(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 617 982**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2010** **PCT/EP2010/062597**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011** **WO2011023813**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2010** **E 10745669 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017** **EP 2470910**

(54) Título: **Procalcitonina para la prognosis de eventos adversos**

(30) Prioridad:

28.08.2009 EP 09011073

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2017

(73) Titular/es:

B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE

(72) Inventor/es:

STRUCK, JOACHIM y
BAKKER, S., J., L.

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 617 982 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

Procalcitonina para la prognosis de eventos adversos

Sector de la invención

La presente invención, pertenece al sector de los diagnósticos clínicos. De una forma particular, la presente invención, se refiere a la determinación del nivel de procalcitonina (PCT), en una muestra, derivada de un fluido corporal de sujeto, en donde, el fluido corporal en cuestión, consiste en sangre, en suero o en plasma.

Antecedentes y trasfondo de la invención

La procalcitonina (PCT), es conocida, como un biomarcador, el cual refleja la presencia y la gravedad de infecciones bacterianas sistémicas, es decir, la sepsis (Assicot et al., Lancet 1993; 341: 515 - 8; Muller et al., Crit Care Med 2000; 28 : 977 - 83.; Harbarth et al., Am J Respir Crit Care Med 2001; 164: 396 - 402; Becker et al., Crit Care Med 2008; 36:941 - 52; Becker et al., J Clin Endocrinol Metab 2004; 89 :1512 - 25; Nobre et al., Am J Respir Crit Care Med 2008; 177: 498 - 505; Christ - Crain et al., Lancet 2004; 363: 600 - 7; Stolz et al., Chest 2007;131: 9 - 19; Christ - Crain et al., Am J Respir Crit Care Med 2006;174 : 84 - 93; Briel et al., Arch Intern Med 2008; 168: 2000 - 7; discusión 7 - 8).

Durante las infecciones bacterianas, las concentraciones de la PCT en plasma, se encuentran, de una forma típica, a un nivel por encima de los 0,25 ng / ml. En un tiempo más reciente, y mediante la utilización de tecnologías que permiten una mayor sensibilidad de los ensayos, se ha encontrado el hecho de que, en diversas infecciones de una índole no grave, las concentraciones de la PCT, pueden elevarse a los rangos de concentración superiores, o incluso por encima de éstos, pero, no obstante, por debajo de la concentración la cual se ha conocido que se encuentra asociada con las infecciones bacterianas las cuales requieren un tratamiento antibacteriano. De una forma adicional, se ha encontrado que, estas concentraciones de la PCT, se encentran asociadas con una prognosis no favorable, para estos pacientes.

Estas enfermedades, incluyen a la enfermedad de las arterias coronarias, y a los síndromes coronarios. Existen únicamente dos publicaciones, las cuales describen las concentraciones cuantitativas de la PCT, en individuos sanos (véase, a dicho efecto, (Morgenthaler et al., Clin Chem 2002, 48: 788 - 790; Morgenthaler et al., Clin Lab 2002, 48: 263 - 270). Sin embargo, no obstante, se desconoce el hecho de si, unas concentraciones relativamente elevadas de la PCT, en individuos sanos, pueden encontrarse relacionadas con la aparición o futuros eventos adversos. La posibilidad de predecir los eventos adversos futuros, para los individuos los cuales se encuentran aparentemente sanos, al presentarse, es importante, puesto que, el reconocimiento temprano de riesgo, es un requisito previo para proceder a tomar medidas, las cuales puedan ayudar en la prevención o evitación de desarrollar eventos adversos.

Así, de este modo, es un objeto de la presente invención, el establecer un vínculo de unión entre los niveles de la PCT en la población aparentemente sana (asintomática), y la prognosis de los eventos adversos.

Resumen de la invención

La presente invención, se basa en el sorprendente descubrimiento consistente en el hecho de que, los niveles de la PCT, en las muestras procedentes de sujetos asintomáticos, los cuales, posteriormente, han sufrido de un evento adverso, se encuentran incrementados, con relación a los niveles de la PCT, en las muestras procedentes de sujetos asintomáticos, los cuales no sufrirán de un evento adverso, de una forma estadísticamente relevante.

La presente invención, se refiere a un procedimiento in vitro, en concordancia con la reivindicación 1, de este documento de solicitud de patente, para la prognosis de un sujeto asintomático, en cuanto al hecho de que, éste, experimente un evento adverso. El procedimiento en cuestión, comprende: En primer lugar, se proceder a determinar el nivel de procalcitanina (PCT) o de fragmentos de ésta, en una muestra procedente de un sujeto. En segundo lugar, se proceder a correlacionar el nivel de procalcitonina, o fragmentos de ésta, con el riesgo de que un sujeto sufra de un evento adverso.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, se refiere a un procedimiento, en concordancia con la reivindicación 1, de este documento de solicitud de patente, para determinar el riesgo de que, un sujeto aparentemente sano, sufra de un evento adverso, o para determinar la presencia o la ausencia de un riesgo incrementado, de un sujeto aparentemente sano, en cuanto al hecho de que éste sufra de un evento adverso, en el futuro. Así, de este modo, se procede a determinar el riesgo de que acontezcan eventos adversos, para el sujeto en cuestión, durante un período de tiempo comprendido dentro de unos márgenes que van desde los aproximadamente 6 meses, hasta los aproximadamente 10 años. El

procedimiento en cuestión, comprende las siguientes etapas: Se procede a la obtención de una muestra, procedente del sujeto en cuestión. En segundo lugar, se proceder a determinar el nivel de procalcitonina (PCT) o de un fragmento de ésta, en la muestra en cuestión. En tercer lugar, se procede a determinar el riesgo de un sujeto, en cuanto al hecho de que éste experimente un evento adverso, en base al nivel de la PCT, o bien, se procede a determinar el riesgo en cuanto al hecho consistente en que, el sujeto tenga un riesgo incrementado de sufrir de un evento adverso, en base al citado nivel de PCT.

El término “riesgo”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a la probabilidad, para un sujeto, de que éste sufra, en el futuro, de un determinado evento adverso.

“Sujeto”, tal y como este término se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a un ser humano, o a un organismo no humano. De una forma adicional, se prefiere el hecho de que, el sujeto en cuestión, se encuentre exento de infracciones bacterianas (sintomáticas), en el momento en el cual se ha procedido a la obtención de la muestra del sujeto, procedente del sujeto en cuestión. Esta acción, asegura el hecho consistente en que, los niveles de la PCT, no se encuentren incrementados, por encima del rango normal, en el sujeto en cuestión.

Así, por lo tanto, el sujeto en cuestión, se somete a test de ensayo, en cuanto a lo referente a las infecciones bacterianas, previamente a llevar a cabo el procedimiento de la presente invención.

El sujeto “aparentemente sano”, tal y como se entiende en este documento de solicitud de patente, se encontrará así mismo, también, exento de cualesquiera tipo de enfermedades no infecciosas, es decir que, el sujeto en cuestión, no muestre ningún tipo de síntomas, los cuales podrían permitir una diagnosis de una enfermedad no infecciosa. El término “enfermedad no infecciosa”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a enfermedades tales como la hipertensión, las enfermedades ortopédicas, tales como la osteoporosis, y las enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer. Se conoce el hecho de que, la concentración de la PCT, se encuentra incrementada en los neonatos, debido al trauma post-natal. Así, por lo tanto, los neonatos, se encuentran excluidos de las reivindicaciones. Los neonatos, en concordancia con las definiciones de las presentes invenciones, son de una forma preferible, los niños recién nacidos con una edad comprendida dentro de unos márgenes los cuales van desde 1 día, hasta los 10 días, siendo dicha edad, de una forma preferible, de 3 días. Es también conocido el hecho de que, las concentraciones de la PCT, se encuentran incrementadas, en los pacientes, después de una intervención quirúrgica, tal como, por ejemplo, después de un trasplante de órganos, tal como el consistente en un trasplante de corazón, en un trasplante de pulmón, en un trasplante de riñón, en una cirugía cardíaca. Así, de este modo, los pacientes, después de una intervención quirúrgica, tal como, por ejemplo, después de un trasplante de órganos, tal como el consistente en un trasplante de corazón, en un trasplante de pulmón, en un trasplante de riñón, en una cirugía cardíaca, se encuentran excluidos del grupo de personas sanas, si la cirugía se ha llevado a cabo dentro de los últimos siete días, excluyéndose, de una forma preferible, los pacientes post-quirúrgicos, en los cuales, la intervención quirúrgica, se ha llevado a cabo dentro de los últimos catorce días. En otra forma de presentación, en concordancia con la presente invención, se encuentran excluidos los pacientes postquirúrgicos, los cuales hayan sufrido una intervención quirúrgica, en los últimos dos meses. De una forma preferencial, se encuentran excluidos los pacientes y las personas postraumáticas, los cuales hayan sufrido el trauma en cuestión, dentro de los últimos 14 días, de una forma preferible, dentro de los últimos 7 días.

