

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 912**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2009 PCT/EP2009/051036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2009 WO09112307**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2009 E 09719129 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2255202**

54 Título: **Uso de procalcitonina (PCT) en el pronóstico después de síndromes coronarios agudos**

30 Prioridad:

12.03.2008 EP 08152651

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

14.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS;
STRUCK, JOACHIM y
NG, LEONG LOKE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 641 912 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

Uso de procalcitonina (PCT) en el pronóstico después de síndromes coronarios agudos

5 El objeto de la presente invención son ensayos y métodos in vitro para determinar un pronóstico para un paciente que tiene un síndrome coronario agudo, por lo que el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma se mide en una muestra obtenida a partir de dicho paciente. Dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma a continuación, se puede correlacionar con una predisposición a un resultado adverso de dicho síndrome coronario agudo.

10 El término síndromes coronarios agudos (ACS) se ha aplicado a un grupo de trastornos coronarios que resultan de la lesión isquémica al corazón. Los pacientes con ACS forman un grupo heterogéneo, con diferencias en fisiopatología, presentación clínica, y riesgo de eventos adversos. Estos pacientes se presentan al médico con condiciones que abarcan una secuencia continua que incluye angina inestable, infarto de miocardio de onda no Q sin elevación de ST (NST-MI), MI de onda no Q de elevación de ST y MI transmural (onda Q). Se cree que la ACS proviene en gran parte de la deposición y crecimiento de trombos dentro de una o más arterias coronarias, dando como resultado una oclusión parcial o completa de la arteria, y con frecuencia implica ruptura de la placa, dando como resultado una lesión isquémica. ACS también puede ser precipitado por un vasoespasma coronario o aumento de la demanda miocárdica. Para una revisión, véase, por ejemplo, Davies, Clin. Cardiol. 20 (Suppl. I: I2-I7 (1997)).

20 La gravedad del ACS es subrayada por la morbilidad y mortalidad que siguen a la lesión isquémica. Por ejemplo, se ha estimado que, dentro de las cuatro a seis semanas de presentación con ACS, el riesgo de muerte o MI posterior es del 8-14%, y la tasa de muerte, MI o isquemia refractaria es de 15-25% (Theroux and Fuster, Circulation 97: 1195-1206 (1998)). Dado que el número total de muertes en EE. UU. por MI agudo es de aproximadamente 600.000, en el pasado la búsqueda de información relacionada con el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento del ACS ha sido comprensiblemente extensa. Se han identificado varios marcadores potenciales que pueden proporcionar dicha información en determinadas poblaciones de pacientes, incluyendo los niveles circulantes de troponina cardíaca (véase, por ejemplo, Antman et al., N. Eng. J. Med. 335: 1342-9 (1996); véase también las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,147,688, 6,156,521, 5,947,124, y 5,795,725, depresión del segmento ST (véase, por ejemplo, Savonitto et al., JAMA 281: 707-13 (1999)), niveles circulantes de creatina quinasa (véase, por ejemplo, Alexander et al., Circulation (Suppl.) 1629 (1998)), niveles de proteína c reactiva en circulación (véase, por ejemplo, Morrow et al., J. Am. Coll. Cardiol. 31: 1460-5 (1998)), niveles en circulación de polipéptidos procedentes de pre-proBNP (véase, por ejemplo, Wiviott SD, de Lemos JA, Morrow DA. Clin Chim Acta. 2004 Aug 16;346(2):119-28).

35 La procalcitonina (PCT) se ha convertido en un biomarcador bien establecido para el diagnóstico de la sepsis: la PCT refleja la gravedad de la infección bacteriana y se utiliza en particular para monitorizar la progresión de la infección en sepsis, sepsis grave o choque séptico. Es posible usar la PCT para medir la actividad de la respuesta inflamatoria sistémica, 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, IL-10 and PCT plasma concentrations reliable for outcome prediction in severe sepsis? A comparison with APACHE III and SAPS II. Inflamm Res 2004, 53, 158-163). El aumento de los niveles de PCT en los pacientes con sepsis se correlaciona con la mortalidad (Oberhoffer M et al.: Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. Clin Chem Lab Med 1999;37:363-368).

50 Los niveles de PCT se han determinado cualitativamente en pacientes con angina inestable e infarto de miocardio usando un ensayo de PCT con una sensibilidad funcional de 0.3 µg/L (Benamer H et al., J Am Coll Card 1998, 31(2) suppl, 451 A).

55 El diagnóstico de SIRS no infecciosas basadas en los niveles de PCT en sangre en pacientes después de una cirugía coronaria han sido descritos por Kerbaul et al (Brit J Anaesthesia 2004, 93(5), 639-644).

El documento US 2004/0253637 A1 describe un método para el diagnóstico diferencial de una pluralidad de enfermedades coronarias en un sujeto determinando el nivel de un marcador para lesión miocárdica en combinación con el nivel de un marcador relacionado con regulación de la presión sanguínea.

60 Un número creciente de estudios analiza el posible papel de la PCT en otras enfermedades infecciosas como la neumonía, la meningitis bacteriana y la malaria (Bugden SA, Coles C, Mills GD. The potential role of procalcitonin in the emergency department management of febrile young adults during a sustained meningococcal epidemic. Emerg Med Australas 2004, 16, 114-119; Chiwakata CB et al.: Procalcitonin as a parameter of disease severity and risk of

mortality in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 2001, 183, 1161-1164; Schwarz S et al.: Serum procalcitonin levels in bacterial and abacterial meningitis, *Crit Care Med* 2000, 28, 1828-1832).

Los estudios in vitro mostraron que la PCT desempeña un papel importante durante la adhesión y migración de los monocitos y además tiene un efecto sobre la expresión del gen de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) inducible (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.: Procalcitonina amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells, *Crit Care Med*, 2002, 30, 2091-2095.).

La asociación entre los niveles de PCT y la inflamación de bajo grado de la pared arterial en la aterosclerosis sólo se ha analizado recientemente. La solicitud de patente EP 07015271.5 describe el uso de PCT en la estratificación de riesgo de pacientes que sufren de enfermedad coronaria estable (CAD). Sin embargo, hasta ahora no se sabe si el PCT tiene poder pronóstico en los síndromes coronarios agudos (ACS).

El uso de péptido natriurético de tipo B (BNP) y NT-proBNP en el pronóstico de pacientes con síndromes coronarios agudos ha sido demostrado en varios estudios (Mazzone M, Forte P, Portale G, Mancini F, Ursella S, La Sala M, Testa A, Covino M, Pignataro G, Gentiloni Silveri N. Brain natriuretic peptide and acute coronary syndrome. *Minerva Med.* 2005 Feb;96(1):11-8. Arakawa N, Nakamura M, Aoki H, Hiramori K. Plasma brain natriuretic peptide concentrations predict survival after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:1656-1661. de Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2001;345:1014-1021. Omland T, Persson A, Ng L, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2002;106:2913-2918.).

