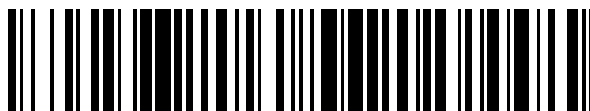


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 822**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2013 PCT/EP2013/070470**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053501**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2013 E 13776750 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2904403**

54 Título: **Método para diagnosticar o monitorizar la función renal o diagnosticar la disfunción renal**

30 Prioridad:

02.10.2012 EP 12187051
03.06.2013 EP 13170327

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2018

73 Titular/es:

SPHINGOTEC GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 15a
16761 Henningsdorf, DE

72 Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 674 822 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

Método para diagnosticar o monitorizar la función renal o diagnosticar la disfunción renal.

5 El objeto de la presente invención es un método para (a) diagnosticar o monitorizar la función renal en un sujeto, o (b) diagnosticar la disfunción renal en un sujeto o (c) predecir o monitorizar el riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que dicho suceso adverso se selecciona de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de la función renal y la enfermedad renal de estadio terminal debido a disfunción renal, incluyendo insuficiencia renal, pérdida de función renal y enfermedad renal de estadio terminal, o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención, que comprende:

- determinar el nivel de proencefalina (PENK) o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido a partir de dicho sujeto, y

15 (a) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con la función renal en un sujeto, o

20 (b) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con la disfunción renal, en la que un nivel elevado superior a determinado umbral es predictivo o diagnóstico de disfunción renal en dicho sujeto, o

25 (c) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con dicho riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que un nivel elevado superior a determinado umbral es predictivo de un riesgo incrementado de dichos sucesos adversos, o

30 (d) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con el éxito de una terapia o intervención en un sujeto enfermo, en el que un nivel inferior a determinado umbral es predictivo del éxito de la terapia o intervención, en el que dicha terapia o intervención puede ser terapia sustitutiva renal o puede ser el tratamiento con ácido hialurónico en pacientes que han recibido terapia sustitutiva renal o la predicción o monitorización de la recuperación de la función renal en pacientes con una función renal deteriorada antes y después de la terapia sustitutiva renal y/o de intervenciones farmacológicas,

35 en la que dicha proencefalina o fragmento se selecciona de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 y SEC ID nº 11.

40 La met-enkefalina, un péptido de 5 aminoácidos derivado del precursor de la enkefalina (pre-proencefalina), también denominado "factor de crecimiento de opioides" (FCO) se libera junto con los fragmentos de proencefalina. El péptido maduro se une a diferentes receptores de opioide (Koneru et al., 2009). La enkefalina (FCO) se ha encontrado que presenta varias funciones fisiológicas. En el SNC regula negativamente la señalización del dolor asociada a la sustancia P, desempeña funciones como citoquina (Plotnikoff et al., 1997). Los péptidos relacionados con la proencefalina muestran actividades antibióticas (Goumon et al., 1998). La proencefalina y la enkefalina muestra una acción antitumoral y actúan como agentes proapoptóticos (Tavish et al., 2007; Donahue et al., 2011; Zagon et al., 2009). Se ha informado de que la enkefalina se encuentra elevada en la disfunción renal (Smith et al., 1985; Zoccali et al., 1987; Smith et al., 1981). La enkefalina es producida como una proencefalina de mayor tamaño y es convertida mediante proteólisis en los pentapéptidos maduros. Durante el proceso de maduración, se generan varios fragmentos de proencefalina, los cuales son liberados juntos conjuntamente con la enkefalina (Ernst et al., 2006).

50 La patente nº EP 2293079 da a conocer un método y kits para la determinación del nivel de proencefalina con fines diagnósticos. El documento nº WO 2012/017071 da a conocer la utilización de perlecán como biomarcador sanguíneo de disfunción renal.

55 La materia objeto de la presente exposición es la utilización de proencefalina (PENK) o fragmentos de la misma como marcador de la función y disfunción renales y su utilidad clínica en sujetos sanos y enfermos. La materia objeto de la presente exposición es un método para el diagnóstico o la monitorización de la función renal en un sujeto o la predicción del riesgo de muerte o sucesos adversos en un sujeto enfermo.

60 Un objetivo de la presente exposición es además proporcionar poder pronóstico y diagnóstico de PENK o fragmentos de la misma para el diagnóstico de la función y disfunción renal y el valor pronóstico en sujetos enfermos.

65 Inesperadamente se ha demostrado que PENK o fragmentos de la misma son biomarcadores potentes y altamente significativos de la función y disfunción del riñón, del riesgo de muerte o de sucesos adversos y de pronóstico y monitorización del éxito de la terapia o intervención.

La materia objeto del presente invención es un método para (a) diagnosticar o monitorizar la función renal en un sujeto o (b) diagnosticar la disfunción renal en un sujeto, o (c) predecir o monitorizar el riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que dicho suceso adverso se selecciona de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o la muerte debido a disfunción renal, incluyendo insuficiencia renal, pérdida de función renal y enfermedad renal de estadio terminal, o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención que comprende:

- determinar el nivel de proencefalina (PENK) o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto, y
 - (a) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con la función renal en un sujeto, o
 - (b) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con la disfunción renal, en la que un nivel elevado superior a determinado umbral es predictivo o diagnóstico de disfunción renal en dicho sujeto, o
 - (c) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con dicho riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que un nivel elevado superior a determinado umbral es predictivo de un riesgo incrementado de dichos sucesos adversos, o
 - (d) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con el éxito de una terapia o intervención en un sujeto enfermo, en el que un nivel inferior a determinado umbral es predictivo de éxito de la terapia o intervención, en el que dicha terapia o intervención puede ser terapia sustitutiva renal o puede ser tratamiento con ácido hialurónico en pacientes que han recibido terapia sustitutiva renal o predecir o monitorizar el éxito de la terapia o intervención puede ser la predicción o monitorización de la recuperación de la función renal en pacientes con función renal deteriorada antes y después de la terapia sustitutiva renal y/o intervenciones farmacológicas,

en el que dicha proencefalina o fragmento de la misma se selecciona de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 y SEC ID nº 11.

Según la presente invención, dicha proencefalina o fragmentos de la misma no es leu-encefalina y no met-encefalina en una forma de realización específica. En un ejemplo dado a conocer, dicho fragmento proencefalina es MR-proencefalina (MRPENK) o un fragmento de la misma que presenta por lo menos 5 aminoácidos.

En otras palabras, la materia objeto de la presente invención es un método para: (a) diagnosticar o monitorizar la función renal en un sujeto, o (b) diagnosticar la disfunción renal en un sujeto, o (c) predecir o monitorizar el riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que dicho suceso adverso se selecciona de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o la muerte debido a disfunción renal, incluyendo insuficiencia renal, pérdida de función renal y enfermedad renal de estadio terminal, o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención según se define en cualquier de las reivindicaciones 1 a 3 adjuntas, que comprende:

- determinar el nivel de analito inmunorreactivo mediante la utilización de por lo menos un agente de unión que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de la proencefalina (PENK) en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto, y
 - (a) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con la función renal en un sujeto, o
 - (b) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con la disfunción renal, en la que un nivel elevado superior a determinado umbral es predictivo o diagnóstico de disfunción renal en dicho sujeto, o
 - (c) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con dicho riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que un nivel elevado superior a determinado umbral es predictivo de un riesgo incrementado de dichos sucesos adversos, o
 - (d) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con el éxito de una terapia o intervención en un sujeto enfermo, en el que un nivel inferior a determinado umbral es predictivo del éxito de la terapia o intervención.

Según la presente invención, dicho analito inmunorreactivo no es leu-encefalina y no es met-encefalina. En un ejemplo dado a conocer, dicho analito inmunorreactivo es MR-proencefalina (MRPENK) o un fragmento de la misma que presenta por lo menos 5 aminoácidos.

Lo anterior significa en el caso de que se utilice un agente de unión en los métodos de la presente invención que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de la proencefalina (PENK) en un fluido corporal, que la expresión "determinar el nivel de proencefalina (PENK) o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto" es equivalente a "determinar el nivel de análisis inmunorreactivo mediante la utilización de por lo menos un agente de unión que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de la proencefalina (PENK) en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto". En una forma de realización específica se utiliza un agente de unión en los métodos de la presente invención que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de la proencefalina (PENK) en un fluido corporal. En una forma de realización específica, dicho agente de unión utilizado en los métodos de la presente invención no se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de la leu-encefalina o de la met-encefalina en un fluido corporal. En otra forma de realización específica de la presente invención, dicho agente de unión o agentes de unión se unen a MR-proencefalina (MRPENK) o un fragmento de la misma que presenta por lo menos 5 aminoácidos.

El término "sujeto" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un organismo vivo humano o no humano. Preferentemente en la presente memoria el sujeto es un sujeto humano. El sujeto puede estar sano o enfermo, a menos que se indique lo contrario. En una forma de realización de la invención, dicho sujeto no ha sufrido de un ictus. En otra forma de realización, dicho sujeto no es un paciente de ictus agudo.

La expresión "nivel elevado" se refiere a un nivel superior a determinado nivel umbral. El término "elevado" referido a un nivel puede significar un nivel superior a un valor que se considera que es un nivel de referencia.

La predicción o monitorización del éxito de una terapia o intervención puede ser, por ejemplo, la predicción o monitorización del éxito de la terapia sustitutiva renal utilizando la medición de proencefalina (PENK) o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.

La predicción o monitorización del éxito de una terapia o intervención puede ser, por ejemplo, la predicción o monitorización del éxito del tratamiento con ácido hialurónico en pacientes que han recibido terapia sustitutiva renal utilizando la medición de proencefalina (PENK) o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.

La predicción o monitorización del éxito de una terapia o intervención puede ser, por ejemplo, la predicción o monitorización de la recuperación de la función renal en pacientes con función renal deteriorada antes y después de la terapia sustitutiva renal y/o intervenciones farmacéuticas utilizando mediciones de PENK o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.

Puede seleccionarse un fluido corporal de entre el grupo que comprende sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo (LCE) y saliva.

La determinación de la proencefalina o fragmentos de la misma muestra la función renal en un sujeto. Una concentración incrementada de proencefalina o fragmentos de la misma indica una función renal reducida. Durante las mediciones de seguimiento, un cambio relativo en la proencefalina o fragmentos de la misma se correlaciona con una mejora (reducción de la proencefalina o fragmentos de la misma) y con el agravamiento (proencefalina o fragmentos de la misma incrementados) de la función renal del sujeto.