El término “muestra”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a un fluido corporal, el cual se ha obtenido para los propósitos de una diagnosis, de una prognosis, o de una evaluación, de un sujeto de interés, tal como el consistente en un paciente. La muestra en cuestión, se selecciona de entre la sangre, el suero, o y el plasma. De una forma adicional, una persona experta en el arte especializado de la técnica, se dará cuenta del hecho consistente en que, algunas muestras de ensayo, se analizarán de una forma más sencilla, rápida y sencilla, siguiendo un procedimiento de fraccionamiento o purificación, tal como, por ejemplo, una separación de del sangre entera, convirtiéndola en componentes de suero o plasma.

Así, de este modo, en concordancia con la presente invención, la muestra, se selecciona de entre el grupo consistente en una muestra de sangre, en una muestra de suero, o en una muestra de plasma, o en un extracto de cualesquiera de las anteriormente mencionadas muestras. De una forma preferible, la muestra en cuestión, se trata de una muestra de sangre, tratándose ésta, de una forma mayormente preferible, de una muestra de suero o de una muestra de plasma.

En la presente invención, el término “prognosis”, significa una predicción de cómo, es decir, de qué forma, progresará la condición médica de un sujeto (tal como por ejemplo, de un paciente). Esta acción, puede incluir una estimación de la posibilidad de que le acontezca un evento adverso, al paciente en cuestión.

Un “evento adverso”, o un resultado adverso, tal y como éste se utiliza en la presente invención, se definirá como un evento o un resultado, el cual comprometa la salud de un individuo. En concordancia con la presente invención, un evento adverso, se selecciona de entre el grupo que comprende a un evento cardíaco, a un evento cardiovascular, a un evento cerebrovascular, a un cáncer, a la diabetes, y la muerte, debido a la totalidad de las causas. Un evento adverso, no significa un evento agudo inducido por un factor exógeno y / o un trauma inducido por un factor

exógeno. El trauma inducido por un factor exógeno, incluye a aquéllos los cuales pueden estar provocados por accidentes, tales como, por ejemplo, los consistentes en los accidentes de coche. Los traumas inducidos por factores exógenos, se excluyen, por lo tanto, del grupo de los factores adversos.

Un evento cardíaco, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se define como la suma de los siguientes eventos: el infarto agudo de miocardio (Código de ICD = 410) - [ICD = Clasificación Internacional de las Enfermedades – (de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a International Classification of Diseases) -] , la cardiopatía isquémica (Código de ICD = 411), y los siguientes procedimientos: injerto de revascularización coronaria o angiopatía coronaria transluminal percutánea.

Un evento cerebrovascular, tal y como éste se define aquí, en este documento de solicitud de patente, es la suma de cualesquiera de los siguientes eventos: oclusión o estenosis de las arterias precerebrales (código de ICD = 433) o de las arterias cerebrales (código de ICD = 434).

La mortalidad vascular, se ha definido como la muerte, debida a un evento cardíaco o a un evento cerebrovascular. Los eventos cardiovasculares totales, se han definido como siendo la suma de los eventos cardíacos, de los eventos cerebrovasculares y de la mortalidad cardiovascular.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, en el contexto de las proteínas o péptidos, el término “fragmento”, se refiere a proteínas o péptidos más pequeños, los cuales son susceptibles de poderse de proteínas o péptidos más pequeños, los cuales, por consiguiente, comprenden una secuencia de las proteínas o péptidos más grandes. Tales tipos de fragmentos, son susceptibles de poderse derivar de proteínas o péptidos más grandes, mediante la soponificación de uno o más de los enlaces de péptidos.

La procalcitonina, en el contexto de la presente invención, se refiere, de una forma preferible, a un péptido, el cual abarca a los residuos de aminoácidos 1 - 116, 2 - 115, ó 3 - 116, ó a fragmentos de éstos. Así, de este modo, la longitud de los fragmentos de procalcitonina, deberían tener por lo menos 12 ó 15 aminoácidos, teniendo éstos, de una forma preferible, más de 50 aminoácidos, y de una forma más preferible, más de 100 ó de 110 aminoácidos.

La PCT, puede comprender modificaciones post-traduccionales, tales como las consistentes en la glicosilación, en la liposidación, o en derivatización. La PCT, en sí misma, es un precursor de la calcitonina y de la catacalcina. La secuencia de aminoácidos de la PCT 1 – 116, se proporciona en la SEQ ID NO. 1.

El término “nivel”, en el contexto de la presente invención, se refiere a la concentración (de una forma preferible, a la concentración expresada en peso / volumen – p / v) de la PCT (o de un fragmento / precursor de ésta), en una muestra, la cual se ha tomado de un sujeto.

La determinación (o la medición, o la detección) del nivel de la PCT, o de un fragmento, o de un precursor de ésta, o de un fragmento de dicho precursor de ésta, se lleva a cabo mediante la utilización de un procedimiento de detección y / o de un ensayo de diagnóstico, de la forma la cual se explica abajo, a continuación, en la parte que sigue de este documento de solicitud de patente.

Tal y como se menciona aquí, en este documento de solicitud de patente, un “ensayo”, o un “ensayo de diagnóstico”, puede ser de cualquiera de los tipos los cuales se aplican en sector de los diagnósticos. Tal tipo de ensayo, puede estar basado en la unión de un analito a ser detectado, a una o más sondas de captura, con una determinada afinidad. En cuanto a lo concerniente a la interacción entre las moléculas de captura y las moléculas de interés, la afinidad constante, de una forma preferible, es mayor de un valor de 10^8 M^{-1}.

En el contexto de la presente invención, las “moléculas de captura”, son moléculas la cuales pueden utilizarse para unirse a las moléculas diana, o a las moléculas de interés, a saber, los analitos (es decir, en el contexto de la presente invención el péptido cardiovascular o los péptidos cardiovaculares), procedentes de una muestra. Las moléculas de captura, deben entonces conformarse o modelarse de una forma adecuada, de ambas formas, espacialmente, y en términos de los rasgos distintivos o las características superficiales, tales como los consistentes en la carga superficial, en la hidrofobicidad, en la hidrofilicidad, en la presencia o la ausencia de los donantes y / o aceptores de Lewis, para unirse o enlazarse, de una forma específica, a las moléculas de interés. En virtud de lo anteriormente expuesto, el enlace o unión, puede estar mediatizado, por ejemplo, mediante interacciones de enlaces iónicos, de van – der – Waals, de pi – pi, de sigma – pi, hidrofóbicos o de hidrógeno, o una combinación de dos o más de las anteriormente mencionadas interacciones, entre las moléculas de captura y las moléculas diana, o las moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, las moléculas de captura, se seleccionan, de una forma preferible, de entre el grupo que comprende a una molécula de ácido nucleico, a una molécula de hidrato de carbono, o una molécula de RNA, a una proteína, a un anticuerpo, o a una glicoproteína. De una forma preferible, las moléculas de captura, son anticuerpos, incluyendo a los fragmentos de éstos, con una suficiente afinidad a la molécula diana o la molécula de interés, y éstas incluyen a los anticuerpos recombinantes, o los fragmentos de los anticuerpos recombinantes, así como también a los derivados químicamente y / o bioquímicamente modificados, de dichos anticuerpos o fragmentos de una cadena variante, con una longitud de por le menos 12 aminoácidos de ésta.

Los procedimientos preferidos de detección, comprenden a los inmunoensayos de varios formatos, tales como, por ejemplo, los consistentes en los radioinmunoensayos (RIA – [de sus siglas en idioma inglés), en los inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, en los inmunoensayos unidos a enzimas (ELISA), en las series de perlas basadas en la tecnología Luminex, en los ensayos de microseries de proteínas, y en formatos rápidos de tests de ensayo.

La determinación del nivel de PCT, se lleva a cabo, de una forma preferible, mediante la utilización de un anticuerpo (policlonal o, de una forma preferible, monoclonal), de una forma particular, mediante la utilización de un anticuerpo, el cual se una, una forma específica, a la porción de catacalcina de la PCT, o a la porción de calcitonina de la PCT.