El péptido natriurético de tipo B (BNP o BNP-32) es una neuro-hormona de 32 aminoácidos que se sintetiza en el miocardio ventricular y se libera en la circulación en respuesta a la dilatación ventricular y a la sobrecarga de presión. Las funciones del BNP, al igual que para el péptido natriurético auricular, incluyen natriuresis, vasodilatación, inhibición del eje renina-angiotensina-aldosterona e inhibición de la actividad del nervio simpático. El precursor de BNP se sintetiza como una molécula de 108 aminoácidos, denominada pre-proBNP, que se procesa proteolíticamente en un péptido N-terminal de 76 aminoácidos (aminoácidos 1-76), denominado como NT-proBNP y la hormona madura de 32 aminoácidos, denominada como BNP o BNP-32 (aminoácidos 77-108). Se ha sugerido que cada una de estas especies, NT-proBNP, BNP-32 y pre-proBNP, puede circular en plasma humano (véase, por ejemplo, Tateyama et al., *Biochem. Res. Commun.* 185: 760-767 (1992); Hunt et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 1175-1183 (1995)). Pre-proBNP y NT-proBNP, así como péptidos que se derivan de BNP, pre-proBNP y NT-proBNP, que están presentes en la sangre como resultado de la proteólisis de BNP, NT-proBNP y pre-proBNP, se describen colectivamente descritos en este documento como polipéptidos procedentes de pre-proBNP

Existe la necesidad de marcadores y métodos altamente fiables para el pronóstico de un paciente que tiene un síndrome coronario agudo.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: niveles en plasma de PCT Log en la descarga. Resultados: 0 = supervivencia libre de evento, 1 = paciente revascularizado (bypass coronario o intervención percutánea), 2 = paciente readmitido con insuficiencia cardíaca, 3 = paciente fallecido. Los niveles de PCT Log son significativamente diferentes ($P < 0.001$) por ANOVA, y los niveles de PCT Log son significativamente más altos en los grupos 2 y 3 comparados con 0 ($P < 0.001$, con corrección de Bonferonni para comparaciones múltiples).

Figura 2: Curvas de Kaplan Meier que muestran la supervivencia libre de eventos (para el criterio de valoración de muerte e insuficiencia cardíaca), de pacientes estratificados por los valores de PCT por debajo o por encima de la mediana. La mediana de los valores PCT fue de 0.045 $\mu\text{g/L}$.

Figura 3: Curvas características de funcionamiento del receptor que muestran la predicción del criterio de valoración primario de muerte o insuficiencia cardíaca utilizando PCT (ROC AUC 0.69) y NT-proBNP (ROC AUC 0.76).

Figuras 4a y 4b: Curvas de Kaplan Meier que muestran la supervivencia libre de eventos (para el criterio de valoración muerte e insuficiencia cardíaca), de pacientes estratificados por valores de PCT por debajo (Figura 4a) o por encima (Figura 4b) de la mediana, y por los valores de NT-proBNP por encima o por debajo de la media. La mediana de los valores de PCT fue de 0.045 $\mu\text{g/L}$ y la mediana de los valores de NT-proBNP fue de 914 pmol/l.

Figuras 5a y 5b: Curvas de Kaplan Meier que muestran la supervivencia libre de eventos (para el criterio de valoración muerte), de pacientes estratificados por valores de PCT por debajo (Figura 5a) o por encima (Figura 5b) de la mediana, y los valores de NT-proBNP por debajo o por encima de la mediana. La mediana de los valores de PCT fue de 0.045 $\mu\text{g/L}$ y la mediana de los valores de NT-proBNP fue de 914 pmol/l.

Descripción detallada de la invención

5 El objeto de la presente invención es un método in vitro para el pronóstico de un paciente que tiene un síndrome coronario agudo, comprendiendo el método: determinar el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de 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 una predisposición a un resultado adverso de dicho síndrome coronario agudo.

10 El síndrome coronario agudo es un término global utilizado para cubrir cualquier grupo de síntomas clínicos compatibles con la isquemia miocárdica aguda. La isquemia miocárdica aguda es el dolor torácico debido al suministro insuficiente de sangre al músculo cardíaco que resulta de la enfermedad coronaria (también llamada cardiopatía coronaria).

15 Un síndrome coronario agudo (ACS) es un conjunto de signos y síntomas, por lo general una combinación de dolor torácico y otras características, interpretada como el resultado de una disminución abrupta del flujo sanguíneo al corazón (isquemia cardíaca); la causa más común de esto es la disrupción de la placa aterosclerótica en una arteria coronaria epicárdica. Los subtipos del síndrome coronario agudo incluyen angina inestable (UA, no asociada con daño del músculo cardíaco), y dos formas de infarto de miocardio (ataque al corazón), en las que el músculo cardíaco está dañado. Estos tipos se denominan de acuerdo con la aparición del electrocardiograma (ECG/EKG) como infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (NSTEMI) e infarto de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI).

20 La ACS se debe distinguir de la enfermedad coronaria (también llamada cardiopatía coronaria), que es la aterosclerosis de las arterias coronarias, una condición en la que las arterias se atascan y se estrechan, restringiendo el flujo de sangre al corazón, pero donde - como opuesto a ACS - el suministro de sangre al músculo del corazón no está bloqueado. La enfermedad coronaria puede causar angina estable.

25 La ACS se debe distinguir de la angina estable, que se desarrolla durante el esfuerzo y se resuelve en reposo. En contraste con la angina estable, la angina inestable ocurre repentinamente, a menudo en reposo o con esfuerzo mínimo, o en menor grado de esfuerzo que la angina previa del individuo (angina "in crescendo"). La nueva angina de inicio también se considera angina inestable, ya que sugiere un nuevo problema en una arteria coronaria.

30 El término "síndrome coronario agudo" abarca una gama de enfermedades coronarias trombóticas, incluyendo angina inestable y tanto elevación del segmento ST como infarto de miocardio sin elevación del segmento ST. El diagnóstico requiere un electrocardiograma y una revisión cuidadosa de los signos y síntomas de la isquemia cardíaca.

35 En una realización preferida, dicho resultado adverso se selecciona del grupo que consiste en muerte, insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio.

40 En otra realización preferida, dicha etapa de correlación comprende comparar dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con un nivel umbral, por lo que, cuando dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma excede dicho nivel umbral, dicho paciente está predisuesto a dicho resultado adverso.

45 En una realización más preferida, dicho nivel umbral está en aproximadamente 0.045 (+/- 0.01) µg/L. La definición de este valor umbral proviene del estudio clínico del presente documento, que muestra que a la concentración mediana de PCT de la población de pacientes investigados (0.045 µg/L), una fuerte discriminación de pacientes con resultado adverso de aquellos sin resultado adverso se puede lograr (véase Kaplan-Meier-Plot, Figura 2)

50 El nivel umbral mencionado anteriormente y los niveles de marcadores se determinan como se describe a modo de ejemplo para PCT y NT-proBNP en este documento a continuación en los ejemplos. Por lo tanto, generalmente el nivel de procalcitonina o solo o en combinación con otros marcadores de pronóstico se puede evaluar de la misma manera.