La proencefalina o fragmentos de la misma son diagnósticos de disfunción renal, en la que un nivel elevado superior a un umbral determinado es predictivo o diagnóstico de disfunción renal en dicho sujeto. Durante las mediciones de seguimiento, un cambio relativo de proencefalina o fragmentos de la misma se correlaciona con la mejora (reducción del nivel de proencefalina o fragmentos de la misma) y con el agravamiento (proencefalina o fragmentos de la misma incrementados) de la disfunción renal del sujeto.

La proencefalina o fragmentos de la misma son superiores en comparación con otros marcadores de diagnóstico y seguimiento de la función/disfunción renal (NGAL, creatinina sanguínea, aclaramiento de creatinina, cistatina C y urea). La superioridad se refiere a una especificidad más elevada, una sensibilidad más elevada y una mejor correlación con resultados clínicos.

La correlación de dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con un riesgo de muerte o un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que un nivel elevado superior a un umbral determinado es predictivo de un riesgo incrementado de muerte o de sucesos adversos. También en el presente aspecto, la proencefalina o fragmentos de la misma son superiores a los marcadores clínicos anteriormente indicados.

El riesgo según la presente invención se correlaciona con el riesgo tal como se define según los criterios RIFLE (Venkatamaran y Kellum, 2006).

La persona enferma puede sufrir de una enfermedad seleccionada de entre insuficiencia renal crónica causada por respuestas inmunológicas a inflamación, insuficiencia renal aguda causada por un flujo sanguíneo disminuido

que puede producirse con una presión sanguínea extremadamente baja causada por traumatismo, pacientes traumáticos, cirugía, ictus, insuficiencia renal aguda y crónica, pacientes con SIRS, sepsis, choque séptico, ictus, infarto de miocardio agudo y post-miocardio, insuficiencia cardíaca aguda y crónica, infecciones bacterianas y víricas locales y sistémicas, enfermedades autoinmunitarias, pacientes quemados, cáncer, enfermedades hepáticas, enfermedades pulmonares, pacientes que han recibido nefrotoxinas, tales como ciclosporina, antibióticos, incluyendo aminoglucósidos y fármacos anticancerosos, tales como cisplatino.

La terapia o intervención de soporte o sustitución de la función renal puede comprender diversos métodos de terapia sustitutiva renal, incluyendo, aunque sin limitación, la hemodiálisis, la diálisis peritoneal, la hemofiltración y el trasplante renal.

Un suceso adverso puede seleccionarse de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de la función renal y la enfermedad renal de estadio terminal (según los criterios RIFLE, Venkatamaran y Kellum, 2006).

La materia objeto según la presente exposición es un método en el que se determina el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos mediante la utilización de un agente de unión, por lo menos un agente de unión, de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos. En un ejemplo, dicho agente de unión se selecciona de entre el grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un andamiaje no Ig agente de unión de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos. En un ejemplo específico, dicho agente de unión o agentes de unión se unen a una región con secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En un ejemplo específico, dicho agente de unión no se une a los péptidos encefalina [Met]encefalina SEC ID nº 3 y [Leu]encefalina SEC ID nº 4. En un ejemplo específico, dicho agente de unión o agentes de unión se unen a una región con las secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende la SEC ID nº 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En otro ejemplo específico, dicho agente de unión o agentes de unión se unen a una región con secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende las SEC ID nº 2, 5, 6 y 10. En otro ejemplo muy específico, dicho agente de unión se une a proencefalina 119-159, fragmento de región intermedia de proencefalina, MRPENK.

La proencefalina presenta la secuencia siguiente:

SEC ID nº 1 (proencefalina (1-243))

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLPKSLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL
 RENSKPEESHLLAKRYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMK
 KDAEEDDSLANSDDLKELLETDGDNRRERSHHQDGSNDEEVSKRYGGFMRGLKRSPQL
 EDEAKELQKRYGGFMRRVGRPEWWMDYQKRYGGFLKRFAEALPSDEEGESYSKEVPE
 MEKRYGGF MRF

Los fragmentos de proencefalina que pueden determinarse en un fluido corporal pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo de los fragmentos siguientes:

SEC ID nº 2 (sinencefalina, proencefalina 1-73)

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLPKSLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL

RENSKPEESHLLA

SEC ID nº 3 (Met-encefalina)

YGGFM

SEC ID nº 4 (Leu-encefalina)

YGGFL

SEC ID nº 5 (proencefalina 90-109)

MDELYPMEPEEEANGSEILA

SEC ID nº 6: (pro-encefalina 119-159, fragmento de región intermedia de pro-encefalina, MRPENK)

DAEEDDSLANSDDLKELLETDGDNRRERSHHQDGSNDNEEEVS

SEC ID nº 7 (Met-enkefalina-Arg-Gly-Leu)

5 YGGFMRGL

SEC ID nº 8 (proencefalina 172-183)

SPQLEDEAKELQ

10

SEC ID nº 9 (proencefalina 193-203)

VGRPEWWMDYQ

15 SEC ID nº 10 (proencefalina 213-234)

FAEALPSDEEGESYSKEVPEME

SEC ID nº 11 (proencefalina 213-241)

20

FAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGF M

SEC ID nº 12 (Met-enkefalina-Arg-Phe)

25 YGGFMRF

La determinación del nivel de proencefalina, incluyendo Leu-enkefalina y Met-enkefalina o fragmentos de los mismos, puede referirse a que se determina la inmunorreactividad con la proencefalina o fragmentos de la misma, incluyendo Leu-enkefalina y Met-enkefalina. Un agente de unión utilizado para la determinación de proencefalina, incluyendo Leu-enkefalina o Met-enkefalina o fragmentos de los mismos, dependiendo de la región de unión puede unirse a más de una de las moléculas indicadas anteriormente. Lo anterior resulta evidente para el experto en la materia.

30

De esta manera, según la presente exposición, se determina en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto el nivel del analito inmunorreactivo mediante la utilización de por lo menos un agente de unión que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de entre el péptido y fragmentos de péptido anteriores (es decir, proencefalina (PENK) y fragmentos según cualquiera de las secuencias 1 a 12), y se correlaciona con las formas de realización específicas de relevancia clínica.

35

En una forma de realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de MRPENK (SEC ID nº 6: proencefalina 119-159, fragmento de región intermedia de proencefalina, MRPENK). En una forma de realización más específica, se determina el nivel de analito inmunorreactivo mediante la utilización de por lo menos un agente de unión que se une a MR-PENK y se correlaciona con las formas de realización anteriormente indicadas según la invención con las formas de realización específicas de relevancia clínica, por ejemplo:

40

45

- correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con la función renal en un sujeto, o:
 - (b) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con la disfunción renal, en el que un nivel elevado superior a un nivel determinado es predictivo o diagnóstico de disfunción renal en dicho sujeto, o
 - (c) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con dicho riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que un nivel elevado superior a determinado umbral es predictivo de un riesgo incrementado de dichos sucesos adversos, o
 - (d) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con el éxito de una terapia o intervención en un sujeto enfermo, en el que un nivel inferior a un umbral determinado es predictivo de éxito de la terapia o intervención.

50

55

Alternativamente, el nivel de cualquiera de los analitos anteriores puede determinarse mediante otros métodos analíticos, por ejemplo espectroscopía de masas.

60

De esta manera, se da a conocer un método para (a) diagnosticar o monitorizar la función renal en un sujeto o (b) diagnosticar la disfunción renal en un sujeto o (c) predecir o monitorizar el riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que dicho suceso adverso se selecciona de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de

65

estadio terminal o la muerte debido a disfunción renal, incluyendo insuficiencia renal, pérdida de función renal y enfermedad renal de estadio terminal o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención que comprende:

- 5
- determinar el nivel de analito inmunorreactivo mediante la utilización de por lo menos un agente de unión que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de un péptido seleccionado de entre el grupo que comprende los péptidos y fragmentos de SEC ID nº 1 a nº 12 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto, y:
- 10
- (a) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con la función renal, en un sujeto, o
- 15
- (b) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con disfunción renal, en la que un nivel elevado superior a determinado umbral es predictivo o diagnóstico de disfunción renal en dicho sujeto, o
- 20
- (c) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con dicho riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que un nivel elevado superior a un umbral determinado es predictivo de un riesgo incrementado de dichos sucesos adversos, o
- (d) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con el éxito de una terapia o intervención en un sujeto enfermo, en el que un nivel inferior a determinado umbral es predictivo de éxito de la terapia o intervención.

25

En un ejemplo específico, el nivel de analito inmunorreactivo se determina mediante la utilización de por lo menos un agente de unión que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de un péptido seleccionado de entre el grupo que comprende proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos. En un ejemplo específico, dicho agente de unión o agentes de unión se unen a una región con las secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En un ejemplo

30

específico, dicho agente de unión no se une a los péptidos de encefalina [Met]encefalina SEC ID nº 3 y [Leu]encefalina SEC ID nº 4. En un ejemplo específico, dicho agente de unión o agentes de unión se unen a una región con secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En otro ejemplo específico, dicho agente de unión o agentes de unión se unen a una región con secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende SEC ID nº 2, 5, 6 y 10. En otro ejemplo muy específico, dicho

35

agente de unión se une a proencefalina 119-159, fragmento de región intermedia de proencefalina, MRPENK. El agente de unión anteriormente indicado se une a dichos péptidos en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto.

En un ejemplo, dicho agente de unión se selecciona de entre el grupo que comprende la unión de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o andamiaje no Ig a proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5

40

aminoácidos.

En una forma de realización más específica, se determina el nivel de analito inmunorreactivo mediante la utilización de por lo menos un agente de unión que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de proencefalina 119-159, el fragmento de región intermedia de proencefalina, MRPENK (SEC ID nº 6) en un

45

fluido corporal obtenido de dicho sujeto.

En una forma de realización específica, el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma se mide con un inmunoensayo utilizando anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen a proencefalina o a fragmentos de la misma. Un inmunoensayo que puede resultar útil para determinar el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos puede comprender las etapas indicadas de manera general en el Ejemplo

50

1. Todos los umbrales y valores deben considerarse en correlación con el ensayo y calibración utilizados según el Ejemplo 1. El experto en la materia puede conocer que el valor absoluto de un umbral puede estar influido por la calibración utilizada. Lo anterior significa que todos los valores y umbrales proporcionados en la presente memoria deben considerarse dentro del contexto de la calibración utilizada en la presente memoria (Ejemplo 1).