Los ensayos, pueden consistir en ensayos homogéneos, o en ensayos heterogéneos, y ensayos competitivos y ensayos no competitivos. En una forma particular de presentación, en concordancia con la presente invención, el ensayo, se trata de un ensayo en la forma de un ensayo sándwich, el cual es un inmunoensayo no competitivo, en donde, la molécula a ser detectada y / o cuantificada, se encuentra unida a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo, puede encontrarse unido a una fase sólida, tal como, por ejemplo, la consistente en una perla, en una superficie de un pozo u otro recipiente, en una astilla, o en una cinta, y el segundo anticuerpo, es un anticuerpo, el cual se encuentra marcado, por ejemplo, mediante una tintura o colorante, mediante un radioisótopo, o mediante una porción reactiva o catalíticamente activa. La cantidad de anticuerpo marcado, unido al analito, se mide, entonces, mediante un procedimiento apropiado. La composición y los procedimientos involucrados con “ensayos del tipo sándwich”, se encuentran bien establecidos y éstos se conocen bien, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. (Véase, a dicho efecto, Immunoassay Handbook, - Manual de los inmunoensayos -, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª Edición (Mayo del 2005), ISBN - 13: 978 - 0080445267; Hultschig C et al., Curr Opin Chem Biol. 2006 Feb; 10 (1): 4 - 10. PMID: 16376134.)

En una forma particularmente preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, el ensayo, comprende dos moléculas de captura, de una forma preferible, anticuerpos, los cuales se encuentran ambos presentes, como dispersiones, en una mezcla de reacción, en forma líquida, en donde, un primer componente de marcaje, se encuentra unido a la primera molécula de captura, en donde, el citado primer componente de marcaje en cuestión, es parte de un sistema de marcaje, basado en una extinción por fluorescencia o por quimioluminiscencia, o amplificación, y un segundo componente de marcaje, del citado sistema de marcaje, se encuentra unido a la segunda molécula de captura, de tal forma que, después de la unión de ambas moléculas de captura, al analito, se genera un señal susceptible de ser medida, la cual permite la detección de los complejos sándwich formados, en la solución la cual comprende la muestra.

De una forma incluso más preferida, en concordancia con la presente invención, el citado sistema de marcaje, comprende criptatos de tierras raras, o quelatos de tierras raras, en combinación con una tintura o colorante fluorescente o una tintura o colorante quimioluminiscente, de una forma particular, una tintura o colorante del tipo consistente en la cianina.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia, comprenden el uso de tinturas o colorantes, las cuales pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que comprende a los FAM (5-or 6-carboxifluoresceína in), VIC, NED, Fluoresceína, Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), IRD – 700 / 800, tinturas o colorantes de Cianina, tales como los consistentes en los CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, el Xanteno, la 6-Carboxi-2’,4’,7’,4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, la Carboxi-4’,5’-dicloro-2’,7’-dimetodifluoresceína (JOE), la N,N,N’,N’-Tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), la 6-Carboxi-X-rodamina (ROX), la 5-Carboxirodamina-6G (R6G5), la 6-carboxirodamina-6G (RG6), la Rodamina, el Verde de Rodamina, el Rojo de Rodamina, la Rodamina 110, las tinturas o colorantes de BODIPY, tales como los consistentes en los BODIPY TMR, el Verde de Oregón, las cumarinas, tales como la consistente en la Umbeliferona, las Benzimides, tales como la Hoechst 33258; la fenantridinas, tales como el Rojo de Texas, el Amarillo de Yakima, el Flúor Alexar, PET, el bromuro de etidio, las tinturas o colorantes de acridinio, las tinturas o colorantes de Carbazol, las tinturas o colorantes de Fenoxazina, las tinturas o colorantes de Porfirina, las tinturas o colorantes de Polimetina, y por el estilo. En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en quimioluminiscencia, comprenden el uso de tinturas o colorantes, basados en los principios los cuales se describen por parte de Kirk-Othmer, en Encyclopedia of chemical technology, - La enciplopedia de la tecnología química -, 4ª Edición, Editor Ejecutivo, J. I. Kroschwitz; Editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, volumen 15, páginas 518 - 562, incluyendo a las citas de las páginas 551 - 562. Las tinturas o colorantes preferidos, son los ésteres de acridinio.

En el procedimiento de la presente invención, pueden aplicarse diversas formas de determinación de un riesgo incrementado de que, un sujeto aparentemente sano, sufra de un evento adverso. El procedimiento en cuestión, puede involucrar la comparación del nivel de PCT, en el sujeto en cuestión, con un valor predeterminado para la PCT, en una población comparable. Este valor, puede ser el consistente en un valor de corte, tal como por ejemplo, el valor de la mediana, o el valor medio, de un percentil correspondiente a un valor de 75, de 90, de 95 ó de 99, de una población. De una forma alternativa, puede utilizarse un rango, en donde, por ejemplo, la población sometida a test de ensayo, se divida de una forma igual o de una forma desigual, en grupos (tal como, por ejemplo, un grupo de

bajo riesgo, un grupo de riesgo medio, o un grupo de alto riesgo), o en cuartiles, correspondiendo, el cuartil más bajo, a los individuos con el riesgo más bajo, y correspondiendo, el cuartil más alto, a los individuos con el riesgo más alto.

El valor predeterminado, puede variar, entre las poblaciones particulares seleccionadas, en dependencia de determinados factores, tales como los consistentes en la edad, en la genética, en los hábitos, en la etnicidad, o por el estilo.

De una forma preferible, la determinación del riesgo, se realiza mediante la utilización de las siguientes alternativas:

- comparar el nivel determinado de la PCT ó del fragmento de la PCT, con la mediana del nivel de la PCT o de los fragmentos de ésta, en un conjunto de muestras predeterminadas, procedentes de una población de sujetos aparentemente sanos, o

- comparar el nivel determinado de la PCT ó del fragmento de la PCT, con un cuantil del nivel de la PCT, o de los fragmentos de ésta, en un conjunto de muestras predeterminadas, procedentes de una población de sujetos aparentemente sanos, o

- realizar cálculos, basados en un análisis de riesgo proporcional, basado en el modelo de Cox, o basados en cálculos del índice de riesgo, tal como los consistente en el Índice de Reclasificación Neta (NRI, - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Net Reclassification Index] -), o en el Índice de Discriminación Integrado (IDI – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes de Integrated Discrimination Index] -).

En otra forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la razón de momios o probabilidades, o el cociente de riesgos, son los que se utilizan para medir un test de ensayo de capacidad para medir el resigo o diagnosis de una enfermedad.

En el caso de la razón de momios o de probabilidades, un valor de 1, indica el hecho de que, un resultado positivo, es igualmente probable, entre sujetos, en vamos grupos, los grupos de “enfermos”, y los grupos de “control”; un valor mayor de 1, indica el hecho de que, un resultado positivo, es más probable, en el grupo de enfermos; y un valor de menos de 1, indica el hecho de que, un resultado positivo, es más probable, en el grupo de control. En determinadas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, los marcadores y / o los paneles de marcadores, se seleccionan, de una forma preferible, para exhibir una razón de momios o probabilidades, de por lo menos aprox. 1,5, ó más, o aproximadamente 0,75 ó menos, siendo, ésta, de una forma más preferible, de por lo menos aprox. 2, ó más, o aprox. 0,5 ó menos, de una forma todavía más preferible, de por lo menos aprox. 3, ó más o aprox. 033, ó menos, de una forma aún todavía más preferible, de por lo menos aprox. 4, ó más o aprox. 0,25, ó menos, de una forma aún todavía más preferible, de por lo menos aprox. 5, ó más, o aprox. 0,2, ó menos, y de la forma mayormente preferible, de por lo menos aprox. 10, ó más o aprox. 0,1, ó menos. El término “aproximadamente” (o “aprox.”), en este contexto, se refiere a + / - 5 %, de una medición dada.

En el caso de una razón o cociente de riesgo, un valor de 1, indica el hecho de que, el riesgo relativo de un punto final (tal como, por ejemplo, un punto final, consistente en la muerte), es igual en ambos grupos, el grupo de “enfermos”, y el grupo de “control”; un valor mayor de 1, indica el hecho de que, el riesgo, es mayor en el grupo de enfermos; y un valor de menos de 1, indica el hecho de que, el riesgo, es mayor en el grupo de control. En determinadas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, los marcadores y / o los paneles de marcadores, se seleccionan, de una forma preferible, para exhibir una razón de momios o de probabilidades, de por lo menos aprox. 1,1, ó más, o aproximadamente 0,91 ó menos, siendo, ésta, de una forma más preferible, de por lo menos aprox. 1,25 ó más, o aprox. 0,8 ó menos, de una forma más preferible, de por lo menos aprox. 1,5, ó más o aprox. 0,67, ó menos, de una forma todavía más preferible, de por lo menos aprox. 2, ó más o aprox. 0,5, ó menos, y de la forma mayormente preferible, de por lo menos aprox. 2,5, ó más o aprox. 0,4, ó menos. El término “aproximadamente” (o “aprox.”), en este contexto, se refiere a + / - 5 %, de una medición dada.