55 En otra realización preferida, dicha muestra se selecciona del grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero, y una muestra de plasma.

60 En una realización adicional, el método in vitro para el pronóstico para un paciente que tiene un síndrome coronario agudo comprende además combinar matemáticamente dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con el nivel de uno o más marcadores de pronóstico adicionales, por lo que la combinación de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con dicho nivel de marcador(es) de pronóstico adicional(es) aumenta el valor predictivo de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma o el nivel de dicho marcador relacionado para dicho resultado adverso. La combinación matemática puede ser, por ejemplo, un algoritmo que clasifique a los pacientes de acuerdo con si su nivel de procalcitonina está por encima o por debajo de un determinado valor umbral y si su nivel de marcador X (y Y, Z ...) está por encima o por debajo de un determinado valor umbral.

65

En una realización preferida adicional, uno de dicho(s) marcador(es) de pronóstico adicional(es) es pre-proBNP o BNP o NT-proBNP en una muestra obtenida de dicho paciente.

Otros marcadores que se pueden usar como marcador(es) de pronóstico adicional(es) se pueden seleccionar del grupo que comprende troponina, mieloperoxidasa, CRP, neopterinina, GDF-15, ST2, cistatina-C, así como los siguientes péptidos en forma de sus péptidos maduros, precursores, prohormonas y fragmentos de prohormona asociados: péptido natriurético atrial, adrenomedulina, endotelinas, vasopresina.

En otra realización más preferida, un marcador de pronóstico es NT pro-BNP.

En otra realización más preferida, un marcador de pronóstico es BNP.

Otra realización más preferida es el método de acuerdo con la invención, que comprende además la determinación del nivel de uno o más marcadores de pronóstico adicionales en una muestra obtenida a partir de dicho paciente y combinar tanto dicho nivel de procalcitonina como fragmentos de la misma y dicho nivel de uno o más marcadores de pronóstico adicionales a dicha predisposición a un resultado adverso, por lo que la combinación de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con dicho nivel de uno o más marcadores de pronóstico adicionales aumenta el valor predictivo de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma para dicho resultado adverso.

En otra realización más preferida, la combinación entre dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma y dicho nivel de uno o más marcadores de pronóstico adicionales se lleva a cabo con un algoritmo matemático. La combinación matemática puede ser, por ejemplo, un algoritmo que clasifique a los pacientes de acuerdo con si su nivel de procalcitonina está por encima o por debajo de un determinado valor umbral y si su nivel de marcador X (y Y, Z ...) está por encima o por debajo de un determinado valor umbral.

Otro objeto de la invención es el uso de un ensayo de procalcitonina ultrasensible que tiene un límite inferior de detección de $<0.045 (+/- 0.010) \mu\text{g/L}$ para determinar en un paciente una predisposición a un resultado adverso de un síndrome coronario agudo.

En otra realización preferida del ensayo de procalcitonina ultrasensible, el ensayo es un ensayo en sándwich que comprende dos anticuerpos contra diferentes unidades estructurales de procalcitonina.

En otra realización más preferida del ensayo de procalcitonina ultrasensible, un anticuerpo está contra la unidad estructural de calcitonina de la procalcitonina, y el otro anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra la unidad estructural de la catacalcina de la procalcitonina.

Ejemplos

Se incluyeron en el estudio 974 pacientes con síndrome coronario agudo (ACS) consecutivo ingresados en la Unidad de Cuidados Coronarios de Leicester Royal Infirmary. El estudio cumplió con the Declaration of Helsinki y fue aprobado por el comité de ética local; se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los pacientes. ACS fue diagnosticado si un paciente tenía dolor torácico duradero > 20 minutos, cambios electrocardiográficos seriados de diagnóstico (ECG) que consiste en nuevas ondas Q patológicas o cambios en el segmento ST y en la onda T, y elevación de la creatina quinasa-MB plasmática mayor de dos veces nivel normal o de troponina I cardíaca $> 0.1 \text{ ng/ml}$ (Alpert JS et al., J Am Coll Cardiol. 2000; 36: 959-969). ACS se subclasificó en infarto de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI) o infarto de miocardio sin ST (NSTEMI). Los criterios de exclusión fueron malignidad conocida o cirugía en el mes previo al estudio. El GFR estimado (eGFR) de estos sujetos se calculó mediante la fórmula simplificada derivada del estudio modificación de la dieta en la enfermedad renal (MDRD), recientemente validado en pacientes con HF (Smilde TD et al. Circulation. 2006; 114: 1572-80).

Se extrajeron muestras de sangre a los 3 a 5 días después del inicio del dolor torácico para la determinación de los niveles de procalcitonina (PCT) y NT-proBNP en plasma. Después de 15 minutos de reposo en cama, se recogieron 20 mL de sangre en tubos que contenían EDTA y aprotinina. Todo el plasma se almacenó a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta que se ensayó de manera cegada en un solo lote.

La ecocardiografía transtorácica se realizó en pacientes utilizando un instrumento Sonos 5500 (Philips Medical Systems, Reigate, Reino Unido). Se obtuvo un índice de movimientos de la pared ventricular izquierda (LVWMI) de 16 segmentos basado en el modo de la Sociedad Americana de Ecocardiografía mediante la puntuación de cada segmento de LV (1=normal, 2=hipoquinesis, 3=aquinesis y 4=disquinesis (Movimiento Paradoxical), y dividiendo el total por el número de segmentos anotados. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) se calculó utilizando la fórmula del método biplano de discos (Schiller NB et al. J Am Soc Echocardiogr. 1989; 2:358-367). La función sistólica del LV se definió como una EF $<40\%$ o un LVWMI > 1.8 .

El ensayo de NT-proBNP se basó en un ensayo no competitivo como se había publicado previamente (Omland T et al. Circulation. 2002; 106: 2913-2918). Los anticuerpos de oveja se elevaron al N-terminal de NT-proBNP humano y

los anticuerpos monoclonales de ratón se elevaron al C-terminal. Se incubaron muestras o patrones de NT-proBNP en pozos recubiertos con IgG C-terminal con el anticuerpo N-terminal biotinilado durante 24 horas a 4°C. La detección se llevó a cabo con estreptavidina marcada con éster de metilacridinio (MAE) en un luminómetro de placa MLX (Dyner Technologies Ltd., Worthing, Reino Unido). El límite inferior de detección fue de 0.3 pmol/l. No hubo reactividad cruzada con péptido natriurético atrial, BNP o péptido natriurético tipo C.