55

Según la invención, el agente de unión diagnóstico a proencefalina se selecciona de entre el grupo que consiste en anticuerpos, por ejemplo IgG, una inmunoglobulina de tipo longitud típica o fragmentos de anticuerpo que contienen por lo menos el dominio de variable F de cadena pesada y/o ligera, tal como, por ejemplo, anticuerpos acoplados químicamente (unión de antígeno a fragmento), incluyendo, aunque sin limitación, fragmentos Fab

60

que incluyen minicuerpos Fab, anticuerpo Fab de cadena sencilla, anticuerpo Fab monovalente con etiquetas de epítipo, por ejemplo Fab-V5Sx2, Fab bivalente (minianticuerpo) dimerizado con el dominio CH3, Fab bivalente o Fab multivalente, por ejemplo formado mediante multimerización con ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo mediante dimerización de dominios dHLX, por ejemplo Fab-dHLX-FSx2, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos scFv multivalentes y/o multiespecíficos multimerizados, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos,

65

BITE® (acoplador biespecífico de células T), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo de una clase diferente de G, anticuerpos de dominio único, por ejemplo nanocuerpos derivados de inmunoglobulina

de camélidos o de peces.

En una forma de realización específica, el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma se mide con un ensayo que utiliza agentes de unión seleccionados de entre el grupo que comprende aptámeros, andamiajes no Ig tal como se describe en mayor detalle posteriormente, de unión a proencefalina o fragmentos de la misma.

El agente de unión que puede utilizarse para determinar el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma muestra una constante de afinidad para proencefalina de por lo menos 10^7 M^{-1} , preferentemente 10^8 M^{-1} , una constante de afinidad preferente superior a 10^9 M^{-1} , más preferentemente superior a 10^{10} M^{-1} . El experto en la materia conoce que puede considerarse compensar la afinidad más baja mediante la aplicación de una dosis más alta de compuestos y que esta medida no conduciría a apartarse del alcance de la invención. La afinidad de unión puede determinarse utilizando el método Biacore, ofrecido en forma de análisis como servicio, por ejemplo en Biaffin, Kassel, Alemania (<http://www.biaffin.com/de/>).

Se encuentra disponible una muestra de control de proencefalina humana en ICI-Diagnostics, Berlin, Alemania, <http://www.ici-diagnostics.com/>. El ensayo también puede calibrarse con proencefalina sintética (para los experimentos en el contexto de la presente invención se utilizó MRPENK sintético, SEC ID n° 6) o recombinante o fragmentos de la misma.

Además de anticuerpos, también es bien conocido de la técnica que otros andamiajes de biopolímero se acomplejen con una molécula diana y han sido utilizados para la generación de biopolímeros altamente específicos de diana. Son ejemplos, los aptámeros, spiegelmeros, anticalinas y conotoxinas. Los andamiajes no Ig pueden ser andamiajes proteicos y pueden utilizarse como miméticos de anticuerpo ya que son capaces de unirse a agentes de unión o antígenos. Los andamiajes no Ig pueden seleccionarse de entre el grupo que comprende andamiajes no Ig a base de tetranectina (por ejemplo descritos en el documento n° US 2010/0028995), andamiajes de fibronectina (por ejemplo descritos en la patente n° EP 1266 025; andamiajes basados en lipocalina (por ejemplo descritos en el documento n° WO 2011/154420), andamiajes de ubiquitina (por ejemplo descrito en el documento n° WO 2011/073214), andamiajes de transferencia (por ejemplo descritos en el documento n° US 2004/0023334), andamiajes de proteína A (por ejemplo, descritos en la patente n° EP 2231860), andamiajes basados en repetición de anquirina (por ejemplo, descritos en el documento n° WO 2010/060748), andamiajes de microproteínas (preferentemente microproteínas que forman un nudo de cistina) (por ejemplo descritos en la patente n° EP 2314308), andamiajes basados en dominio Fyn SH3 (por ejemplo descritos en el documento n° WO 2011/023685), andamiajes basados en el dominio EGFR-A (por ejemplo descritos en el documento n° WO 2005/040229) y andamiajes basados en dominio de Kunitz (por ejemplo descritos en la patente n° EP 1941867).

El umbral para diagnosticar enfermedad/disfunción renal o para determinar el riesgo de muerte o un suceso adverso puede ser el intervalo normal superior (percentil 99, 80 pmoles de MRPENK/L, más preferentemente 100 pmoles/l, más preferentemente 120 pmoles/l). Un intervalo umbral resulta útil entre 75 y 130 pmoles de MPRENK/L.

En una forma de realización específica, el nivel de proencefalina se mide con un inmunoensayo y dicho agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.

En una forma de realización específica, el ensayo utilizado comprende dos agentes de unión que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la proencefalina que son los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETTG, SEC ID n° 13) y los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID n° 14), en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

En una forma de realización de los ensayos para determinar proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra según la presente invención, la sensibilidad de ensayo de dicho ensayo es capaz de cuantificar la proencefalina o fragmentos de proencefalina de sujetos sanos y es $<15 \text{ pmoles/l}$, preferentemente $<10 \text{ pmoles/l}$ y más preferentemente $<6 \text{ pmoles/l}$.

Se da a conocer la utilización de por lo menos un agente de unión que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de un péptido seleccionado de entre el grupo que comprende los péptidos y fragmentos de SEC ID n° 1 a n° 12 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto en un método para (a) diagnosticar o monitorizar la función renal en un sujeto o (b) diagnosticar la disfunción renal en un sujeto o (c) predecir o monitorizar el riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que dicho suceso adverso se selecciona de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o la muerte debida a disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención. En una forma de realización de la invención, dicho agente de unión se selecciona de entre el grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un andamiaje no Ig de unión a proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos. En un

ejemplo específico, dicho agente de unión o agentes de unión se unen a una región con secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En un ejemplo específico, dicho agente de unión no se une a los péptidos de encefalina, [Met]encefalina, SEC ID nº 3 y [Leu]encefalina, SEC ID nº 4. En un ejemplo específico, dicho agente de unión o agentes de unión se unen a una región con las secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En otro ejemplo específico, dicho agente de unión o agentes de unión se unen a una región con secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende SEC ID nº 2, 5, 6 y 10. En otro ejemplo muy específico, dicho agente de unión se une a proencefalina 119-159, fragmento de región intermedia de proencefalina, MRPENK.

En un ejemplo más específico, el agente de unión o agentes de unión se unen a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de proencefalina 119-159, fragmento de región intermedia de proencefalina, MRPENK (SEC ID nº 6) en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto, más específicamente a los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) y/o los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14), en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

De esta manera, según los presentes métodos, el nivel de inmunorreactividad del agente de unión anteriormente indicado se determina en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto. El nivel de inmunorreactividad se refiere a la concentración de un analito determinado cuantitativa, semicuantitativa o cualitativamente mediante una reacción de unión de un agente de unión a dicho analito, en el que preferentemente el agente de unión presenta una constante de afinidad para la unión al analito de por lo menos 10^8 M^{-1} , y el agente de unión puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o un andamiaje no Ig, y la reacción de unión es un inmunoensayo.

Los presentes métodos utilizando PENK y fragmentos del mismo, especialmente MRPENK, son muy superiores a los métodos y biomarcadores utilizados en la técnica anterior para (a) el diagnóstico o monitorización de la función renal en un sujeto o (b) el diagnóstico de la disfunción renal en un sujeto o (c) la predicción o monitorización del riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que dicho suceso adverso se selecciona de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o la muerte debida a disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de la función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o (d) la predicción o monitorización del éxito de una terapia o intervención. En primer lugar, PENK y fragmentos del mismo como biomarcador para los usos anteriormente indicados es un marcador independiente de la inflamación. Ésta es una característica importante, ya que la mayoría de los biomarcadores renales conocidos, tales como NGAL y KIM, son dependientes de la inflamación, lo que significa que, si el sujeto presenta una inflamación, por ejemplo en la sepsis, la elevación de NGAL o KIM puede deberse a la inflamación o puede deberse a la función/disfunción renal. De esta manera, no puede llevarse a cabo ningún diagnóstico diferencial, por lo menos no mediante la utilización de un simple valor de corte (es decir un (1) valor de corte), que sea independiente de la población de pacientes particular investigada. Para NGAL y KIM, todos y cada uno de los pacientes presenta un umbral "individual" de función/disfunción renal dependiente del estado de inflamación de dicho sujeto que convierte en difícil la aplicación clínica de dichos marcadores renales en algunas enfermedades e imposible en otras. En contraste con lo anterior, puede utilizarse según los presentes métodos un único umbral que es independiente del estado de inflamación del sujeto para todos los sujetos. Lo anterior permite que los presentes métodos resulten adecuados para la rutina clínica en contraste con el marcador anteriormente indicado.

PENK y fragmentos del mismo como biomarcador en los métodos de la presente invención, especialmente MRPENK, reflejan la función renal "real", en contraste con NGAL y KIM, que reflejan daños e inflamación renales.

De esta manera, la materia objeto de la presente invención es un método para (a) diagnosticar o monitorizar la función renal en un sujeto o (b) diagnosticar la disfunción renal en un sujeto o (c) predecir o monitorizar el riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que dicho suceso adverso se selecciona de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o la muerte debida a disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención según se define en las reivindicaciones con las etapas y características anteriormente indicadas, en las que se utiliza un umbral independiente del estado de inflamación.

Otra ventaja de los métodos anteriormente indicados y la utilización de PENK y fragmentos como biomarcador en los métodos para (a) diagnosticar o monitorizar la función renal en un sujeto o (b) diagnosticar la disfunción renal en un sujeto o (c) predecir o monitorizar el riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que dicho suceso adverso se selecciona de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o la muerte debida a disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención, es que PENK y fragmentos como biomarcador son biomarcadores muy tempranos de la función renal, disfunción renal, riesgo de un suceso adverso, o éxito de una terapia o intervención. Son medios muy tempranos, por ejemplo más tempranos que la

creatinina y más tempranos que NGAL.

Una indicación clara de la superioridad de PENK sobre la creatinina procede del análisis de la asociación de las concentraciones respectivas determinadas en pacientes críticos el día de ingreso con su tasa de mortalidad a los 7 días: las concentraciones de PENK de los supervivientes difieren significativamente de los no supervivientes, mientras que éste no es el caso para la aclaramiento de la creatinina. La mortalidad en dicha población de pacientes está regulada principalmente por la pérdida de la función renal. De esta manera, la asociación significativa y mucho más fuerte de PENK con la mortalidad que el aclaramiento de la creatinina apoya la superioridad de PENK sobre el aclaramiento de la creatinina como marcador de disfunción renal.