Tal y como puede verse, por ejemplo, así mismo, también, en la tabla 6, los presentes inventores, fueron capaces de establecer unos valores de corte, para los niveles de la PCT, los cuales son indicativos, para los sujetos, de que éstos sufran de un determinado evento adverso, en el futuro. De una forma general, un sujeto, puede determinarse como encontrándose en riesgo de sufrir de un evento adverso, cuando el nivel de PCT, en una muestra de suero, es de por lo menos 0,015 ng / ml con respecto al suero, siendo dicho nivel, de una forma preferible, de por lo menos 0,02 ng / ml.

De una forma específica, se determina que el sujeto se encuentra en un riesgo incrementado de sufrir de un evento cardíaco, o de un evento cardiovascular, cuando, el citado nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de por lo menos 0,0155 ng / ml, con respecto al suero. El sujeto, se determina como encontrándose en un riesgo incrementado de sufrir un evento cardiovascular, o en riesgo de muerte, debido a causas cardiovasculares, cuando el determinado nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de por lo menos 0,0215 ng / ml. El sujeto, se determina como encontrándose en un riesgo incrementado de morir de cáncer, cuando el citado nivel de la PCT, en una

muestra de suero, es de por lo menos 0,0155 ng / ml. El sujeto, se determina como encontrándose en un riesgo incrementado de morir de cáncer, cuando el citado nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de por lo menos 0,0155 ng / ml. El sujeto, se determina como encontrándose en un riesgo incrementado de morir, cuando el determinado nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de por lo menos 0,0205 ng / ml, y se determina como encontrándose en riesgo de sufrir de diabetes, cuando el nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de por lo menos 0,0185 ng / ml.

Se prefiere el hecho de que, en el procedimiento de la presente invención, se determine por lo menos un parámetro adicional y que éste se utilice, para determinar el riesgo, o el riesgo incrementado, de sufrir de un evento adverso. Tal tipo de parámetro adicional, puede ser en consistente en un parámetro clínico, en un parámetro de laboratorio (tal como, por ejemplo, el consistente en un parámetro bioquímico) y / o un parámetro genérico.

Los niveles umbrales para la estratificación de los sujetos, en diferentes grupos (categorías), pueden ejecutarse, por ejemplo, procediendo a agrupar una población de pacientes de referencia, en concordancia con su nivel de PCT, en determinados cuantiles, tal como, por ejemplo, cuantiles consistentes en tertiles, en cuartiles, en quintiles, o incuso en concordancia con percentiles apropiados. Para cada uno de los cuantiles o grupos por encima y por debajo de determinados percentiles, las razones de momios o de probabilidades, pueden calcularse comparando el riesgo, para por ejemplo un resultado adverso, a saber, un “efecto desfavorable” o un riesgo incrementado, tal como, por ejemplo, en términos de tasa de supervivencia. En un escenario de este tipo, una razón de momios o de probabilidades, (HR – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a hazard ratio] -), por encima de un valor de 1, indica un riesgo menor. Una HR (razón de momios o de probabilidades) de aprox. 1 (tal como, por ejemplo, de + / - 0,1), indica el hecho de que no existe un riesgo elevado para el grupo particular de pacientes. Mediante la comparación de una HR situada entre ciertos cuantiles de pacientes, los unos con los otros, y con la HR de la población total de pacientes, es posible el identificar a aquéllos cuantiles de pacientes, los cuales tienen un riesgo elevado y un riesgo incrementado, y así, de este modo, estratificar a los sujetos, en concordancia con la presente invención.

La sensibilidad y la especificidad de un test de ensayo de diagnóstico y / o de prognosis, depende de más de únicamente la “calidad” analítica del test de ensayo, dependiendo éstas, así mismo, también, de la definición de en qué constituye un resultado anormal. En la práctica, las curvas características operativas del receptor (curvas ROC – [ROC, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Operating Characteristic curves] -), se calculan, de una forma típica, procediendo a esquematizar, gráficamente, el valor de una variable, con respecto a su frecuencia relativa, en poblaciones “normales” (es decir, en poblaciones de pacientes aparentemente sanas), y en poblaciones “enfermas” (es decir, en poblaciones de sujetos los cuales están sufriendo de infecciones bacterianas). Para cualquier tipo de marcador en particular, una distribución de niveles de marcadores, para sujetos con una enfermedad, o para sujetos sin una enfermedad, probablemente, se solapará. Bajo unas condiciones de este tipo, un test de ensayo, no distingue, en absoluto, a los pacientes normales, con respecto a los pacientes enfermos, o a los pacientes los cuales se encuentran con un riesgo incrementado con respecto a aquéllos que no tienen un riesgo incrementado, con un porcentaje del 100 % de exactitud, y así, de este modo, el área de solapamiento, indica allí en donde, el test de ensayo, no puede distinguir una población normal, con respecto a una población enferma; los que tienen un riesgo incrementado, con respecto a aquéllos que no lo tienen. Se selecciona un valor de umbral (o valor de límite), por encima del cual (o por debajo del cual, en dependencia de, de qué forma, un marcador cambia, con la enfermedad), el test de ensayo, se considera como siendo anormal, o por debajo del cual, el test de ensayo, se considera como siendo normal. El área la cual se encuentra bajo la curva ROC (curva característica operativa del receptor), representa una medida de la probabilidad de que, una medición percibida, permita una identificación o condición correcta. Las curvas ROC, pueden utilizarse incluso cuando, los resultados del test de ensayo, no proporcionan necesariamente un número preciso o exacto. Siempre y cuando sea posible el proceder a clasificar los resultados, se puede crear una curva ROC. Así, por ejemplo, los resultado de un test de ensayo, en muestras de “enfermedad”, las muestras pueden clasificarse en concordancia con el grado (tal como, por ejemplo, 1 = reducido o bajo, 2 = normal, y 3 = alto). Esta clasificación, puede correlacionarse con los resultados de la población “normal”, y la curva ROC, creada. Estos procedimientos, son bien conocidos, en el arte especializado de la técnica (véase, a dicho efecto, Handley et al., 1982, Radiology, - Radiología -, 143: 29 – 36). De una forma preferible, se selecciona un valor de umbral o valor límite, para proporciona un área de la curva ROC, la cual sea superior a aproximadamente 0,5, siendo ésta, de una forma más preferible, mayor de aprox. 0,7, de una forma todavía más preferible, de aprox. 0,8, de una forma incluso todavía más preferible, mayor de aprox. 0,85, y de la forma mayormente preferible, mayor de aprox. 0,9. El término “aproximadamente” (o “aprox.”), en este contexto, se refiere a + / - 5 %, de una medición dada.

El eje horizontal de una curva ROC, representa (1 – especificidad), el cual se incrementa, con la tasa de falsos positivos. El eje vertical de la curva, representa la sensibilidad, la cual se incrementa, con la tasa de positivos ciertos o verdaderos. Así, de este modo, para un valor de corte seleccionado, el valor de (1 - especificidad), puede determinarse, y puede obtenerse un valor correspondiente de sensibilidad. El área bajo la curva ROC, es una medida de la probabilidad de que, el nivel del marcador medido, permitirá una correcta identificación de una enfermedad o condición. Así, de este modo, la curva ROC, puede usarse para determinar la efectividad del test de ensayo.

La razón de momios o de probabilidades, es una medida del tamaño del efecto, el cual describe la fuerza de asociación o no independencia entre dos valores de datos binarios (tal como, por ejemplo, el factor de relación o razón de probabilidades de que acontezca un evento, en un grupo negativo en un test de ensayo, con respecto a las probabilidades de que éste acontezca, en el grupo positivo del test de ensayo).

El valor predictivo positivo (PPV – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a positve predictive value] -), o tasa de precisión, es la proporción de los pacientes con resultados positivos del test de ensayo, los cuales se encuentran correctamente diagnosticados y / o pronosticados. Éste refleja la probabilidad de que, un test de ensayo positivo, refleje la condición subyacente para la cual se esté realizando el test de ensayo en cuestión. El valor predictivo o pronosticado negativo (NPV – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a negative predictive value] -), es la proporción de pacientes, con unos resultados de test de ensayo negativos, los cuales se encuentran correctamente diagnosticados y / o pronosticados. La precisión o exactitud total, es el porcentaje de la totalidad de pacientes correctamente clasificados mediante el test de ensayo en cuestión.

De una forma específica, puede seleccionarse por lo menos un parámetro clínico, de entre el grupo consistente en el género (es decir, entre el género masculino, o el género femenino), en la edad, en la presión sanguínea sistólica, en la presión sanguínea sistólica, en la presión sanguínea diastólica, en el índice de masa corporal, en el perímetro de la cintura, en el factor de relación o cociente cintura – cadera, y en el hábito de fumar.