La procalcitonina (PCT) se midió como se ha descrito (Morgenthaler NG et al.: Clin Chem, 2002 May, 48(5), 788-790). Se cultivaron anticuerpos de oveja contra la unidad estructural de calcitonina de PCT, y se elevó un anticuerpo monoclonal de ratón contra la unidad estructural de calcitonina de PCT. Los tubos se recubrieron con el anticuerpo anticatocalcina. El anticuerpo anticalcitonina se marcó con MACN Acridiniumester (InVent GmbH, Hennigsdorf, Alemania) y sirvió como trazador. Las diluciones de PCT recombinante en suero de caballo normal sirvieron como patrones. Se incubaron 100 µl de muestra de o estándar en los tubos recubiertos durante 30 minutos, se adicionaron 200 µl de trazador. Después de la incubación durante 2 h, los tubos se lavaron 4 veces con 1 ml de solución de lavado LIA (BRAHMS AG) y se unieron. La quimioluminiscencia se midió usando un luminómetro LB952T (Berthold, Alemania).

Se evaluó el nivel tanto de procalcitonina (PCT) como de NT-proBNP para la predicción del criterio de valoración primario (muerte o insuficiencia cardíaca {HF}). La muerte también se investigó como un criterio de valoración secundario individual. La hospitalización por HF se definió como una readmisión hospitalaria para la cual la HF fue la principal razón. Los criterios de valoración se obtuvieron revisando la oficina del registro nacional de estadísticas y poniéndose en contacto con cada paciente. Hubo un seguimiento mínimo de 6 meses de todos los pacientes supervivientes.

El análisis estadístico se realizó en SPSS Versión 14 (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Las variables continuas en los dos grupos independientes se compararon mediante la prueba Mann Whitney U. Se realizaron las correlaciones de Spearman. Para probar la potencia predictiva independiente para la muerte o HF de los niveles de péptidos, se llevaron a cabo análisis de supervivencia utilizando el modelo de riesgo proporcional de Cox y los modelos de Kaplan Meier. Los niveles de NT-proBNP y PCT se normalizaron mediante transformación logarítmica. De este modo, las relaciones de riesgo se refieren a un aumento de diez veces en los niveles de estos marcadores. Los modelos de Cox siempre se construyeron utilizando las mismas variables introducidas simultáneamente (que incluyeron variables estadísticamente significativas en los análisis univariantes en $P < 0.10$).

Para comparar la exactitud de NT-proBNP y PCT como marcadores, se generaron curvas características del receptor (ROC) y se calculó el área bajo las curvas (AUC). Se consideró que un valor P de dos colas de menos de 0.05 era estadísticamente significativo.

Las características demográficas de la población de pacientes se muestran en la tabla 1. La duración media del seguimiento fue de 660 días con un intervalo de 0-2837 días. Ningún paciente se perdió durante el seguimiento y la duración mínima del seguimiento de los supervivientes fue de 187 días (aproximadamente 6 meses).

Durante el seguimiento, 200 pacientes (20.5%) fallecieron y 82 (8.4%) fueron readmitidos con insuficiencia cardíaca. Hubo 779 pacientes con STEMI, 68% de los cuales recibieron terapia trombolítica.

Tabla 1: Características de los pacientes en el estudio. Los valores son medianas [intervalo] o números (porcentaje).

	Pacientes con AMI
Número	974
Edad (en años)	66 [24-95]
Género masculino	715
eGFR (ml/min/1.73m ² área de superficie)	68.7 [14.9-243.9]
NTproBNP (pmol/l)	914 [0.3-28886.8]
Procalcitonina (µg/L)	0.045 [0.007-9.7]
Historia médica previa	
Angina de pecho (%)	249 (25.5)
Infarto de miocardio (%)	163 (16.7)
Hipertensión (%)	426 (43.7)
Diabetes Mellitus (%)	213 (21.8)
Insuficiencia cardíaca (%)	56 (5.7)
STEMI (%)	779 (79.9)

Niveles de PCT (Análisis univariante)

5 Los niveles en plasma de PCT obtenidos predescarga (días 3-5) en 974 pacientes con ACS fueron elevados en comparación con el intervalo normal (Tabla 2) (PCT mediana en individuos normales es 0.0127 µg/l (Morgenthaler NG et al. : Detección de la procalcitonina (PCT) en los controles sanos y en los pacientes con infección local por un ILMA sensible. Clin Lab. 2002, 48, (5-6), 263-270). Los pacientes varones tenían niveles más bajos de PCT en comparación con las mujeres (Tabla 2) Los pacientes que tenían antecedentes médicos previos de infarto agudo de miocardio (AMI), hipertensión, diabetes o insuficiencia cardíaca (HF) presentaron niveles elevados de PCT en comparación con aquellos sin antecedentes médicos. Los niveles de PCT fueron similares en aquellos con infarto de miocardio anterior en comparación con otros sitios de infarto, o STEMI en comparación con NSTEMI (Tabla 2]. Los pacientes que presentaron una clase de Killip superior a 1 (indicando presencia de insuficiencia de la función sistólica ventricular izquierda) tuvieron niveles significativamente elevados de PCT y esto fue confirmado por los niveles más altos de PCT encontrados en pacientes con evidencia ecocardiográfica de disfunción sistólica (Tabla 2).

10

15 Con respecto a los criterios de valoración, la PCT se elevó en pacientes con muerte o HF en comparación con supervivientes libres de eventos (Tabla 2). PCT también se levantó en los pacientes con los criterios de valoración secundarios individuales de muerte sola, o insuficiencia cardíaca sola (Tabla 2, figura 1).

20 PCT en plasma se correlacionó con la edad, eGFR, clase de Killip (Tabla 3) y NT-proBNP (r = 0.36, P <0.0005).

Tabla 2: Análisis univariante de PCT y NT-proBNP en pacientes con infarto agudo de miocardio (AMI). Evidencia ecocardiográfica para la presencia/ausencia de HF estaba disponible para 639 pacientes.