Se da a conocer un método para (a) diagnosticar o monitorizar la función renal en un sujeto o (b) diagnosticar la disfunción renal en un sujeto o (c) predecir o monitorizar el riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que dicho suceso adverso se selecciona de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o la muerte debida a disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal de estadio terminal o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención de soporte o sustitución de la función renal que comprende diversos métodos de terapia sustitutiva renal, incluyendo, aunque sin limitación, la hemodiálisis, la diálisis peritoneal, la hemofiltración y el trasplante renal según cualquiera de las formas de realización anteriores, en los que el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto solos o junto con otros parámetros de laboratorio o clínicos útiles para el pronóstico que pueden seleccionarse de entre las alternativas siguientes:

- comparación con la mediana del nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",
- comparación con un cuantil del nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",
- cálculo basado en el análisis de riesgos proporcionales de Cox o mediante la utilización de cálculos del índice de riesgo, tal como el NRI (índice de reclasificación neta) o el IDI (índice de discriminación integrada).

Adicionalmente, dicho parámetro o parámetros clínicos pueden determinarse seleccionados de entre el grupo que comprende: edad, NGAL, cistatina C, aclaramiento de creatinina, creatinina, urea y puntuación APACHE.

En un ejemplo de la invención, dicho método se lleva a cabo más de una vez con el fin de monitorizar la función o disfunción o riesgo de dicho sujeto o con el fin de monitorizar el curso de tratamiento renal y/o de la enfermedad. En un ejemplo específico, dicha monitorización se lleva a cabo con el fin de evaluar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas adoptadas.

En un ejemplo, el método se utiliza con el fin de estratificar dichos sujetos en grupos de riesgo.

Se da a conocer además un ensayo para determinar la proencefalina y fragmentos de proencefalina en una muestra que comprende dos agentes de unión que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la proencefalina que son los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) y los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14), en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

En un ejemplo de los ensayos para determinar la proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, la sensibilidad de ensayo de dicho ensayo es capaz de cuantificar la proencefalina o fragmentos de proencefalina de sujetos sanos y es <15 pmoles/l, preferentemente <10 pmoles/l y más preferentemente <6 pmoles/l.

En un ejemplo de los ensayos para determinar la proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra según la presente invención, dicho agente de unión muestra una afinidad de unión para la proencefalina de por lo menos 10^7 M^{-1} , preferentemente 10^8 M^{-1} , la constante de afinidad preferente es inferior a 10^9 M^{-1} , más preferentemente es inferior a 10^{10} M^{-1} . Un experto en la materia conoce que puede considerarse compensar la afinidad más baja mediante la aplicación de una dosis más alta de compuestos y que esta medida no conduciría a apartarse del alcance de la invención, la afinidad de unión puede determinarse tal como se ha indicado anteriormente.

En una forma de realización de la invención puede ser un denominado ensayo POC (análisis de diagnóstico inmediato ("point of care")), que es una tecnología de ensayo que permite llevar a cabo el ensayo a menos de 1 hora del paciente sin necesidad de un sistema de ensayo totalmente automatizado. Un ejemplo de dicha tecnología es la tecnología de ensayo inmunocromatográfica.

De esta manera, la invención proporciona un dispositivo de análisis de diagnóstico inmediato para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicho dispositivo de análisis de diagnóstico inmediato comprende por lo menos dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos a los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETTG, SEC ID nº 13) y a los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14).

En un ejemplo, dicho ensayo es un inmunoensayo de tipo sándwich que utiliza cualquier tipo de tecnología de detección, incluyendo, aunque sin limitación, marcajes enzimáticos, marcajes quimioluminiscentes, marcajes electroquimioluminiscentes, preferentemente un ensayo totalmente automatizado. En una forma de realización de la invención, dicho ensayo es un ensayo de tipo sándwich con marcaje enzimático. Los ejemplos de ensayo automatizado o totalmente automatizado comprenden ensayos que pueden utilizarse para uno de los sistemas siguientes: Elecsys® de Roche, Architect® de Abbott, Centauer® de Siemens, Kryptor® de Brahms, Vidas® de Biomerieux y Triage® de Alere.

Se conoce una diversidad de inmunoensayos y pueden utilizarse para los ensayos y métodos de la presente invención; entre ellos se incluyen: radioinmunoensayos ("RIA"), inmunoensayos multiplicados por enzimas homogéneos ("EMIT"), ensayos de inmunoadsorción ligada a enzima ("ELISA"), inmunoensayo de reactivación de apoenzima ("ARIS"), inmunoensayos de tira reactiva y ensayos de inmunocromatografía.

En una forma de realización de la invención, por lo menos uno de dichos dos agentes de unión se marca con el fin de poder ser detectado.

Los métodos de detección preferentes comprenden inmunoensayos en diversos formatos, tales como, por ejemplo, el radioinmunoensayo (RIA), los inmunoensayos de quimioluminiscencia y de fluorescencia, los inmunoensayos ligados a enzima (ELISA), matrices de perlas basadas en Luminex, ensayos de micromatrices de proteínas y formatos de ensayo rápido, tales como, por ejemplo, ensayos de tira inmunocromatográfica.

En una forma de realización preferida, dicho marcaje se selecciona de entre el grupo que comprende un marcaje quimioluminiscente, un marcaje enzimático, un marcaje fluorescente y un marcaje de yodo radioactivo.

Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, y pueden ser ensayos competitivos o no competitivos. En un ejemplo, el ensayo presenta la forma de un ensayo de tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en el que la molécula que debe detectarse y/o cuantificarse se une a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede unirse a una fase sólida, por ejemplo una perla, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que se marca con, por ejemplo, un pigmento, un isótopo radioactivo o una fracción reactiva o catalíticamente activa. La cantidad de anticuerpo marcado que se une al analito seguidamente se mide mediante un método apropiado. La composición general y procedimientos implicados en los "ensayos de tipo sándwich" se encuentran bien establecidos y son conocidos por el experto en la materia (23).

En otro ejemplo, el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferentemente anticuerpos que se encuentran presentes ambos en forma de dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en la que se une un primer componente de marcaje a la primera molécula de captura, en la que dicho primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado en la desactivación o amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia, y se une un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje a la segunda molécula de captura, de manera que tras la unión de ambas moléculas de captura al analito, se genera una señal medible que permite la detección de los complejos de tipo sándwich formados en la solución que comprende la muestra.

En otra forma de realización, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierra rara o quelatos de tierra rara en combinación con un pigmento fluorescente o pigmento quimioluminiscente, en particular un pigmento del tipo cianina.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia comprenden la utilización de pigmentos, que pueden, por ejemplo, seleccionarse de entre el grupo que comprende FAM (5- o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), IRD-700/800, pigmentos de cianina, tales como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G (RG6), rodamina, verde rodamina, rojo rodamina y rodamina 110; pigmentos BODIPY, tales como BODIPY TMR; verde Oregon; coumarinas, tales como la umbeliferona; bencimidias, tales como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como rojo Texas, amarillo Yakima, Alexa Fluor, PET y bromuro de etidio; pigmentos de acridinio, pigmentos de carbazol, pigmentos de fenoxazina, pigmentos de porfirina, pigmentos de polimetina y similares.

En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en la quimioluminiscencia comprenden la utilización de pigmentos, basados en los principios físicos descritos para materiales quimioluminiscentes en (24). Los pigmentos quimioluminiscentes preferidos son los ésteres de acridinio.

Tal como se ha indicado en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Dicho ensayo puede estar basado en la unión de un analito que debe detectarse a una o más sondas de captura con una afinidad determinada. Respecto a la interacción entre moléculas de captura y moléculas diana o moléculas de interés, la constante de afinidad preferentemente es superior a 10^8 M⁻¹.

En el contexto de la presente invención, las "moléculas de agente de unión" son moléculas que pueden utilizarse para ligarse a moléculas diana o moléculas de interés, es decir, analitos (es decir, en el contexto de la presente invención, PENK y fragmentos del mismo) en una muestra. De esta manera, las moléculas de agente de unión pueden conformarse de manera adecuada, tanto espacialmente como en términos de las características superficiales, tales como la carga superficial, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, la presencia o ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para la unión específicamente a las moléculas diana o de interés. En la presente invención, la unión puede encontrarse mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, de van-der-Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrofóbicas o de enlace de hidrógeno, o una combinación de dos o más de las interacciones anteriormente indicadas entre las moléculas de captura y las moléculas diana o las moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, las moléculas de agente de unión pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que comprende una molécula de ácidos nucleicos, una molécula de carbohidrato, una molécula de PNA, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glucoproteína. Preferentemente, las moléculas de agente de unión son anticuerpos, incluyendo fragmentos de los mismos con afinidad suficiente para una diana o molécula de interés, e incluyen anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpos recombinantes, así como derivados modificados química y/o bioquímicamente de dichos anticuerpos o fragmentos derivados de la cadena variante con una longitud de por lo menos 12 aminoácidos de la misma.

El marcaje quimioluminiscente puede ser un marcaje de éster de acridinio, marcajes de esteroide que implican marcajes de isoluminol y similares.

Los marcajes enzimáticos pueden ser lactato deshidrogenasa (LDH), creatinquinasa (CPK), fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa ácida, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y similares.

En una forma de realización de la invención, por lo menos uno de dichos dos agentes de unión se une a una fase sólida, tal como partículas magnéticas y superficies de poliestireno.

En un ejemplo de los ensayos para determinar proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, dicho ensayo es un ensayo de tipo sándwich, preferentemente un ensayo totalmente automatizado. Puede ser un ELISA totalmente automatizado o manual. Puede ser un denominado ensayo POC (análisis de diagnóstico inmediato). Los ejemplos de ensayo automatizado o totalmente automatizado comprenden ensayos que pueden utilizarse para uno de los sistemas siguientes: Elecsys® de Roche, Architect® de Abbott, Centauer® de Siemens, Kryptor® de Brahms, Vidas® de Biomerieux y Triage® de Alere. Se han proporcionado ejemplos de formatos de ensayo anteriormente.

En un ejemplo de los ensayos para determinar proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, por lo menos uno de dichos dos agentes de unión se marca con el fin de ser detectado. Se han proporcionado ejemplos de marcajes anteriormente.

En un ejemplo de los ensayos para determinar proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, por lo menos uno de dichos dos agentes de unión se une a una fase sólida. Se han proporcionado ejemplos de fases sólidas anteriormente.