De una forma particular, debido al hecho de que, los niveles de la PCT, son significativamente diferentes, entre los hombres, y las mujeres (véase, a dicho efecto, por ejemplo, la Tabla 2), el género de un sujeto, es un parámetro, el cual debe ser tomado en consideración, cuando se procede a realizar el procedimiento de la invención.

El por lo menos un parámetro de laboratorio, puede seleccionarse de entre el grupo consistente en la concentración de la glucosa en la sangre o en el plasma, en ayunas, en los triglicéridos, en la concentración del colesterol, en la concentración del colesterol HDL y de las subfracciones de éste, en la concentración del colesterol LDL y las subfracciones de éste, en la cisteína C, en la insulina, en la CRP, en los péptidos natriuréticos del tipo A y del tipo B, así como, también, en los precursores y en los fragmentos de éstos, incluyendo a las ANP, proANP, NT-proANP, MR-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP, GDF15, ST2, la procalcitonina y fragmentos de ésta, la pro-adrenomedulina y fragmentos de ésta, incluyendo a las ADM, PAMP, MR-proADM, CT-proADM, pro-Endotelina-1 y fragmentos de ésta, incluyendo a las CT-proET-1, NTproET-1, la big endotelina 1, y la Endotelina-1.

El por lo menos un parámetro genético, se selecciona, de una forma preferible, de entre el grupo consistente en los poliformismos nucleótidos individuales (SNPs – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a single nucleotide polymorphisms] -), y en las mutaciones.

El procedimiento de la presente invención, proporciona información sobre un posible riesgo incrementado, para un sujeto, de que éste sufra de un evento adverso, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba, y aquí, en este documento de solicitud de patente. En base a esta información, pueden tomarse medidas de prevención, con objeto de evitar el hecho de que se produzca un evento adverso, en el sujeto en cuestión. Las medidas de prevención, pueden ser, por ejemplo, las consistentes en tomar una medicina apropiada, en seguir restricciones dietéticas, en hacer ejercicio, en seguir una supervisión médica, y otras.

En un aspecto adicional de la presente invención, ésta se refiere al uso de un procedimiento, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba y aquí, en este documento de solicitud de patente, para determinar un riesgo incrementado, para un sujeto aparentemente sano, de que éste sufra de un evento adverso.

De una forma adicional, la revelación de la presente invención, se refiere al uso de un equipo, a modo de “kit”, el cual comprende uno o más anticuerpos, dirigidos contra la PCT, o un precursor de ésta, o un fragmento de ésta, para la prognosis, de un sujeto asintomático, en cuanto al hecho de que éste experimente un evento adverso, a saber, es decir, para realizar un procedimiento, de la forma la cual se encuentra descrita aquí, en este documento de solicitud de patente.

Ejemplos

Población de estudio y diseño

La población de estudio, se obtuvo de procedencia del estudio de la Prevención de la enfermedad renal y vascular en el estado final (PEVEND – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease] -). El estudio PREVEND, se diseñó para investigar, de una forma prospectiva, el curso natural de la albuminuria, y se relación con la enfermedad renal y cardiovascular, en un amplio cohorte extraído de la población general (de una edad comprendida dentro de unos márgenes situados entre los 28 años de edad y los 75 años de edad), de la ciudad de Groningen, Países Bajos. Los detalles sobre el diseño del estudio, sobre la selección, y sobre los procedimientos, han sido publicados en otros sitios (véase, a dicho efecto, Hillege et al., Circulation 2002, 106:

1777 - 1782; Hillege et al., J Intern Med 2001, 249: 519 - 526; Mahmoodi et al., JAMA 2009, 301: 1790 - 1797). El estudio PREVEND, fue aprobado por parte del comité local de éticas médicas de la Universidad de Medicina consistente en la "University Medical Center" de Groningen, y éste se adecuó a los principios subrayados en la Declaración de Helsinki. La totalidad de los participantes en el estudio, proporcionaron su consentimiento a la información, y su beneplácito, por escrito en cuanto a lo referente a su participación en el estudio.

Mediciones

Los participantes en el estudio, experimentaron dos visitas externas, ambulatorias, con objeto de evaluar los factores demográficos, antropométricos, y de riesgo cardiovascular. Éstos completaron un cuestionario de índole demográfica, sobre su historial en enfermedad cardiovascular (CVD – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Cardiovascular disease] -), sobre los hábitos de fumar, sobre el historial de la familia, en cuanto a lo referente a la CVD, sobre el consumo de alcohol, y sobre la medicación, previamente a la primera visita. Los participantes, fueron investigados, en cuanto a lo referente al nivel de colesterol total, al nivel de HDL colesterol (colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL – [de sus factores, en idioma inglés, correspondientes a high – density liproprotein] -), al nivel de triglicéridos, al nivel de presión sanguínea medido, a la creatinina en suero, y a la diabetes mellitus. La diabetes mellitus, se definió en concordancia con las directrices de la American Diabetes Association (Asociación Americana de la Diabetes), con un valor de la glucosa en plasma, en ayunas, de ≥ 7,0 mmol / l, (≥ 126 mg / dl), o el uso de una medicación antidiabética. De una forma adicional, la información sobre la medicación, se substanció, mediante el uso de los datos sobre dispensación de las farmacias, procedentes de la totalidad de la comunidad de farmacias existentes en la ciudad de Groningen.

Como punto de referencia, la CDV (enfermedad cardiovascular), se definió mediante el historial de eventos cardiovasculares mayores, previos (a saber, infarto de miocardio, accidente cardiovascular), el historial de la angioplastia coronaria y / o cirugía de bypass (de derivación), el índice (de presión) tobillo / brazo, de menos de 0,9, ó la presencia de un modelo QS basado en la clasificación de Minnesota (a saber, códigos 1. y 1.2). Los individuos con CDV, en la presentación, fueron excluidos del estudio. Los individuos con diabetes, en la presentación, fueron excluidos del estudio. Los individuos con diabetes, en la presentación, fueron excluidos del estudio. Los individuos con un nivel de creatinina en suero > 132 µmol / l, se consideraran como teniendo una disfunción renal, y éstos se excluyeron del estudio. El número total de individuos, susceptibles de poder ser elegidos, para el estudio, era de n = 5313. Así, de este modo, la población investigada, en este estudio, era una población representativa, de una población no enferma, representativa de la población sana general.

En el momento de la inclusión, se procedió a extraer una muestra de sangre, de cada uno de los individuos, para llevar a cabo la realización de las mediciones de laboratorio (véase, posteriormente, más abajo, en este documento de solicitud de patente).

La población investigada, se siguió, durante un transcurso de tiempo de diez años, y se procedió a registrar la incidencia de varios puntos finales. Los puntos finales del estudio, se trataban de eventos cerebrovasculares incidentes, de la mortalidad cardiovascular, de los eventos cardiovasculares totales, de la diabetes incidente, de la mortalidad por cáncer, y de la mortalidad total. Un evento cardíaco, se definía como la suma de uno cualquiera de los siguientes eventos: infarto agudo de miocardio (código de ICD, 410), enfermedad cardíaca isquémica, subaguda, (código ICD, 411), y los siguientes procedimientos: injerto de derivación (bypass) de la arteria coronaria, o angioplastia coronaria transluminal, percutánea. Un evento cerebrovascular, se definió como la suma de uno cualquiera de los siguientes eventos: estenosis de las arterias precerebrales (código ICD, 433), ó de las arterias cerebrales (código ICD, 434). La mortalidad cardiovascular, se definió como la suma de eventos cardíacos, de eventos cerebrovasculares, y de mortalidad cardiovascular. La diabetes, se definió en concordancia con las directrices de la American Diabetes Assotiation (Asociación Americana de la Diabetes), como un nivel de glucosa en plasma, correspondiente a un nivel de ≥ 7,0 mm / l, (≥ 126 mg / dl), o el uso de medicación antidiabética. La mortalidad por cáncer, se definió como la muerte, debida a cáncer. La mortalidad, se definió como la muerte, por cualquier causa.

La información (sobre la hospitalización), para la morbilidad cardiovascular, se obtuvo de procedencia de PRISMANT, el registro holandés de diagnosis de altas hospitalarias. Los datos, se codificaron en concordancia con la International Classification of Diseases, (Clasificación Internacional de Enfermedades), 9ª revisión, y la clasificación de intervenciones. En el caso en el que, una persona, se hubiese trasladado a un destino desconocido, entonces, la fecha en la cual la persona se eliminó del registro municipal, se utilizó como una fecha censora. Los datos sobre la mortalidad, se recibieron del registro municipal, y la causas de la muerte, se recibieron del registro municipal, y la causa de la muerte, se obtuvo vinculando el número de certificados de muerte, a las causas primarias de la muerte, o se codificó, mediante el Dutch Central Bureau of Statistics (Oficina Central Holandesa de Estadísticas.