(mediana [intervalo])	PCT (µg/L)		Valor P	NTproBNP (pmol/l)		Valor P
Hombres vs mujeres	0.035 vs. [0.003-6.23]	0.045 [0.007-9.7]	<0.001	786 vs. [0.3-28886]	1603 [5.7-24016]	<0.001
Historia médica previa						
AMI vs. nada	0.042 vs. [0.005-9.7]	0.036 [0.003-6.2]	<0.034	1332 vs. [0.3-11259]	842 [0.3-28886]	<0.002
Hipertensión vs. nada	0.039 vs. [0.004-6.23]	0.035 [0.003-9.7]	<0.025	1103 vs. [0.3-28886]	802 [0.3-24016]	<0.001
Insuficiencia cardíaca vs. nada	0.051 vs. [0.011-6.23]	0.036 [0.003-9.7]	<0.001	2817 vs. [9.4-12933]	875 [0.3-28886]	<0.001
Diabetes vs. nada	0.047 vs. [0.005-6.23]	0.034 [0.003-9.7]	<0.001	1264 vs. [0.3-28886]	829 [0.3-24016]	<0.001
STEMI vs. NSTEMI	0.036 vs. [0.005-9.7]	0.039 [0.003-1.06]	NS	1014 vs. [0.3-28886]	662 [1.8-24016]	<0.001
Anterior vs. otro	0.036 vs. [0.003-9.7]	0.037 [0.004-3.63]	NS	1009 vs. [0.3-24016]	806 [0.3-28886]	NS
Trombolizado vs. No trombolizado	0.034 vs. [0.004-4.5]	0.042 [0.003-9.7]	<0.001	883 vs. [0.3-15733]	975 [0.3-28886]	NS
Clase de Killip > 1 vs. Clase de Killip 1	0.043 vs. [0.003-9.7]	0.032 [0.004-2.47]	<0.001	1583 vs. [0.3-28886]	630 [0.3-24016]	<0.001
Evidencia ecocardiográfica de HF vs. sin HF	0.051 vs. [0.005-9.7]	0.032 [0.004-2.47]	<0.001	2286 vs. [0.3-14109]	802 [0.3-28886]	<0.001
Criterios de valoración						
Muerte o HF (n = 248) vs. Evento supervivencia libre	0.071 vs. [0.003-9.7]	0.032 [0.004-2.47]	<0.001	3595 vs. [2.4-28886]	688 [0.3-24015]	<0.001
Muerte (n = 200) vs. Supervivencia libre de eventos	0.070 vs. [0.003-9.7]	0.032 [0.004-2.47]	<0.001	3875 vs. [14.4-28886]	688 [0.3-24015]	<0.001
HF vs. Supervivencia sin eventos	0.083 vs. [0.008-4.51]	0.032 [0.004-2.47]	<0.001	3835 vs. [2.4-12933]	688 [0.3-24015]	<0.001
Correlaciones de Spearman						
Edad	r _s = 0.28		<0.001	r _s = 0.423		<0.001
eGFR	r _s = -0.329		<0.001	r _s = -0.426		<0.001
Clase de Killip	r _s = 0.231		<0.001	r _s = 0.323		<0.001

Tabla 3. Análisis de regresión de Cox para la muerte o HF después de AMI, mostrando análisis univariante y multivariante (utilizando sólo variables predictivas significativas en el análisis univariante).

	Análisis univariante		Análisis multivariante	
	Razón de riesgos [95% CI]	Valor P	Razón de riesgos [95% CI]	Valor P
Edad	1.08 [1.07-1.09]	<0.001	1.04 [1.03-1.06]	<0.001
Género	0.60 [0.46-0.77]	<0.001	1.05 [0.80-1.38]	NS
Historia anterior de: -				
AMI	2.51 [1.91-3.30]	<0.001	1.65 [1.24-2.19]	<0.001
Insuficiencia cardíaca	2.07 [1.32-3.24]	<0.002	0.98 [0.62-1.56]	NS
Hipertensión	1.59 [1.24-2.04]	<0.001	1.23 [0.95-1.60]	NS
Diabetes mellitus	1.83 [1.40-2.39]	<0.001	1.21 [0.91-1.61]	NS
AMI anterior	1.05 [0.79-1.38]	NS		
AMI de elevación de ST	0.82 [0.62-1.10]	NS		
Uso trombolítico	0.64 [0.50-0.82]	<0.001	0.80 [0.62-1.05]	NS
Clase de Killip > 1	2.58 [1.96-3.38]	<0.001	1.26 [0.93-1.69]	NS
Log NT-proBNP	4.23 [3.36-5.34]	<0.001	2.47 [1.90-3.21]	<0.001
Log PCT	2.63 [2.18-3.18]	<0.001	1.29 [1.02-1.62]	<0.03
eGFR	0.96 [0.95-0.97]	<0.001	0.99 [0.98-1.00]	<0.04

5

Niveles de NT-proBNP (Análisis univariante)

El plasma NT-proBNP obtenido en la fase predescarga (días 3-5) fue significativamente mayor en los pacientes que murieron o fueron readmitidos con HF en comparación con los supervivientes libres de eventos (Tabla 2). Se observaron diferencias significativas en los niveles de NT-proBNP entre hombres y mujeres, aquellos con una clase de Killip por encima de 1 y en pacientes con antecedentes médicos previos de insuficiencia cardíaca, hipertensión, infarto de miocardio o diabetes (Tabla 2). Los niveles en plasma de NT-proBNP también fueron mayores en los pacientes con STEMI vs. NSTEMI, pero no en aquellos con localización anterior de AMI. NT-proBNP en plasma se correlacionó con la edad, eGFR y clase de Killip (Tabla 2).

15

Criterios de valoración primarios: PCT y NT-proBNP como predictores de muerte e insuficiencia cardíaca

Los predictores univariantes de muerte o HF se presentan en la Tabla 3. El área bajo la curva característica de operación del receptor (AUC ROC) para PCT (0.69 [intervalo de confianza CI del 95%: 0.65-0.73]) y NT-proBNP (0.76 [CI del 95%: 0.72-0.79]) fueron comparables

20

El modelo de riesgo proporcional de Cox utilizando los predictores univariantes que fueron significativos (hasta $P < 0.10$) reveló NT-proBNP, PCT, edad, eGFR y antecedentes médicos de AMI como predictores independientes y/o adicionales de muerte o insuficiencia cardíaca (Tabla 3). Ni la clase de Killip, el uso trombolítico, antecedentes médicos de insuficiencia cardíaca, hipertensión o diabetes fueron predictores independientes.

25

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de eventos por debajo y por encima de la mediana de PCT (0.045 $\mu\text{g/L}$) ilustran que aquellos pacientes con niveles de PCT por encima de la mediana tienen un peor pronóstico que aquellos pacientes con una PCT por debajo de la mediana (figura 2 (Log Rank, $P < 0.001$)). Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de eventos por debajo y por encima de la mediana de PCT, tanto por debajo como por encima de la mediana de los valores de NT-proBNP, ilustran que los pacientes con niveles de PCT por encima de la mediana tienen un peor pronóstico que aquellos pacientes con una PCT por debajo de la mediana (figura 4, $P < 0.009$ (usando la prueba Log Rank) para los pacientes que tenían niveles de NT-proBNP por debajo de la mediana y $P < 0.001$ (usando la prueba Log Rank) para los pacientes que tenían niveles de NT-proBNP por encima de la mediana).

35

Criterios de valoración secundarios: PCT y NT-proBNP como predictores de muerte

PCT y NT-proBNP fueron significativamente mayores en los pacientes que murieron en comparación con supervivientes libres de eventos (Tabla 2). El modelo de riesgos proporcionales de Cox sugirió que las mismas variables (PCT, NT-proBNP, edad y antecedentes médicos de AMI) fueron predictores independientes de muerte. El análisis de Kaplan-Meier confirmó una menor mortalidad en pacientes con PCT por debajo de la mediana en ambos grupos estratificados por la mediana de los valores de NT-proBNP (figura 5, $P < 0.01$ (usando la prueba Log Rank) para los pacientes que tenían niveles de NT-proBNP por debajo de la mediana, y $P < 0.001$ (usando la prueba Log Rank) para los pacientes que tenían niveles de NT-proBNP por encima de la mediana).

