y sirvió como trazador. Unas diluciones de PCT recombinante en suero de caballo normal sirvieron como patrones. Se
- 10 incubaron 100 µl de muestra o patrón en los tubos recubiertos durante 30 minutos, se añadieron 200 µl de trazador. Tras la incubación durante 2 h, se lavaron los tubos 4 veces con 1 ml de disolución de lavado de LIA (B.R.A.H.M.S AG), y se unieron. Se midió la quimioluminiscencia utilizando un luminómetro LB952T (Berthold, Alemania).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Antibiótico para la utilización en el tratamiento de una infección local para la prevención de una afección o enfermedad adicionales que aún no se han manifestado en un paciente que presenta una enfermedad primaria, en el que dicha enfermedad primaria no es una infección y en el que el antibiótico es administrado cuando el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos de longitud, en una muestra del paciente seleccionada de entre el grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma, se encuentra entre 0,02 y 0,25 ng/ml.
- 10 2. Antibiótico según la reivindicación 1, en el que el riesgo de contraer una afección o enfermedad adicionales disminuye cuando dicho paciente es tratado con un antibiótico.

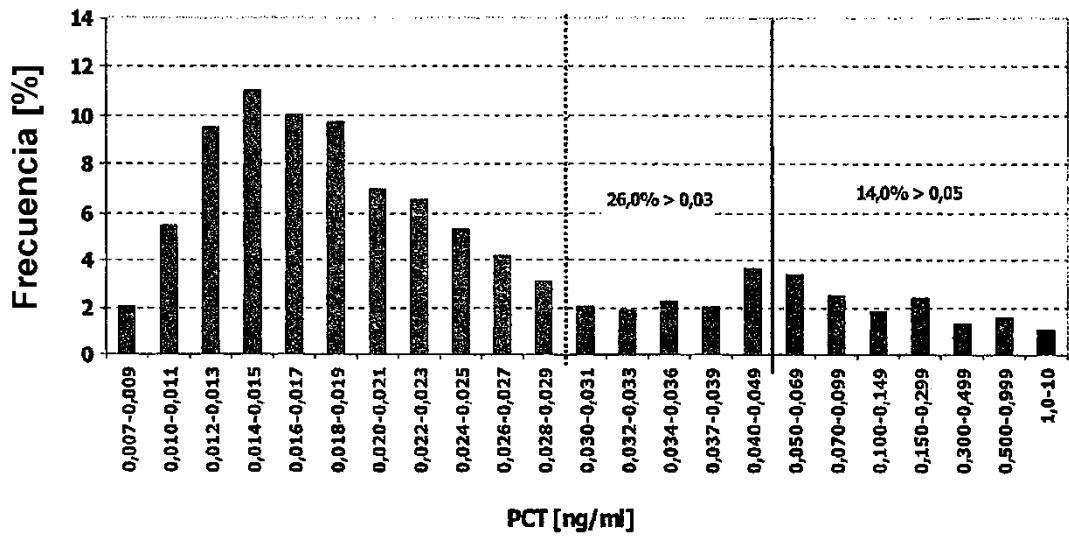


Fig. 1

Fig. 2