Ensayo de laboratorio

Como punto de referencia, se procedió a extraer muestras de sangre, después de haber estado en ayunas durante el transcurso de toda la noche, y éstas se introdujeron en un tubo enfriado, el cual contenía EDTA. Las muestras en cuestión, éstas se centrifugaron, inmediatamente, a 1500 g y a una temperatura de 4 °C, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos y, los sobrenadantes, se almacenaron en alícuotos, a una temperatura de - 80 °C, para su uso adicional posterior. Se procedió a medir la PCT, des siguiente modo: se llevó a cabo un ensayo sándwich, ultrasensible, para la PCT (BRAHMS PCT LIA sensitive) (Morgenthaler et al., Clin Chem 2002; 48: 788 - 90), en el cual se utiliza un anticuerpo dirigido contra la porción catacalcina de la PCT, como una fase sólida, y un anticuerpo dirigido contra la porción calcitonina de la PCT, como anticuerpo marcado (BRAHMS AG, Henningdorf, Alemania). Se procedió a utilizar la PCT Recombinante, en varias concentraciones, como calibrador. Se utilizó un volumen de muestra de 100 µl.

Análisis estadístico

Las estadísticas descriptivas como punto de referencia de las variables continuas, se reportaron como media ± desviación estándar (SD – [de sus siglas, en idioma inglés] -), y como media con percentiles 25 y 75, cuando se procedía a sesgar la distribución de los datos. Las variables categóricas, se presentaron como números y porcentajes. Se procedió a utilizar un test de ensayo $\chi 2$, para someter a test de ensayo las diferencias entre los grupos, para las categorías variables. Los datos continuos, se compararon mediante la utilización de un test de ensayo de Student, o un test de ensayo de clasificación de Mann – Whitney, si la variable, no se distribuía normalmente, en concordancia con el test de ensayo de kolmogoroy – Smirnov. Para someter a test de ensayo el valor de predicción o pronóstico de la PCT, para la incidencia de eventos, se procedió a filtrar, de una forma separada, modelos de riesgo proporcional, de Cox, con el desarrollo de varios eventos, los cuales se han registrado, como las variables dependientes. Debido al hecho de la existencia de una distribución sesgada, se procedió a aplicar una transformación logarítmica (log 2) de la PCT, en un análisis de regresión de Cox, para computar los factores de relación o cocientes de riesgo (HR), e intervalos de confianza (CIs) por duplicado, de los niveles de la PCT. Unos valores de P, de 0,05 ó menos, procedentes de los tests de ensayo de dos lados (de dos colas), se consideraron como siendo estadísticamente satisfactorios. De una forma adicional, se procedió a calcular los factores de relación o cocientes de riesgo, para los segundo a quinto quintil de la PCT, en comparación con el primer quintil. La totalidad de los análisis estadísticos, se llevaron a cabo vía los paquetes de software informático consistentes en los Statistical Package for Social Sciences version 16, - Pack estadístico para ciencias sociales, versión 16 y (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) y en el software informático S-PLUS (Insightful Corp., Seattle, Washington, USA).

Resultados

Las características de las referencias de base del estudio de la población, se encuentran recopiladas en la Tabla 1.

La Tabla 2, muestra los niveles de las referencias de base de los niveles de la PCT (para la totalidad de los niveles), y los niveles de las referencias de base de los niveles de la PCT (para los niveles correspondientes a unos valores ≤ 0,1 ng / ml), estratificados por géneros).

Los análisis, se llevaron a cabo mediante muestras, las cuales contenían unos niveles de la PCT, correspondientes a un valor ≤ 0,1 ng / ml, y mediante muestras, las cuales contenían unos niveles de la PCT, los cuales eran así mismo, también, mayores de un valor de 0,1 ng / ml. Se encontró así mismo, también, el hecho consistente en que, el valor de pronóstico de la PCT, era esencialmente el mismo, para ambas de estas muestras.

Los niveles de la PCT, eran significativamente diferentes, entre los hombres y las mujeres (véase, a dicho efecto, la Tabla 2), para la totalidad del grupo de estudio (P < 0,001), así como, también, para los sujetos con unos valores de la PCT ≤ 0,1 ng / ml (P < 0,001).

Las tablas 3 y 4, muestran los factores de relación o cocientes de riesgo, los cuales describen un riesgo incrementado para desarrollar un evento, de la forma la cual se encuentra indicada, por duplicación de las concentraciones de la PCT. Así, por ejemplo, un factor de relación o cociente de riesgo correspondiente a un valor de 2,23 para la mortalidad cardiovascular, significa el hecho de que, un individuo, con una concentración de la PCT de, digamos, 0,030 ng / ml, tiene un factor de relación o cociente de riesgo correspondiente a un valor doble, de morir de complicaciones cardiovasculares, que el factor de relación o cociente de riesgo que tiene un individuo el cual tiene una concentración de la PCT, correspondiente a un valor de 0,015 ng / ml.

La Tabla 3, muestra unos factores de relación o cocientes de riesgo (correspondientes a un 95 % CI) (CI = intervalo de confianza – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a confidence interval]-), para la predicción o pronóstico de eventos cardiovasculares, así como también de la mortalidad por cáncer, por evento cardiovascular, y

de muerte total, en el caso de unos niveles de la PCT (todos y ≤ 0,1 ng / ml, respectivamente) en el grupo total de estudio.

La Tabla 4, muestra unos factores de relación o cocientes de riesgo (correspondientes a un 95 % CI), para la predicción o pronóstico de eventos cardiovasculares, así como también de la mortalidad por cáncer, por evento cardiovascular, y de muerte total, en el caso de unos niveles de la PCT (todos y ≤ 0,1 ng / ml, respectivamente), estratificados por géneros.

La Tabla 5, muestra unos factores de relación o cocientes de riesgo (correspondientes a un 95 % CI), para la predicción o pronóstico de desarrollar una Diabetes del tipo 2, en una población asintomática, en el caso de unos niveles de la PCT (todos y ≤ 0,1 ng / ml, respectivamente).

La Tabla 6, muestra los valores de corte y la AUC ROC (Área bajo la curva de características operativas del receptor. Para la realización de este análisis, se excluyó la totalidad de la población investigada, para la cual, los niveles de la PCT eran de un valor > 0,1 ng / mol. Para cada tipo de evento, se procedió a calcular el área bajo la curva de características operativas del receptor (AUC ROC – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Area under the receiver operator characteristics curve] -). Los valores óptimos de corte, se definieron como el producto matemático más alto de la sensibilidad y de la especificidad, los cuales podrían alcanzarse, para cada tipo de evento, cuando se procediera a someter a tests de ensayo, posibles valores de corte. Para aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, está claro el hecho de que podrían considerarse como “óptimos”, otros valores de corte, en dependencia de si, la sensibilidad, la especificidad y el valor positivo de predicción o prognosis, o el valor negativo de predicción o prognosis, son importantes, en la aplicación particular.

La Tabla 7, muestra los eventos adversos, en concordancia con quintiles de la PCT. De entre la totalidad de la población investigada, se excluyeron, del análisis, los valores de la PCT, correspondientes a unos niveles > 0,1 ng / ml. La población, se separó en quintiles de concentración de la PCT. Se muestran, en la tabla, para los varios tipos de eventos, el número de casos y la proporción por quintiles (en porcentaje). El factor de relación o cociente de riesgo, para el desarrollo de cada tipo de evento, se calculó mediante los quintiles Q2 a Q3, mediante la comparación con los quintiles Q1. El análisis para el tipo de evento consistente en la diabetes, se muestra de una forma separada, con respecto a los otros eventos, debido al hecho de que, el número de personas, las cuales no pudieron seguirse para este tipo de evento, era más reducido que el correspondiente para otros tipos de eventos. Los números de individuos por quintil, no son perfectamente iguales, debido al hecho de una alta frecuencia de valores para individuos, a estas concentraciones de la PCT, separando los quintiles, los cuales tuvieron que atribuirse bien ya sea a quintil superior o al quintil inferior, a esta concentración.

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos, muestran el hecho consistente en que, los elevados niveles de la PCT, en sujetos asintomáticos, son de un valor de pronóstico, para la predicción de si, un sujeto, se encuentra en riesgo de sufrir de un evento adverso, en el futuro.