45

Tabla 4. Análisis de regresión de Cox para la muerte después de AMI, mostrando análisis univariante y multivariante (usando sólo variables predictivas significativas en el análisis univariante).

	Análisis univariante		Análisis multivariante	
	Razón de riesgos [95% CI]	Valor P	Razón de riesgos [95% CI]	Valor P
Edad	1.08 [1.07-1.10]	<0.001	1.05 [1.03-1.06]	<0.001
Género	0.56 [0.42-0.4]	<0.001	0.96 [0.71-1.29]	NS
Historia anterior de: -				
AMI	2.51 [1.85-3.40]	<0.001	1.715 [1.25-2.35]	<0.001
Insuficiencia cardíaca	2.27 [1.41-3.66]	<0.001	1.08 [0.66-1.75]	NS
Hipertensión	1.50 [1.14-1.98]	<0.001	1.15 [0.86-1.53]	NS
Diabetes mellitus	1.79 [1.33-2.41]	<0.001	1.17 [0.87-1.61]	NS
AMI anterior	1.05 [0.79-1.38]	NS		
AMI de elevación de ST	0.82 [0.59-1.12]	NS		
Uso trombolítico	0.62 [0.47-0.82]	<0.001	0.79 [0.59-1.06]	NS
Clase de Killip > 1	2.37 [1.7-3.20]	<0.001	1.09 [0.79-1.52]	NS
Log NT-proBNP	4.23 [3.36-5.34]	<0.001	2.52 [1.88-3.38]	<0.001
Log PCT	2.63 [2.18-3.18]	<0.001	1.30 [1.01-1.69]	<0.04
eGFR	0.96 [0.95-0.97]	<0.001	0.99 [0.98-1.00]	NS

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método in vitro para el pronóstico de un paciente que tiene un síndrome coronario agudo, comprendiendo el método: determinar el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de más de 110 aminoácidos de longitud, en una muestra obtenida a partir de dicho paciente; y correlacionar dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con una predisposición a un resultado adverso de dicho síndrome coronario agudo y en el que dicha etapa de correlación comprende comparar dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con un nivel umbral, por lo que cuando dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma excede dicho nivel umbral, dicho paciente está predispuesto a dicho resultado adverso en el que dicho nivel umbral está en aproximadamente 0.045 (+/- 0.010) $\mu\text{g/L}$.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho resultado adverso se selecciona del grupo que consiste en muerte, corazón fracaso e infarto de miocardio.
- 15 3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha muestra se selecciona del grupo que comprende una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma.
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además correlacionar dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con el nivel de uno o más marcadores de pronóstico adicionales, por lo que la combinación de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con dicho nivel de marcador(es) de pronóstico adicional(es) aumenta el valor predictivo de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma o el nivel de dicho marcador relacionado para dicho resultado adverso.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que uno de dicho(s) marcador(es) de pronóstico es pre-proBNP o NT pro-BNP o BNP en una muestra obtenida de dicho paciente.
- 30 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, que comprende además determinar el nivel de uno o más marcadores de pronóstico adicionales en una muestra obtenida de dicho paciente, y correlacionar tanto dicho nivel de procalcitonina como fragmentos de la misma y dicho nivel de uno o más marcadores de pronóstico adicionales a dicha predisposición a un resultado adverso, por lo que la combinación de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma con dicho nivel de uno o más marcadores de pronóstico adicionales aumenta el valor predictivo de dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma para dicho resultado adverso .
- 35 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el marcador de pronóstico adicional se selecciona de un grupo que comprende troponina, mieloperoxidasa, CRP, neopterin, GDF-15, ST2, cistatina C, así como los siguientes péptidos en forma de sus péptidos maduros, precursores, prohormonas y fragmentos de prohormonas asociados: péptidos natriuréticos, adrenomedulina, endotelinas, vasopresina.
- 40 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la correlación entre dicho nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma y dicho nivel de uno o más marcadores de pronóstico adicionales se lleva a cabo con un algoritmo matemático.
- 45 9. Uso de un ensayo de procalcitonina ultrasensible que tiene un límite de detección inferior a $< 0.045 (+/- 0.010) \mu\text{g/L}$ para determinar en un paciente una predisposición a un resultado adverso de un síndrome coronario agudo en un método de acuerdo con la reivindicación 1 -8.
- 50 10. Uso de un ensayo de procalcitonina ultrasensible de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el ensayo es un ensayo en sándwich que comprende dos anticuerpos contra diferentes unidades estructurales de procalcitonina.
11. Uso de un ensayo de procalcitonina ultrasensible de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que un anticuerpo está contra la unidad estructural de calcitonina de procalcitonina, y el otro anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra la unidad estructural de catacalcina de procalcitonina.