En un ejemplo de los ensayos para determinar proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, dicho marcaje se selecciona de entre el grupo que comprende un marcaje quimioluminiscente, un marcaje enzimático, un marcaje fluorescente y un marcaje de yodo radioactivo.

En una forma de realización, la materia objeto de la presente invención es un dispositivo de análisis de diagnóstico inmediato para llevar a cabo un método según la invención, en el que dicho dispositivo de análisis de diagnóstico inmediato comprende por lo menos dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos a los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) y a los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14).

En una forma de realización, la materia objeto de la presente invención es un kit para llevar a cabo un método según la invención, en el que dicho kit comprende por lo menos dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos a los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) y los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14).

Ejemplos**Ejemplo 1**5 Desarrollo de los anticuerposPéptidos

Se sintetizaron los péptidos (JPT Technologies, Berlin, Alemania).

10

Péptidos/conjugados para la inmunización:

Los péptidos para la inmunización se sintetizaron (JPT Technologies, Berlin, Alemania) con un residuo N-terminal adicional de cisteína para la conjugación de los péptidos a albúmina de suero bovino (BSA). Los péptidos se unieron covalentemente a BSA mediante la utilización de sulfuro-SMCC (Perbio-science, Bonn, Alemania). El procedimiento de acoplamiento se llevó a cabo siguiendo el manual de Perbio.

15

Tabla 1:

Péptido para la inmunización	Secuencia de proencefalina
(C)DAEEDD	119-125
(C)EEDDSLANSDDLK	121-134
(C)LKELLETG	133-140
(C)TGDNRERSHHODGSDNE	139-155
(C)SDNEEEVS	152-159

20

Los anticuerpos se generaron siguiendo el método a continuación:

Se inmunizó un ratón BALB/c con 100 µg de conjugado de péptido-BSA los días 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante de Freund completo) y 50 µg los días 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante de Freund incompleto). Tres días antes de llevar a cabo el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg del conjugado disuelto en 100 µl de solución salina, administrada como una inyección intraperitoneal y una inyección intravenosa.

25

Se fusionaron esplenocitos del ratón inmunizado y las células de la línea celular de mieloma SP2/0 se fusionaron con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37°C. Tras el lavado, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se seleccionaron clones híbridos mediante el cultivo en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 20% y suplemento HAT]. Tras dos semanas, el medio HAT se sustituye por medio HT durante tres pases seguido del retorno al medio de cultivo celular normal.

30

Los sobrenadantes de cultivo celular se sometieron a un cribado primario para anticuerpos IgG específicos de antígeno tres semanas después de la fusión. Los microcultivos con resultado positivo en el ensayo se transfirieron a placas de 24 pocillos para la propagación. Tras someter nuevamente a ensayo los cultivos seleccionados se clonaron y se reclonaron utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos.

35

(Lane R.D., "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81:223-228, 1985; Ziegler B. et al., "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28: 11-15, 1996).

40

45 Producción de anticuerpos monoclonales

Se produjeron los anticuerpos mediante métodos estándares de producción de anticuerpos (Marx et al., Monoclonal Antibody Production, ATLA 25:121, 1997) y se purificaron mediante cromatografía de proteína A. Las puridades de anticuerpos eran >95% según el análisis de electroforesis en gel de SDS.

50

Marcaje y recubrimiento con anticuerpos

Todos los anticuerpos se marcaron con éster de acridinio según el procedimiento a continuación:

55

compuesto marcado (trazador): se mezclaron 100 µg (100 µl) de anticuerpo (1 mg/ml en PBS, pH 7,4) con 10 µl de éster de NHS de acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (patente nº EP 0353971) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. El anticuerpo marcado se purificó mediante HPLC de filtración en gel en un aparato Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). El anticuerpo marcado y purificado se diluyó en (fosfato de potasio 300 mmoles/l, NaCl 100 mmoles/l, Na-EDTA 10 mmoles/l, 5 g/l de albúmina de

suero bovino, pH 7,0). La concentración final era de aproximadamente 800.000 unidades relativas de luz (RLU) de compuesto marcado (aprox. 20 ng de anticuerpo marcado) por cada 200 µl. Se midió la quimioluminiscencia de éster de acridinio mediante la utilización de un aparato AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

5

Anticuerpo en fase sólida (anticuerpo recubierto):

Fase sólida: se recubrieron tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) (18 h a temperatura ambiente) con anticuerpo (1,5 µg de anticuerpo/0,3 ml de NaCl 100 mmoles/l, Tris/HCl 50 mmoles/l, pH 7,8). Tras el bloqueo con albúmina de suero bovino al 5%, los tubos se lavaron con PBS, pH 7,4 y se secaron al vacío.

10

Especificidad de los anticuerpos

Tabla 2:

15

Péptido para la inmunización	Secuencia de pre-proencefalina	Nombre del anticuerpo
(C)DAEEDD	119-125	NT-MRPENK
(C)EEDDSLANSDDLK	121-134	NM-MRPENK
(C)LKELLETG	133-140	MR-MRPENK
(C)TGDNRERSHHQDGSNE	139-155	MC-MRPENK
(C)SDNEEEVS	152-159	CT-MRPENK

Se determinaron las reactividades cruzadas de los anticuerpos de la manera siguiente:

se introdujo mediante pipeteado 1 µg de péptido en 300 µl de PBS, pH 7,4, en tubos de poliestireno y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, los tubos se lavaron 5 veces (1 ml cada vez) utilizando BSA al 5% en PBS, pH 7,4. Se añadió cada uno de los anticuerpos marcados (300 µl en PBS, pH 7,4, 800.000 RLU/300 µl) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar 5 veces (cada vez con 1 ml de solución de lavado (PBS 20 mmoles/l, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%)), se cuantificó la luminiscencia restante (anticuerpo marcado) utilizando un aparato AutoLumat Luminometer 953. Se utilizó el péptido MRPENK como sustancia de referencia (100%).

20

25

Las reactividades cruzadas de los diferentes anticuerpos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3:

Anticuerpo	DAEEDD	EEDDSLANSDDLK	LKELLETG	TGDNRERSHHQDGDNE	SDNEEEVS	MRPENK (SEC ID n° 6)
NT-MRPENK	121	10	<1	<1	<1	100
NM-MRPENK	<1	98	<1	<1	<1	100
MR-MRPENK	<1	<1	105	<1	<1	100
MC-MRPENK	<1	<1	<1	115	<1	100
CT-MRPENK	<1	<1	<1	<1	95	100

Todos los anticuerpos se unieron al péptido MRPENK, de manera comparable a los péptidos que se utilizaron para la inmunización. Excepto el anticuerpo de NT-MRPENK (reacción cruzada de 10% con EEDDSLANSDDLK), ningún anticuerpo mostró una reacción cruzada con los fragmentos de MR-PENK no utilizados para la inmunización del anticuerpo individual.

5

Inmunoensayo de proencefalina:

Se introdujeron mediante pipeteado 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos recubiertos, tras la adición de anticuerpo marcado (200 µl), los tubos se incubaron durante 2 h a una temperatura de entre 18°C y 25°C. Se eliminó el trazador no unido mediante lavado 5 veces (1 ml cada vez) con solución de lavado (PBS 20 mmoles/l, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%). Se midió el anticuerpo marcado unido al tubo mediante la utilización de un aparato Luminometer 953 utilizando una concentración fija de 1.000 pmoles/l de MRPENK. Las proporciones de señal (RLU con 1.000 pmoles de MRPENK/l) a ruido (RLU sin MRPENK) de diferentes combinaciones de anticuerpos se proporcionan en la Tabla 4. Todos los anticuerpos pudieron generar un complejo de tipo sándwich con cualquier otro anticuerpo. Inesperadamente, la proporción de señal a ruido más fuerte (mejor sensibilidad) se generó mediante la combinación del anticuerpo de MR-MRPENK y de CT-MRPENK. A continuación, los presentes inventores utilizaron dicha combinación de anticuerpos para llevar a cabo el inmunoensayo de MRPENK para investigaciones adicionales. Se utilizó el anticuerpo de MR-MRPENK como anticuerpo de tubo recubierto y se utilizó el anticuerpo de CT-MRPENK como anticuerpo marcado.

20

Tabla 4:

	Anticuerpo en fase sólida	NT-MRPENK	NM-MRPENK	MR-MRPENK	MC-MRPENK	CT-MRPENK
Anticuerpo marcado						
NT-MRPENK		/	27	212	232	<1
NM-MRPENK		36	/	451	487	<1
MR-MRPENK		175	306	/	536	1050
MC-MRPENK		329	577	542	/	<1
CT-MRPENK		<1	615	1117	516	/

Calibración:

25

Se calibró el ensayo utilizando diluciones de MRPENK sintético, se diluyó en K₂PO₄ 20 mM, EDTA 6 mM, BSA al 0,5%, amastatina 50 µM, leupeptina 100 µM, pH 8,0. Se encuentra disponible plasma con proencefalina de control de ICI-diagnostics, Berlin, Alemania.

30 La figura 1 muestra una curva de dosis/señal de proencefalina típica.

La sensibilidad del ensayo era de 20 determinaciones de calibrador de 0 (sin adición de MRPENK + 2SD) 5,5 pmoles/l.

Aclaramiento de creatinina

Se determinó el aclaramiento de creatinina utilizando la fórmula MDRD (ver Levey et al., 2009).

Ejemplo 2:

40

PENK en sujetos sanos

Se realizaron mediciones en sujetos sanos (n=4.211, promedio de edad: 56 años) utilizando el ensayo de MRPENK. El valor medio era de 44,7 pmoles de MRPENK/l; el valor más bajo era de 9 pmoles/l y el percentil 99 era de 80 pmoles/l. Debido a que la sensibilidad del ensayo era de 5,5 pmoles/l, el 100% de todos los sujetos sanos eran detectable utilizando el ensayo de MRPENK descrito (ver la fig. 2).

45

La proencefalina se correlacionaba con el aclaramiento de creatinina en sujetos sanos con función renal normal.

50 Inesperadamente, la proencefalina se encontraba correlacionada negativamente con el aclaramiento de creatinina en sujetos sanos ($r=-0,33$, $p<0,0001$), ver la fig. 3. El coeficiente de correlación era ligeramente más fuerte en varones que en mujeres ($r=-0,34$ frente a $-0,29$, ambos $p<0,0001$). Estos datos indican una fuerte asociación entre PENK y función renal.

55 Figura 3: correlación entre aclaramiento de creatinina y PENK en sujetos sanos. Eje y: cuartiles de aclaramiento de creatinina; eje x: cuartiles de PENK.