TABLAS

Tabla 1:

Nº de participantes	**5313**
Edad - años	47,3 ± 12
Nº de hombres - (%)	2375 (44,7)
Índice de masa corporal – Kg / m^2	25,8 ± 4,1
Perímetro de la cintura - cm	86,9 ± 12,7
Presión sanguínea sistólica – mm Hg	122,1 ± 18,2
Presión sanguínea diastólica – mm Hg	70,8 ± 9,4
Colesterol –mm / l	5,6 ± 1,1
HDL – colesterol – mmol / l	1,3 ± 0,4

Tabla 2:

Niveles de la PCT (todos) como puntos de referencia, en ng / ml (n = 5313)		
Hombres (n = 2353)	Mujeres (n = 2960)	Valor de P*
0,018 (0,015 – 0,022)	0,014 (0,012– 0,017)	< 0,0001
Niveles de la PCT (≤ 0,1 ng / ml) como puntos de referencia, en ng / ml (n = 5292)		
Hombres (n = 2337)	Mujeres (n = 2955)	Valor de P*
0,018 (0,015 – 0,022)	0,014 (0,012– 0,017)	< 0,0001
*Calculado mediante la utilización de un test de ensayo U de Mann - Whitney		

Tabla 3:

PCT (todos) al nivel del punto de referencia (n = 5313)					
Eventos cardíacos (n = 98)	Eventos cerebrovascuales (n = 61)	Mortalidad cardiovacular (n = 30)	Total de eventos cardiovasculares (n = 172)	Mortalidad por cáncer (n = 91)	Total mortalidad (n = 148)
1,53 (1,26 – 1,87)	1,50 (1,15– 1,96)	1,52 (1,04 – 2,20)	1,52 (1,31 – 1,77)	1,53 (1,24 – 1,89)	1,55 (1,32 – 1,81)
PCT (≤ 0,1 ng / ml) al nivel del punto de referencia (n = 5292)					
Eventos cardíacos (n = 98)	Eventos cerebrovascuales (n = 61)	Mortalidad cardiovacular (n = 30)	Total de eventos cardiovasculares (n = 172)	Mortalidad por cáncer (n = 89)	Total mortalidad (n = 146)
2,33 (1,65 – 3,30)	2,18 (1,40 – 3,40)	2,23 (1,18 – 4,18)	2,78 (1,75 – 2,96)	1,79 (1,20 – 2,65)	2,07 (1,55 – 2,78)

Tabla 4:

PCT (todos) en hombres, al nivel del punto de referencia (n = 2353)					
Eventos cardíacos (n = 46)	Eventos cerebrovascuales (n = 30)	Mortalidad cardiovacular (n = 17)	Total de eventos cardiovasculares (n = 85)	Mortalidad por cáncer (n = 41)	Total mortalidad (n = 73)
1,51 (1,01 – 2,26)	1,41 (0,82 – 2,42)	0,91 (0,33 – 2,46)	1,40 (1,02 – 1,93)	1,95 (1,44 – 2,66)	1,75 (1,34 – 2,29)
PCT (todos) en mujeres, al nivel del punto de referencia (n = 2960)					
Eventos cardíacos (n = 52)	Eventos cerebrovascuales (n = 31)	Mortalidad cardiovacular (n = 13)	Total de eventos cardiovasculares (n = 87)	Mortalidad por cáncer (n = 50)	Total mortalidad (n = 75
1,55 (1,23 – 1,94)	1,53 (1,13 – 2,09)	1,67 (1,17 – 2,37)	1,56 (1,31 – 1,85)	1,28 (0,84 – 1,93)	1,43 (1,12 – 1,83)
PCT (≤ 0,1 ng / ml) en hombres, al nivel del punto de referencia (n = 2337)					
Eventos cardíacos (n = 46)	Eventos cerebrovascuales (n = 30)	Mortalidad cardiovacular (n = 17)	Total de eventos cardiovasculares (n = 85)	Mortalidad por cáncer (n = 40)	Total mortalidad (n = 72)
2,04 (1,18 – 3,50)	1,80 (0,90 – 3,60)	1,20 (1,12 – 1,29)	1,79 (1,18 – 2,71)	2,29 (1,31 – 4,01)	2,08 (1,35 – 3,19)
PCT (≤ 0,1 ng / ml) en mujeres, al nivel del punto de referencia (n = 2960)					
Eventos cardíacos (n = 52)	Eventos cerebrovascuales (n = 31)	Mortalidad cardiovacular (n = 13)	Total de eventos cardiovasculares (n = 87)	Mortalidad por cáncer (n = 49)	Total mortalidad (n = 74
2,93 (1,81– 4,72)	2,67 (1,44 – 4,97)	1,14 (1,07 – 1,21)	2,98 (2,06 – 4,29)	1,54 (0,83 – 2,85)	2,12 (1,36 – 3,30)

Tabla 5:

PCT (todos) al nivel del punto de referencia		
Todos los participantes (123 / 4206)	Hombres (62 / 1870)	Mujeres (61 / 2336)
1,78 (1,44 – 2,20)	1,61 (1,13 – 2,30)	2,18 (1,48 – 3,21)
Niveles de la PCT (≤ 0,1 ng / ml) al nivel del punto de referencia		
Todos los participantes (121 / 4193)	Hombres (60 / 1859)	Mujeres (61 / 2334)
2,11 (1,51 – 2,95)	1,43 (0,84 – 2,44)	3,25 (2,00 – 5,30)

Tabla 6:

Tipo de evento	**Concentración óptima de corte de la PCT (ng / ml)**	**Área bajo la curva de características operativas del receptor (AUC ROC)**
Eventos cardíacos	0,0155	0,634
Eventos cardiovasculares	0,0215	0,628
Mortalidad cardiovascular	0,0215	0,640
Total de eventos cardiovasculares	0,0155	0,635

Continuación Tabla 6

Tipo de evento	**Concentración óptima de corte de la PCT (ng / ml)**	**Área bajo la curva de características operativas del receptor (AUC ROC)**
Mortalidad por cáncer	0,0155	0,585
Total mortalidad	0,0205	0,610
Diabetes	0,0185	0,627

Tabla 7

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	
Nº de sujetos	1045	1069	958	1214	1006	
Rango de procal-citonina (ng / ml)	0,007 – 0,012	0,013 – 0,014	0,015 – 0,016	0,017 – 0,020	0,021 – 0,098	
Total mortalidad						
Nº de casos (%)	12 (1,1)	28 (2,6)	23 (2,4)	34 (2,8)	49 (4,9)	<0,001
Razón de riesgo (95 % CI)	1,0	2,32 (1,18 – 4,57)	2,12 (1,06 – 4,27)	2,47 (1,28 – 4,78)	4,35 (2,32 – 8,19)	
Total mortalidad cardiovascular						
Nº de casos (%)	1 (0,1)	5 (0,5)	7 (0,7)	6 (0,5)	11 (1,1)	<0,007
Razón de riesgo (95 % CI)	1,0	4,98 (0,58 – 42,62)	7,76 (0,95 – 63,11)	5,25 (0,63 – 43,58)	11,75 (1,52 – 91,04)	
Mortalidad por cáncer						
Nº de casos (%)	11 (1,1)	15 (1,4)	14 (1,5)	23 (1,9)	26 (2,6)	<0,004
Razón de riesgo (95 % CI)	1,0	1,36 (0,62 – 2,96)	1,41 (0,64 – 3,11)	1,83 (0,89 – 3,75)	2,52 (1,25 – 5,11)	
Eventos cardíacos						
Nº de casos (%)	8 (0,8)	12 (1,1)	20 (2,1)	24 (2,0)	34 (3,4)	<0,001
Razón de riesgo (95 % CI)	1,0	1,50 (0,61 – 3,68)	2,79 (1,23 – 6,34)	2,65 (1,19 – 5,90)	4,60 (2,13 – 9,93)	
Eventos cerebrovasculare s						
Nº de casos (%)	6 (0,6)	10 (0,9)	8 (0,8)	14 (1,2)	23 (2,3)	<0,001
Razón de riesgo (95 % CI)	1,0	1,66 (0,60 – 4,57)	1,48 (0,51 – 4,27)	2,05 (0,79 – 5,32)	4,13 (1,68 – 10,15)	
Total eventos cardiovasculares						
Nº de casos (%)	13 (1,2)	25 (2,3)	33 (3,4)	40 (3,3)	61 (6,1)	<0,001
Razón de riesgo (95 % CI)	1,0	1,93 (0,98 – 3,76)	2,83 (1,49 – 5,38)	2,72 (1,45 – 5,08)	5,10 (2,80 – 9,29)	

Continuación Tabla 7

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	
Nº de personas	845	834	745	978	791	
Rango de procal-citonina (ng / ml)	0,007 – 0,012	0,013 – 0,014	0,015 – 0,016	0,017 – 0,020	0,021 – 0,098	
Diabetes						
Nº de casos (%)	13 (1,5)	16 (1,9)	21 (2,8)	27 (2,8)	44 (5,6)	<0,001
Razón de riesgo (95 % CI)	1,0	1,25 (0,60 – 2,62)	1,86 (0,92 – 3,73)	1,82 (0,93 – 3,54)	3,770 (2,01 – 7,05)	