Fig. 1

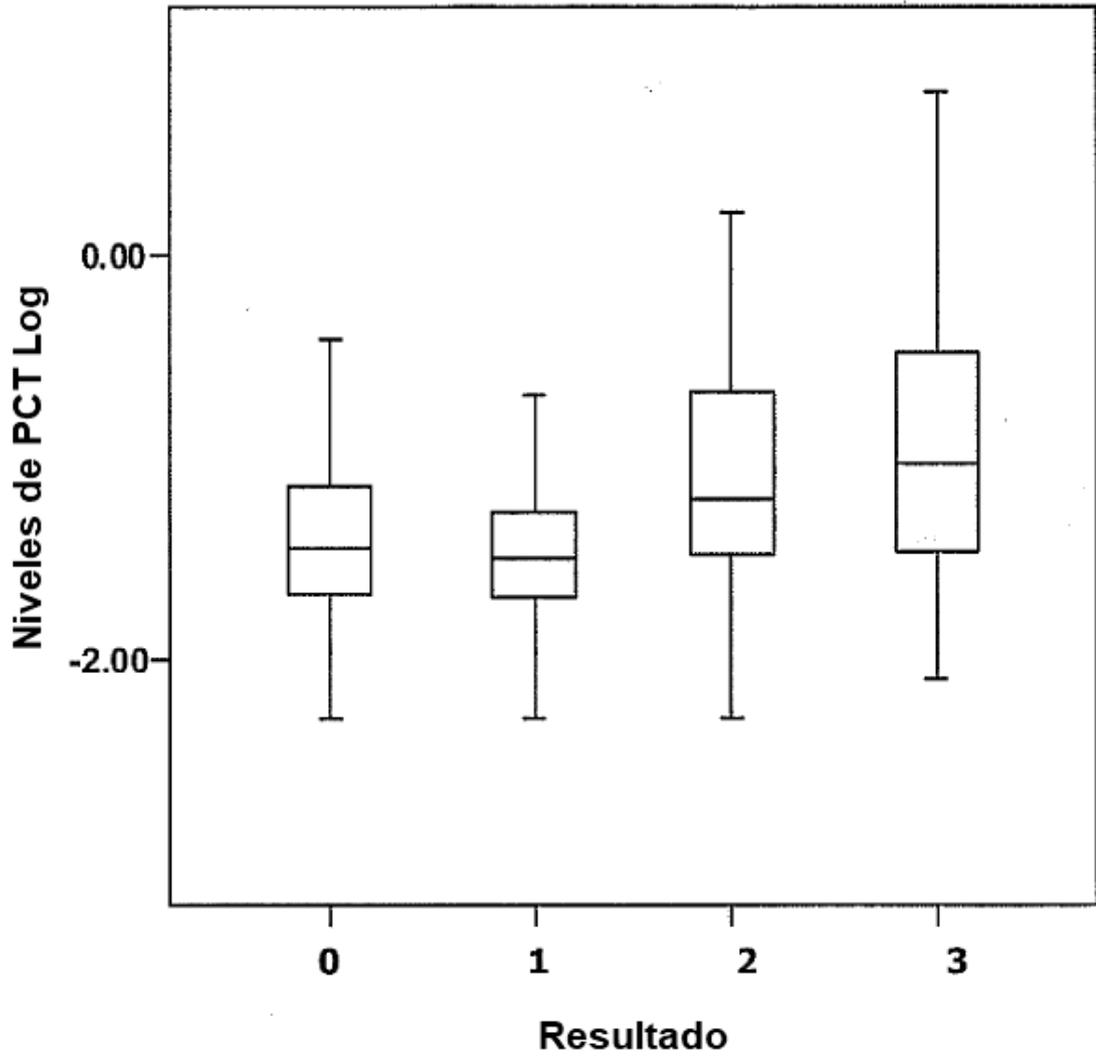


Fig. 2

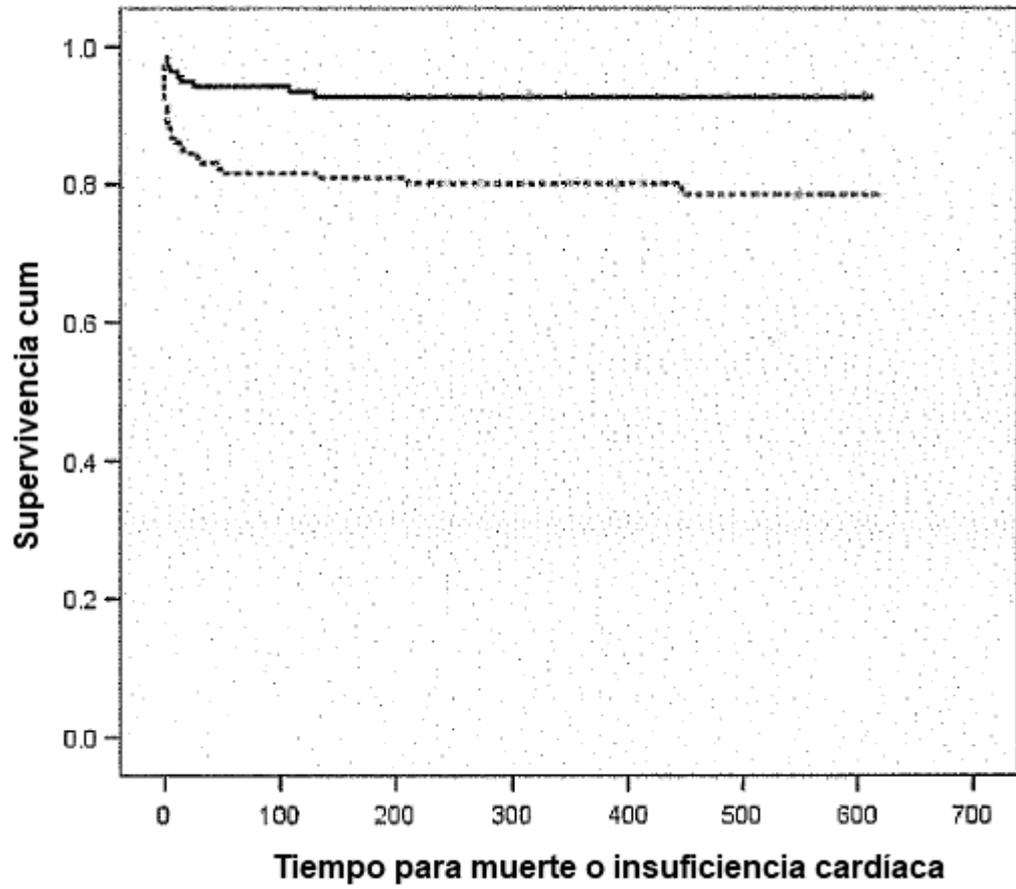


Fig. 3

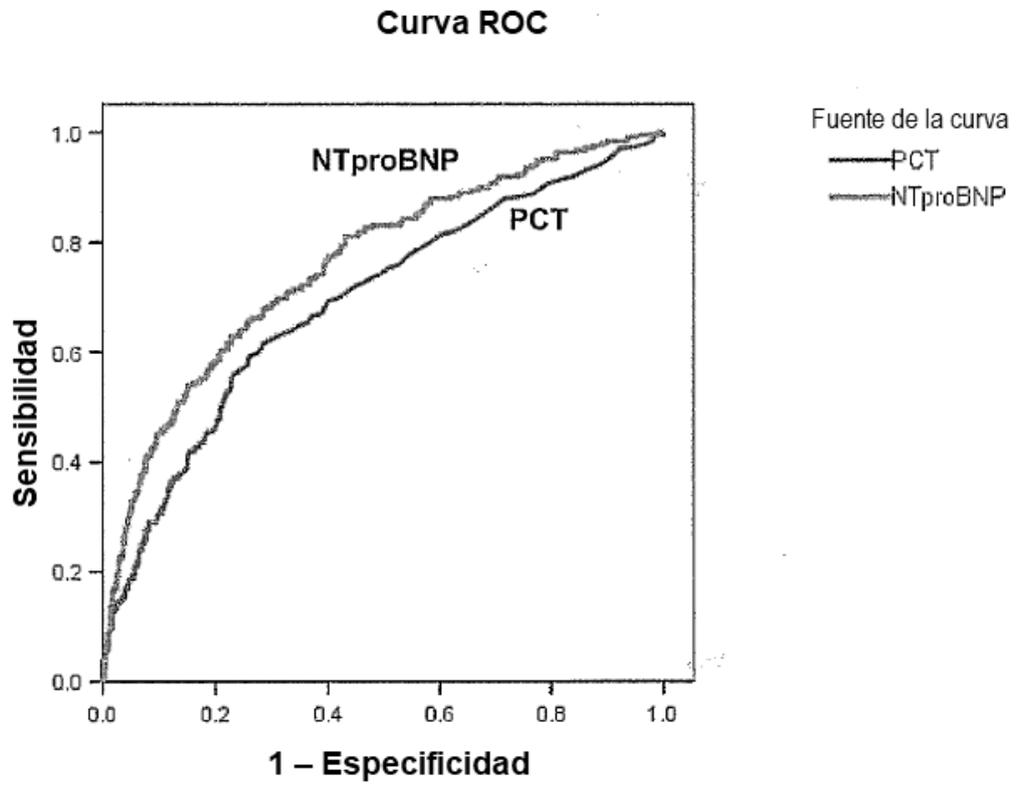


Fig. 4a