Ejemplo 3:

Correlación de PENK y función renal (aclaramiento de creatinina) en pacientes con enfermedades crónicas y agudas

Tabla 5:

Enfermedad	Valor de r	Valor de p
Insuficiencia cardiaca crónica N=122	-0,55	<0,0001
Insuficiencia cardiaca aguda N=149	-0,68	<0,0001
Infarto agudo de miocardio N=78	-0,82	<0,0001
Sepsis N=101	-0,74	<0,0001
SIRS N=109	-0,79	<0,0001

PENK se correlacionaba en todos los casos significativamente con el aclaramiento de creatinina; en enfermedades agudas la correlación era más fuerte que en enfermedades crónicas o en sujetos sanos.

Ejemplo 4: PENK en pacientes críticamente enfermos

Con el fin de investigar el rendimiento diagnóstico de PENK para el diagnóstico de la insuficiencia renal en contextos clínicos agudos, los presentes inventores llevaron a cabo el estudio clínico siguiente:

Estudio clínico

Se hospitalizaron 101 pacientes de urgencias que satisfacían la definición de sepsis (Crit. Care Med. 36(1):296-327, enero de 2008) (media de 5 días de hospitalización) y recibieron un tratamiento de estándar de cuidado. Se generó EDTA-plasma a partir del día 1 (presentación en el servicio de urgencias) y una muestra cada día durante la estancia hospitalaria. El tiempo hasta la congelación de las muestras para la medición posterior de analitos fue inferior a 4 h.

Se resumen las características de los pacientes en la Tabla 6.

Tabla 6:

Variable	Total (n=101)	Muertes hospitalarias (n=27)	Altas hospitalarias (n=74)	Valor de p
Datos poblacionales				
Género - masculino	60 (60)	13 (48)	47 (64)	0,163
Edad - mediana [IQR]	78 [72-72]	77 [71,25-83]	80 [75-84,5]	0,142
Variables del examen				
Presión sistólica (mmHg) - mediana [IQR]	115 [100-100]	120 [106,25-138,75]	105 [80-120]	0,001
Presión diastólica (mmHg) - mediana [IQR]	65 [60-60]	65 [60-85]	60 [50-70]	0,002
HR - mediana [IQR]	100 [94-94]	100 [94-114,75]	100 [93,5-107,5]	0,407
RR - mediana [IQR]	24 [22-22]	24 [22-28]	26 [24-28]	0,069
MAP (mmHg) - mediana [IQR]	83,3 [74-74]	83,3 [77,62-100,75]	81,6 [63,5-89]	0,026
Enfermedades concomitantes				
Cardiovasculares - sí	26 (25,7)	9(33,3)	17 (23)	0,311
Hipertensivas - sí	47 (46,5)	13 (48,1)	34 (45,9)	1,000
Diabetes - sí	35 (34,7)	9 (33,3)	26 (35,1)	1,000
Cáncer - sí	13 (12,9)	3 (11,1)	10 (13,5)	1,000
Variables rutinarias de laboratorio				
Hemocultivo - sí	31 (31)	5 (19)	26 (35)	0,246
negativo	15 (16,3)	2 (8)	13 (19,4)	
positivo	16 (17,4)	3 (12)	13 (19,4)	
Aclaramiento de creatinina (ml/min)	48 [23,25-	56 [29,25-80]	31,5 [14,75-66]	0,043

- mediana [IQR]	23,25]			
Creatinina - mediana [IQR]	1,3 [0,9-0,9]	1,25 [0,9-2,08]	1,8 [1-3,15]	0,080
UREA - mediana [IQR]	36 [21-21]	31,5 [20-53,25]	51 [42-87]	0,004
GCS - mediana [IQR]	15 [10-10]	15 [12,5-15]	8 [8-11]	<0,001
Pcr - mediana [IQR]	16 [6,6-6,6]	14,5 [6,7-23,7]	17,35 [6,6-28,05]	0,846
Gluco - mediana [IQR]	113,5 [94,5-94,5]	110 [95,5-144]	128 [94-160,5]	0,400
biliru - mediana [IQR]	0,9 [0,71-0,71]	0,9 [0,7-1,03]	0,91 [0,77-1,18]	0,534
GR - mediana [IQR]	3,8 [3,3-3,3]	3,8 [3,2-4,3]	3,7 [3,4-4,2]	0,684
GB - mediana [IQR]	12700 [6774-6774]	13100 [8115-17565]	11920 [25,55-18790]	0,343
PLT - mediana [IQR]	213 [150-150]	217 [154,75-301]	185 [130-236,5]	0,113
HCT - mediana [IQR]	32 [28-28]	31,5 [28-37]	34 [31,25-39,5]	0,149
Leuco/Neutr (%) - mediana [IQR]	87 [80-80]	86 [78,25-89,95]	91 [87-93,05]	0,001
HB - mediana [IQR]	10,4 [9,47-9,47]	10,15 [9,3-12,4]	10,85 [9,9-12,67]	0,220
Na - mediana [IQR]	137 [134-134]	137 [133-141]	139 [134-144,5]	0,204
K - mediana [IQR]	3,9 [3,5-3,5]	3,9 [3,6-4,3]	3,9 [3,3-5,1]	0,982
INR - mediana [IQR]	1,19 [1,1-1,1]	1,19 [1,1-1,4]	1,18 [1,04-1,36]	0,731
TC - mediana [IQR]	38,4 [36-36]	38,5 [38,12-38,7]	36 [35,55-38,5]	<0,001
SAO2 - mediana [IQR]	94 [90-90]	95 [90,25-97]	93 [88,5-95,5]	0,119
pH - mediana [IQR]	7,45 [7,38-7,38]	7,46 [7,4-7,5]	7,4 [7,24-7,4]	<0,001
PO2 - mediana [IQR]	67 [56-56]	66,5 [56-78]	67 [56,5-79,5]	0,806
PCO2 - mediana [IQR]	36 [32-32]	37,5 [33-43,75]	34 [30-41]	0,245
Lact - mediana [IQR]	1,5 [1-1]	1,3 [0,83-1,9]	2,5 [1,4-4,15]	<0,001
Bic - mediana [IQR]	23,5 [21-21]	24,25 [21,43-28]	21 [17,35-23,25]	0,001
FiO2 (%) - mediana [IQR]	21 [21-21]	21 [21-23,25]	24 [21-45]	<0,001
otros				
Disfunción orgánica aguda - sí	39 (43,3)	16 (64)	23 (35,4)	0,021
Puntuación APACHE (%) - mediana [IQR]	19 [12,5-12,5]	14,65 [12,12-20,38]	32 [20-39]	<0,001
Días de hospitalización - mediana [IQR]	5 [2-2]	6 [4-7]	2 [1-6]	0,003
Tratamiento inicial				
Diuresis (cc) - mediana [IQR]	900 [600-600]	1000 [700-1200]	450 [200-1025]	<0,001
Esteroides - sí	16 (15,8)	4 (14,8)	12 (16,2)	1,000
Vasopresores - sí	18 (17,8)	13 (48,1)	5 (6,8)	<0,001
Antibióticos - sí	101 (100)	27 (100)	74 (100)	1,000
Terapia de fluidos - sí	101 (100)	27 (100)	74 (100)	1,000

El 26,7% de los pacientes murió durante la estancia hospitalaria y se ha contado como no respondedor al tratamiento; el 73,3% de los pacientes sobrevivió a la sepsis y se ha contado como respondedor al tratamiento.

- 5 El 53% de los pacientes que presentaba sepsis presentaba un valor de PENK no normal >80 pmoles/l (percentil 99), indicando que PENK no es un marcador de la infección.

Resultados del estudio clínico

- 10 PENK se correlacionaba fuertemente con el aclaramiento de creatinina ($r=-0,74$, $p<0,0001$, fig. 4).

PENK diagnostica la disfunción renal:

- 15 Se definió la disfunción renal basándose en los criterios RIFLE (Venkatamaran y Kellum, 2007). Se contaron los pacientes como disfunción renal en el caso de que se satisficiera cualquiera de los factores de clasificación de RIFLE. En la cohorte del estudio, los presentes inventores determinaron RIFLE en 90 sujetos el día 1 (presentación en el servicio de urgencias), 39 pacientes satisfacían la clasificación RIFLE (presentaba riesgo de enfermedad renal, lesión renal, insuficiencia renal, pérdida de función renal o enfermedad renal de estadio terminal) y 51 pacientes no presentaban disfunción renal. Una PENK incrementada se correlacionaba significativamente ($p\leq 0,0001$) con disfunción renal (AUC: 0,868) (figuras 5 y 6).

Con el fin de comparar el valor diagnóstico de disfunción renal, los presentes inventores utilizando NGAL como

marcador de referencia (Soni et al., 2010). Se midió NGAL utilizando un ELISA comercial (kit ELISA NGAL, Bioporto, Gentofte, Dinamarca).

5 NGAL, al igual que PENK, se encontraba significativamente incrementado en pacientes con disfunción renal ($p < 0,0001$); el AUC para el diagnóstico de disfunción renal era de 0,809 (figuras 7 y 8).

10 La comparación de PENK y NGAL demostró una fuerte superioridad de PENK vs. NGAL para el diagnóstico de la disfunción renal: el valor de Chi2 de PENK era de 45,32 frente a 32,21 para NGAL, indicando una mejora de 40% en la calidad diagnóstica (especificidad y sensibilidad) para PENK (Tabla 7).

10 Tabla 7:

Modelo	N	Sucesos	Chi2 del modelo	d.f.	LR. valor de p	Índice C [IC al 95%]
PCT	76	34	13,02	1	0,00031	0,721 [0,602,0,839]
Apache	90	39	28,58	1	<0,00001	0,778 [0,681,0,874]
NGal	90	39	32,21	1	<0,00001	0,809 [0,723,0,896]
PENK	90	39	45,32	1	<0,00001	0,868 [0,796,0,94]

15 La PENK inicial es altamente pronóstica

15 Los presentes inventores encontraron una correlación entre el valor inicial de PENK y la mortalidad hospitalaria y compararon la PENK con la puntuación de sepsis de APACHE 2 (ver Knaus et al., 1985, 2001) y el aclaramiento de creatinina. PENK es altamente pronóstica de un resultado de sepsis (ver la fig. 9) y comparable a la puntuación de APACHE 2 (AUC/índice C: 0,744 (PENK) y 0,783 (Apache)). Al combinar PENK y APACHE 2 se obtenía una información adicional significativa (AUC combinada: 0,794, fig. 10). PENK era un predictor sustancialmente más fuerte del pronóstico que el aclaramiento de creatinina (AUC 0,638). Inesperadamente, el valor pronóstico de PENK era más fuerte después del primer día de tratamiento de UCI (AUC 0,79).