SEQUENCIA

```
1    APFRSALESS PADPATLSED EARLLLAALV QDYVQMKASE LEQEQEREGS
51   SLDSPRSKRC GNLSTCMLGT YTQDFNKFHT FPQTAIGVGA PGKKRDMSSD
101  LERDHRPHVS MPQNAN
```

SEQ ID NO:1 (secuencia de aminoácidos de la PCT):

Listado de secuencias

< 110 > Brahms GmbH

< 120 > Procalcitonina para la prognosis de eventos adversos

< 130 > B60545PCT

< 150 > EP 09011073.5
< 151 > 2009-08-28

< 160 > 1

< 170 > PatentIn versión 3.3

<210 > 1
< 211 > 116
< 212 > PRT
< 213 > Homo sapiens

< 400 > 1

Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr
1 5 10 15

Leu Ser Glu Asp Glu Ala Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Val Gln Asp
20 25 30

Tyr Val Gln Met Lys Ala Ser Glu Leu Glu Gln Glu Gln Glu Arg Glu
35 40 45

Gly Ser Ser Leu Asp Ser Pro Arg Ser Lys Arg Cys Gly Asn Leu Ser
50 55 60

Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr
65 70 75 80

Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp
85 90 95

Met Ser Ser Asp Leu Glu Arg Asp His Arg Pro His Val Ser Met Pro
100 105 110

Gln Asn Ala Asn
115

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento ex vivo, para determinar el riesgo incrementado, de un sujeto aparentemente sano, el cual tenga un valor de base de referencia, del nivel de la PCT < 0,1 ng / ml, de una forma preferible, un humano, en cuanto al hecho de que éste sufra de un evento adverso, cuando el citado sujeto, se encuentra exento de infecciones bacterianas, lo cual significa que, el nivel de la PCT, no se encuentra incrementado por encima del rango normal, significando ello que, el nivel de la PCT, en plasma, no se encuentra incrementado por encima de un valor de 0,25 ng / ml, y en donde, el citado sujeto, no muestra ningún síntoma, que podría permitir la diagnosis de una enfermedad infecciosa, procedimiento éste, el cual comprende:

- determinar el nivel de la procalcitonina (PCT) o un fragmento de ésta, en una muestra del citado sujeto,

en donde, la citada muestra, se selecciona de entre grupo consistente en sangre, en suero, y en plasma

- determinar el hecho de si, el citado sujeto, tiene un riesgo incrementado para sufrir de un evento adverso, basado en el citado nivel de la PCT, en donde, unos niveles de la PCT elevados, son de un valor de pronóstico, para predecir el hecho de si, el sujeto en cuestión, se encuentra en riesgo de sufrir de un evento adverso, en el futuro, en donde, se predice un riesgo dentro de un transcurso de tiempo de 6 meses a 10 años, y

en donde, el citado evento adverso, no se trata de un evento causado por evento agudo inducido por un factor exógeno y / o un trauma inducido por un factor exógeno, y en donde, los siguientes sujetos, se excluyen del grupo de sujetos aparentemente sanos:

· neonatos comprendidos dentro de una edad que va desde un día hasta 3 días, y
· pacientes post-quirúrgicos, en donde, la cirugía, se haya llevado a cabo dentro de los últimos 7 días, y
· pacientes post-traumáticos y personas las cuales hayan experimentado dicho trauma, dentro de los últimos 7 días, y

en donde, el evento adverso, se elige de entre el grupo consistente en los eventos cardíacos, en los eventos cardiovasculares, en los eventos cerebrovasculares, en la mortalidad cardiovascular, en la diabetes, en la mortalidad por cáncer, y en la muerte, y

en donde, el citado sujeto, se encuentra en riesgo de sufrir del citado evento adverso, cuando el nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de por lo menos 0,015 ng / ml.

2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en donde, la PCT, tiene la secuencia de aminoácidos la cual se muestra como la SEQ ID NO. 1.

3.- El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en donde, el citado fragmento de PCT, comprende (contiene)

- por lo menos 12 aminoácidos, de una forma preferible, más de 50 aminoácidos, de la forma mayormente preferible, más de 100 aminoácidos, ó

- los aminoácidos 2 a 116, ó 3 a 116, de la secuencia de aminoácidos, mostrada como la SEQ ID NO: 1.

4.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, el citado nivel de determinación, se lleva a cabo mediante la utilización de ensayo de diagnóstico, de una forma preferible, un inmunoensayo.

5.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 4, en donde, la determinación del riesgo, se lleva a cabo mediante:

- comparar el nivel determinado de la PCT ó del fragmento de la PCT, con la mediana del nivel de la PCT o de los fragmentos de ésta, en un conjunto de muestras predeterminadas, procedentes de una población de sujetos aparentemente sanos, o

- comparar el nivel determinado de la PCT ó del fragmento de la PCT, con un cuantil del nivel de la PCT, o de los fragmentos de ésta, en un conjunto de muestras predeterminadas, procedentes de una población de sujetos aparentemente sanos, o

- realizar cálculos, basados en un análisis de riesgo proporcional, basado en el modelo de Cox, o basados en cálculos del índice de riesgo, tal como los consistente en el Índice de Reclasificación Neta (NRI), o en el Índice de Discriminación Integrado (IDI).

6.- El procedimiento de la reivindicación 1 a 5, en donde, el citado sujeto, se determina como encontrándose en riesgo de sufrir de un evento adverso, cuando el citado nivel de la PCT, en una muestra de suero, o en una muestra

de plasma, es de un valor de por lo menos 0,015 ng / ml, de una forma preferible, de por lo menos un valor de 0,02 ng / ml.

7.- El procedimiento de la reivindicación 1 a 6, en donde, el citado sujeto, se determina como encontrándose en un riesgo incrementado de sufrir de un evento cardíaco, o de un evento cardiovascular, cuando el citado nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de un valor de por lo menos 0,0155 ng / ml.

8.- El procedimiento de la reivindicación 1 a 7, en donde, el citado sujeto, se determina como encontrándose en un riesgo incrementado de sufrir de un evento cerebrovascular, o de morir, debido a una causa cardiovascular, cuando el citado nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de un valor de por lo menos 0,0215 ng / ml.

9.- El procedimiento de la reivindicación 1 a 8, en donde, el citado sujeto, se determina como encontrándose en un riesgo incrementado de morir de cáncer, cuando el citado nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de un valor de por lo menos 0,0155 ng / ml.

10.- El procedimiento de la reivindicación 1 a 9, en donde, el citado sujeto, se determina como encontrándose en un riesgo incrementado de morir, cuando el citado nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de un valor de por lo menos 0,0205 ng / ml.

11.- El procedimiento de la reivindicación 1 a 10, en donde, el citado sujeto, se determina como encontrándose en un riesgo incrementado de sufrir de diabetes, cuando el citado nivel de la PCT, en una muestra de suero, es de un valor de por lo menos 0,0185 ng / ml.

12.- El procedimiento de la reivindicación 1 a 11, el cual comprende, de una forma adicional, el determinar

- un parámetro clínico, el cual se selecciona de entre el grupo consistente en el género, en la edad, en la presión sanguínea sistólica, en la presión sanguínea diastólica, en el índice de la masa corporal, en el perímetro de la cintura, en el factor de relación o cociente (de la presión) tobillo / brazo, y del hábito de fumar; o

- un parámetro de laboratorio, el cual se selecciona de entre el grupo consistente en la concentración de la glucosa en la sangre o en el plasma, en ayunas, en los triglicéridos, en la concentración del colesterol, y en la concentración del colesterol HDL y de las subfracciones de éste, en la concentración del colesterol LDL y las subfracciones de éste, en la cisteína C, en la insulina, en la CRP, en los péptidos natriuréticos del tipo A y del tipo B, así como, también, en los precursores y en los fragmentos de éstos, incluyendo a las ANP, proANP, NT-proANP, MR-proANP, BNP, proBNP, NT-proBNP, GDF15, ST2, la procalcitonina y fragmentos de ésta, la pro-adrenomedulina y fragmentos de ésta, incluyendo a las ADM, PAMP, MR-proADM, CT-proADM, pro-Endotelina-1 y fragmentos de ésta, incluyendo a las CT-proET-1, NTproET-1, la big Endotelina 1, y la Endotelina-1; ó

- un parámetro genérico, el cual se selecciona de entre el grupo consistente en los poliformismos nucleótidos individuales, (SNP), y mutaciones, de una forma particular, relacionados con la herencia de la diabetes o diabetes hereditaria.

13.- Uso de un procedimiento, de las reivindicaciones 1 a 12, para determinar un riesgo incrementado, de que un sujeto aparentemente sano, sufra de un evento adverso.