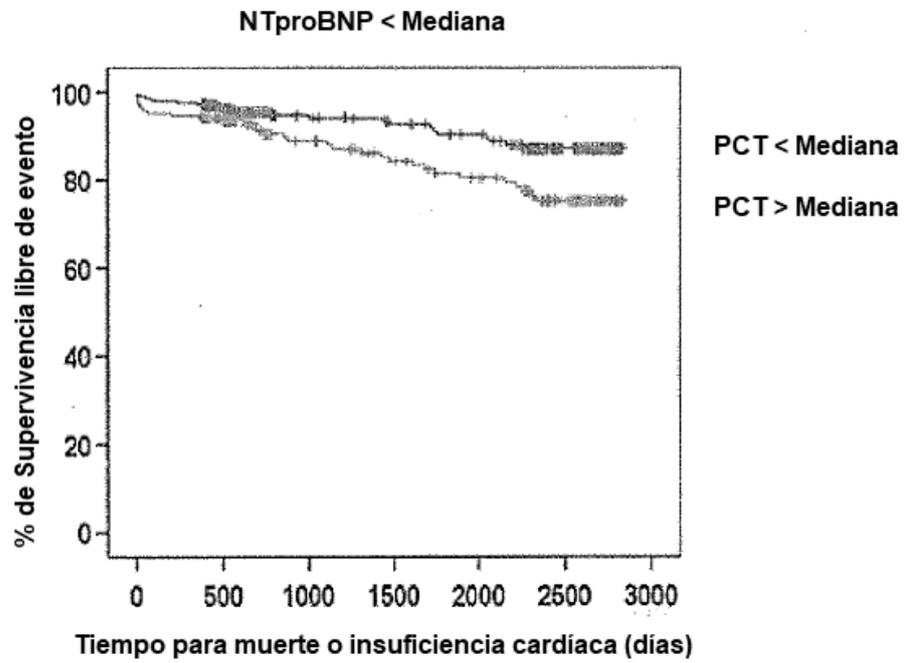


Fig. 4b

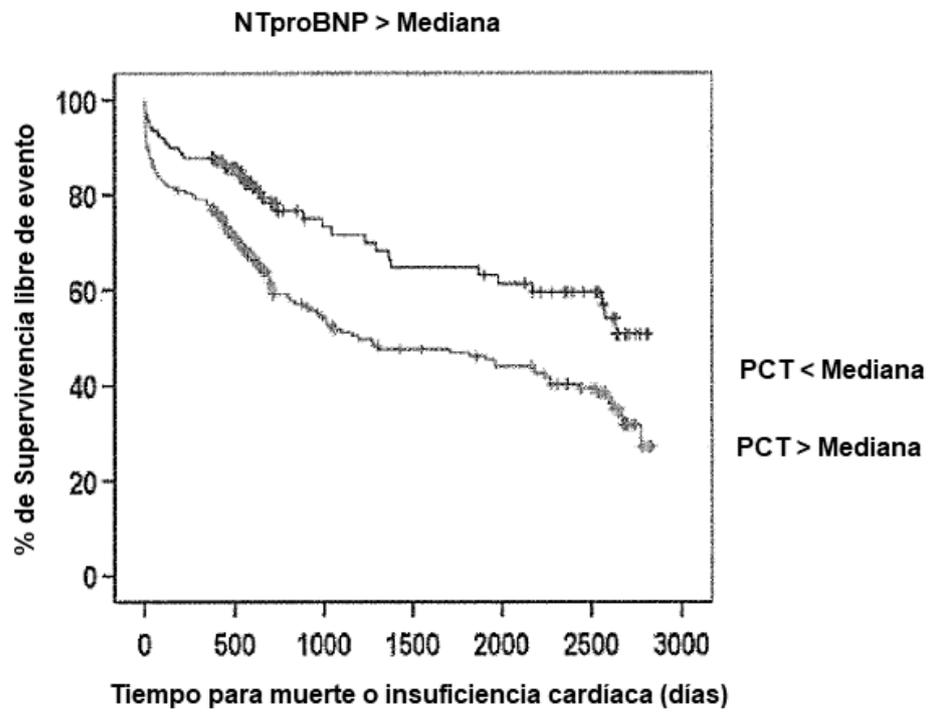


Fig. 5a

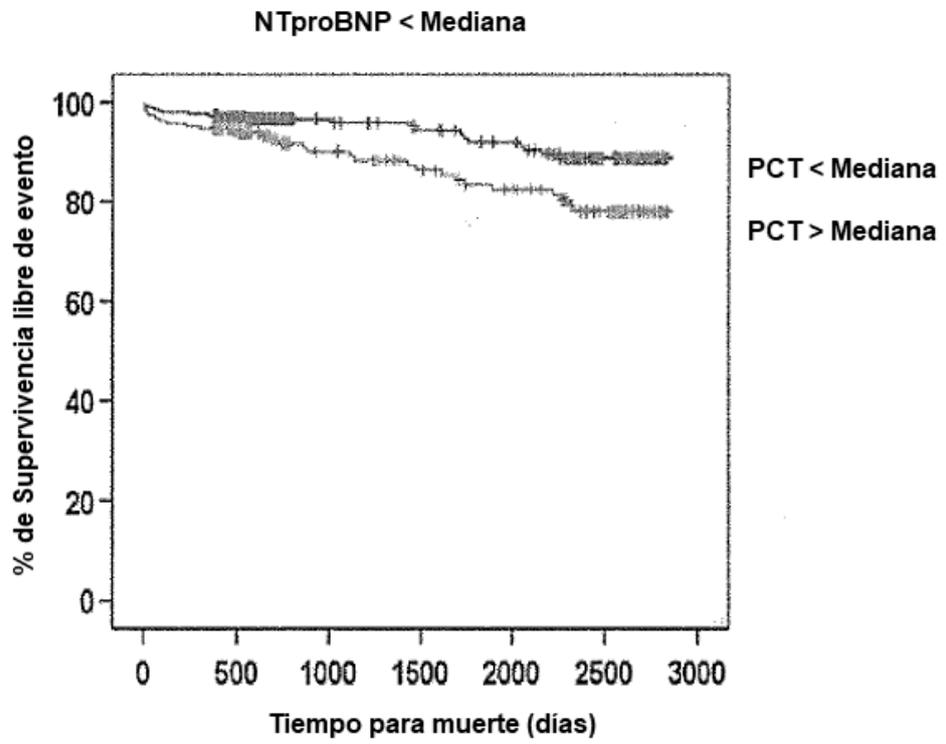


Fig. 5b