25 Análisis de valores de corte para el pronóstico de muerte hospitalaria utilizando la muestra inicial y 1 muestra posterior al día 1 de tratamiento de UCI.

30 Debido a que el poder pronóstico de PENK mejoraba adicionalmente un día después de iniciar el tratamiento de UCI, los presentes inventores analizaron PENK en mediciones en serie del día anterior al tratamiento de UCI y 1 día después de iniciar el tratamiento de UCI. Con el fin de ilustrar el rendimiento clínico, los presentes inventores utilizaron un análisis simple de valores de corte en un valor de corte de 100 pmoles/l.

35 En pacientes bajo el nivel de corte en el momento de presentación en el hospital y que permanecían bajo el nivel de corte después de iniciar el tratamiento de UCI, la mortalidad era de 11% (bien tratados antes y durante la hospitalización). En el caso de que PENK se encontrase sobre el nivel de corte en ambos puntos temporales, la mortalidad era aproximadamente 5 veces superior (52,5%) (no respondedor al tratamiento) y en el caso de que los pacientes se presentasen con valores de PENK superiores a 100 pmoles/l y con la reducción de sus niveles de PENK a valores inferiores a 100 pmoles/l durante el tratamiento de UCI, la mortalidad era de 0 (respondedor al tratamiento). Estos datos indican una fuerte asociación entre PENK y éxito del tratamiento, apoyando su utilización para el seguimiento de la terapia (ensayo en serie).

40 Tabla 8:

	mortalidad	N pacientes muertos vs todos
PENK > 100 pmoles/l en la presentación y primer día después del tratamiento de UCI	52,5%	21/40
PENK > 100 pmoles/l en la presentación y < 100 pmoles/l el primer día después del tratamiento de UCI	0%	0/7
PENK < 100 pmoles/l en la presentación y el primer día de tratamiento de UCI	11%	6/54

45 Figura 11 a-d: ejemplos de mediciones de seguimiento de los pacientes.

- 50
- a) Un paciente (superviviente) presentaba una PENK inicial <100 pmoles/l y se mantuvo <100 pmoles/l durante la estancia hospitalaria.
 - b) Un paciente (murió durante la estancia hospitalaria) presentaba una PENK inicial >100 pmoles/l y no se redujo a valores <100 pmoles/l.
 - c) Un paciente (murió durante la estancia hospitalaria) presentaba una PENK inicial >100 pmoles/l y no se

redujo a valores <100 pmoles/l.

- d) Un paciente (superviviente) con PENK inicial >100 pmoles/l; el valor de PENK cayó a valores <100 pmoles/l en un día de tratamiento de UCI.

5

Ejemplo 5: utilización de mediciones en serie de PENK

En la población de pacientes descrita en el Ejemplo 4 (pacientes con sepsis, sepsis severa o choque séptico), se midió la PENK en plasma el día del ingreso y al día siguiente (día 1). Utilizando un valor de corte simple de 100 pmoles/l, que es próximo al percentil 99 del intervalo normal, se segmentó la población en dos grupos (superior e inferior a 100 pmoles/l) y las tasas de supervivencia a 7 días correspondientes es ilustran en gráficos de Kaplan-Meier (figuras 16 a) y b)). Los pacientes con una concentración de PENK inferior a 100 pmoles/l el día del ingreso, con una concentración de PENK que se mantuvo inferior a 100 pmoles/l el día 1, presentaron una tasa de supervivencia elevada, de 87%, mientras que en el caso del incremento de la concentración de PENK a más de 100 pmoles/l el día 1, la tasa de supervivencia cayó a 67%. En contraste, los pacientes con una concentración de PENK superior a 100 pmoles/l el día de ingreso, con una concentración de PENK mantenida sobre 100 pmoles/l el día, presentaron una tasa de supervivencia pobre, de sólo 50%, mientras que en el caso de una caída de la concentración de PENK a valores inferiores a 100 pmoles/l el día 1, la tasa de supervivencia fue de 100%.

Ejemplo 6:

Utilizando las concentraciones de PENK en plasma determinadas en la población de pacientes descrita en el Ejemplo 4 (pacientes con sepsis, sepsis severa o choque séptico) el día del ingreso, se analizó mediante análisis de regresión lineal multivariable qué parámetros/variables determinaban y en qué medida las concentraciones de PENK. En la figura 17, se ilustra la R2 parcial. El análisis demuestra que las medidas de función renal (en el caso mostrado, el aclaramiento de la creatinina) son claramente los determinantes más fuertes de las concentraciones de PENK.

Tabla 9:

30

Tabla 9: asociación de variables determinadas en la población de pacientes tal como se describe en el Ejemplo 4 el día del ingreso con la mortalidad a los 7 días.

Variable - mediana [IQR)	total (n=101)	Muertes hospitalarias 7 días (n=28)	Supervivientes a los 7 días (n=73)	Valor de p
PENK (pmoles/l)	87 [50-205)	209 [77-499)	75 [47-124)	<0,001
Aclaramiento de creatinina (ng/ml)	48 [23-77)	33 [15-69)	56 [29-81)	0,071
Puntuación APACHE (puntos)	16 [13-21)	23 [18-27)	14 [12-18)	<0,001

PENK en varones

Mediante la utilización de PENK como marcador pronóstico, PENK el primer día (presentación en el servicio de urgencias) era incluso más fuerte como predictor pronóstico de muerte hospitalaria en la población masculina (AUC: 0,849, fig. 12); una combinación de PENK y APACHE resultó en un AUC de 0,89 frente a 0,837 solo APACHE (fig. 13). La combinación de PENK y aclaramiento de creatinina generó un valor pronóstico superior de AUC: 0,91 frente a 0,721 para el aclaramiento de creatinina por sí solo (fig. 14). Respecto a la población de pacientes completa, el valor pronóstico de PENK fue más fuerte después del primer día de tratamiento de UCI (día 2, AUC: 0,872).

Descripción de las figuras

Figura 1: representa una curva típica de dosis/señal de proencefalina. Curva estándar de proencefalina.

Figura 2: distribución de frecuencias de proencefalina en una población sana (n=4.211). El valor medio de PENK era de 44,7 pmoles/l, desviación estándar=1,27; el percentil 99 (intervalo normal superior) era de 80 pmoles de PENK/L. La figura 2 muestra los valores LN de PENK.

Figura 3: correlación entre el aclaramiento de creatinina y PENK en sujetos sanos. Eje y: cuartiles de aclaramiento de creatinina; eje x: cuartiles de PENK.

55

Figura 4: PENK se correlaciona fuertemente con el aclaramiento de creatinina (r=-0,74, p<0,0001).

Figura 5: PENK incrementado se correlacionaba significativamente con la disfunción renal.

Figura 6: curva de receptor/operador (ROC) para la proencefalina y diagnóstico de disfunción renal según los criterios RIFLE (ver anteriormente). El área bajo la curva (AUC) era de 0,868, indicando un fuerte poder diagnóstico de la proencefalina para la disfunción renal.

Figura 7: NGAL incrementado se encontraba significativamente incrementado en los pacientes con disfunción renal. Los intervalos normales de NGAL (intervalo de 0,037 a 0,106 µg/ml; http://www.bioporto.com/products/bioporto_diagnostics/ngal_elisa_kits/ngal_rapid_elisa_kit_ce_ivd) está indicado mediante un área sombreada en el gráfico.

Figura 8: curva de receptor/operador (ROC) para NGAL y diagnóstico de disfunción renal según los criterios RIFLE (ver anteriormente). Los presentes inventores utilizaron NGAL como marcador de referencia de disfunción renal. La AUC era de 0,809, sustancialmente más baja que para proencefalina (AUC: 0,868, fig. 6), indicando el valor añadido de proencefalina.

Figura 9: PENK es altamente pronóstico de resultado de sepsis.

Figura 10: se aporta una información adicional significativa al combinar PENK y APACHE 2.

Figura 11a): un paciente (superviviente) con PENK inicial <100 pmoles/l, se mantuvo con <100 pmoles/l durante la estancia hospitalaria.

Figura 11b): un paciente (muerto durante la estancia hospitalaria) con PENK inicial >100 pmoles/l y no se redujo a valores <100 pmoles/l.

Figura 11c): un paciente (muerto durante la estancia hospitalaria) con PENK inicial >100 pmoles/l y no se redujo a valores <100 pmoles/l.

Figura 11d): un paciente (superviviente) con PENK inicial >100 pmoles/l; el valor de PENK cayó a valores <100 pmoles/l dentro del primer día de tratamiento de UCI.

Figura 12: PENK el primer día (presentación en el servicio de urgencias) fue un predictor todavía más fuerte de pronóstico de muerte hospitalaria en la población masculina.

Figura 13: una combinación de PENK y APACHE resultó en una AUC de 0,89 frente a 0,837 APACHE por sí solo.

Figura 14: la combinación de PENK y aclaramiento de creatinina generó un valor pronóstico superior de AUC 0,91 frente a 0,721 para aclaramiento de creatinina por sí solo.

Figura 15: figura 15 A/B: concentraciones de PENK (A) y NGAL (B) en plasma, respectivamente, en pacientes sépticos clasificados según grado de disfunción renal aguda. 0=sin disfunción renal; R=riesgo; L=lesión; F=insuficiencia; L=pérdida. Las categorías se define según http://en.wikipedia.org/wiki/Acute_kidney_injury); riesgo: reducción de GFR>25%; incremento de la creatinina en suero de 1,5 veces o la producción de orina <0,5 ml/kg/h durante 6 horas; lesión: reducción de GFR >50%, duplicación de la producción de creatinina u orina <0,5 ml/kg/h durante 12 horas; insuficiencia: reducción de GFR >75%, triplicado de la creatinina o creatinina>355 µmoles/l (con una elevación >44) (>4 mg/dl) O producción de orina inferior a 0,3 ml/kg/h durante 24 horas; pérdida: AKI persistente o pérdida completa de la función renal durante más de 4 semanas. Intervalos normales de concentración de PENK (ver la fig. 2) y NGAL (intervalo de 0,037 a 0,106 µg/ml; http://www.bioporto.com/products/bioporto_diagnostics/ngal_elisa_kits/ngal_rapid_elisa_kit_ce_ivd) se indican mediante áreas sombreadas en los gráficos. La figura demuestra que las concentraciones de NGAL se encuentran masivamente elevadas en pacientes sépticos, incluso en el caso de que no presenten disfunción renal, mientras que ello no es así para PENK.

Figura 16: tasas de supervivencia de pacientes críticamente enfermos según sus concentraciones plasmáticas de PENK el día del ingreso y al día siguiente (día 1). Panel A: en el lado izquierdo, se muestra un gráfico de Kaplan-Meier para aquellas subpoblaciones de pacientes con una concentración de PENK en el momento del ingreso superior e inferior a 100 pmoles/l, respectivamente. En el lado derecho se muestra un gráfico de Kaplan-Meier para aquellas subpoblaciones de pacientes con una concentración de PENK el día 1 superior e inferior a 100 pmoles/l, respectivamente, que presentaban una concentración de PENK inferior a 100 pmoles/l el día del ingreso. Panel B: en el lado izquierdo, se muestra el gráfico de Kaplan-Meier para aquellas subpoblaciones de pacientes con una concentración de PENK en el momento del ingreso superior e inferior a 100 pmoles/l, respectivamente. En el lado derecho se muestra un gráfico de Kaplan-Meier para aquellas subpoblaciones de pacientes con una concentración de PENK el día 1 superior e inferior a 100 pmoles/l, respectivamente, que presentaban una concentración de PENK superior a 100 pmoles/l el día del

ingreso.

5 Figura 17: regresión lineal multivariable que predice PENK. Observación: se omitió la presión arterial, la creatinina y la urea debido a la elevada correlación con MAP o aclaramiento de creatinina. Se calculó la regresión lineal utilizando las variables listadas de la manera siguiente: $\text{Log}(\text{PENK}) = a \cdot \text{CreaClearance} + b \cdot \text{Cardiovasc} + c \cdot \text{MAP} + \text{etc.}$ La R2 parcial proporciona la medida en que cada variable contribuye a PENK, es decir, CreaClearance es la más fuerte y presenta una R2 parcial ligeramente superior a 0,15, es decir, el aclaramiento de creatinina explica aproximadamente el 15% de la variabilidad que se observa en PENK.

10 Debe apreciarse que la edad, el género, etc. no presentan una influencia significativa sobre las concentraciones de PENK.

REIVINDICACIONES

1. Método para (a) diagnosticar o monitorizar la función renal en un sujeto o (b) diagnosticar la disfunción renal en un sujeto o (c) predecir o monitorizar el riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo en el que dicho suceso adverso se selecciona de entre el grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal que incluye la insuficiencia renal, la pérdida de la función renal y la nefropatía terminal o muerte que se debe a disfunción renal que incluye insuficiencia renal, pérdida de función renal y nefropatía terminal o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención que comprende:
- determinar el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido a partir de dicho sujeto; y
 - (a) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con la función renal en un sujeto o
 - (b) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con la disfunción renal en el que un nivel elevado por encima de determinado umbral es predictivo o diagnóstico de disfunción renal en dicho sujeto o
 - (c) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con dicho riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que un nivel elevado por encima de determinado umbral es predictivo de un riesgo aumentado de dichos sucesos adversos o
 - (d) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con el éxito de una terapia o intervención en un sujeto enfermo, en el que un nivel por debajo de determinado umbral es predictivo de un éxito de la terapia o intervención, en el que dicha terapia o intervención puede ser una terapia sustitutiva renal o puede ser un tratamiento con ácido hialurónico en pacientes que han recibido una sustitución renal o predecir o monitorizar el éxito de la terapia o intervención puede ser la predicción o la monitorización de la recuperación de la función renal en pacientes con una función renal alterada antes y después de la terapia sustitutiva renal y/o de intervenciones farmacéuticas,
- en el que dicha proencefalina o fragmento se selecciona de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 y SEC ID nº 11.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos se determina utilizando un agente de unión de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente de unión se selecciona de entre el grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un andamiaje no Ig que se une a proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende
- determinar el nivel de analito inmunorreactivo utilizando por lo menos un agente de unión que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de la proencefalina (PENK) o fragmentos de la misma en un fluido corporal obtenido a partir de dicho sujeto; y
- (a) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con la función renal en un sujeto o
 - (b) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con la disfunción renal en el que un nivel elevado por encima de un determinado umbral es predictivo o diagnóstico de disfunción renal en dicho sujeto o
 - (c) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con dicho riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que un nivel elevado por encima de un determinado umbral es predictivo de un riesgo aumentado de dichos sucesos adversos o
 - (d) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con éxito de una terapia o intervención en un sujeto enfermo, en el que un nivel por debajo de un determinado umbral es predictivo de un éxito de la terapia o intervención.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicho por lo menos un agente de unión se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, preferentemente no se une a los péptidos de encefalina [Met]encefalina SEC ID nº 3 y [Leu]encefalina SEC ID nº 4, preferentemente se une a una región dentro de las secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, preferentemente se une a una región con las

secuencias seleccionadas de entre el grupo que comprende SEC ID nº 2, 5, 6 y 10, preferentemente se une a SEC ID nº 6.

- 5 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho umbral es 80 pmoles/l.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de proencefalina se mide con un inmunoensayo y dicho agente de unión es un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo que se une a proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.
- 10 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se utiliza un ensayo que comprende dos agentes de unión que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la proencefalina que es aminoácido 133-140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) y aminoácido 152-159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14) en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.
- 15 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que se utiliza un ensayo para determinar el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos y en el que la sensibilidad de ensayo de dicho ensayo puede cuantificar la proencefalina o fragmentos de proencefalina de sujetos sanos y es <15 pmoles/l.
- 20 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que dicho fluido corporal puede seleccionarse de entre el grupo que comprende sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo (csf) y saliva.
- 25 11. Método según las reivindicaciones 1 a 10, en el que adicionalmente se determina por lo menos un parámetro clínico seleccionado de entre el grupo que comprende: edad, BUN, NGAL, aclaramiento de creatinina, creatinina y puntuación Apache.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha determinación de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos se lleva a cabo más de una vez en un paciente.
- 30 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en el que dicha monitorización se lleva a cabo para evaluar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas adoptadas.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para estratificar dichos sujetos en grupos de riesgo.
- 35 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el que dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma correlacionan con un riesgo de muerte o un suceso adverso en un sujeto enfermo, en el que un nivel elevado por encima de un determinado umbral es predictivo de un riesgo aumentado de muerte o sucesos adversos y en el que dicho sujeto enfermo es un varón.
- 40 16. Dispositivo de análisis de diagnóstico inmediato para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en el que dicho dispositivo de análisis de diagnóstico inmediato comprende por lo menos dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos al aminoácido 133-140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) y aminoácido 152-159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14).
- 45 17. Kit para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en el que dicho kit comprende por lo menos dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos al aminoácido 133-140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) y aminoácido 152-159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14).

Fig. 1:

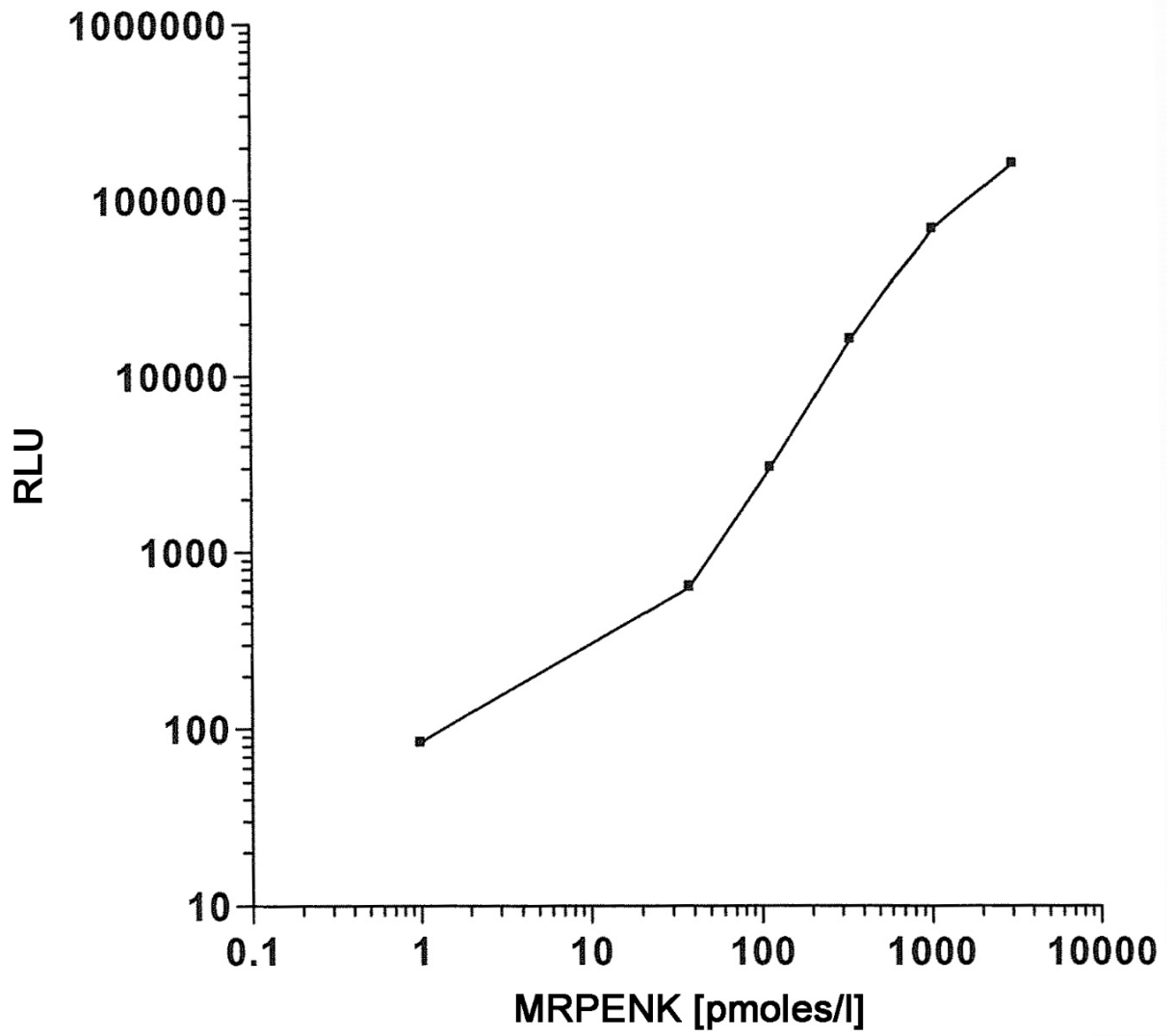


Fig. 2:

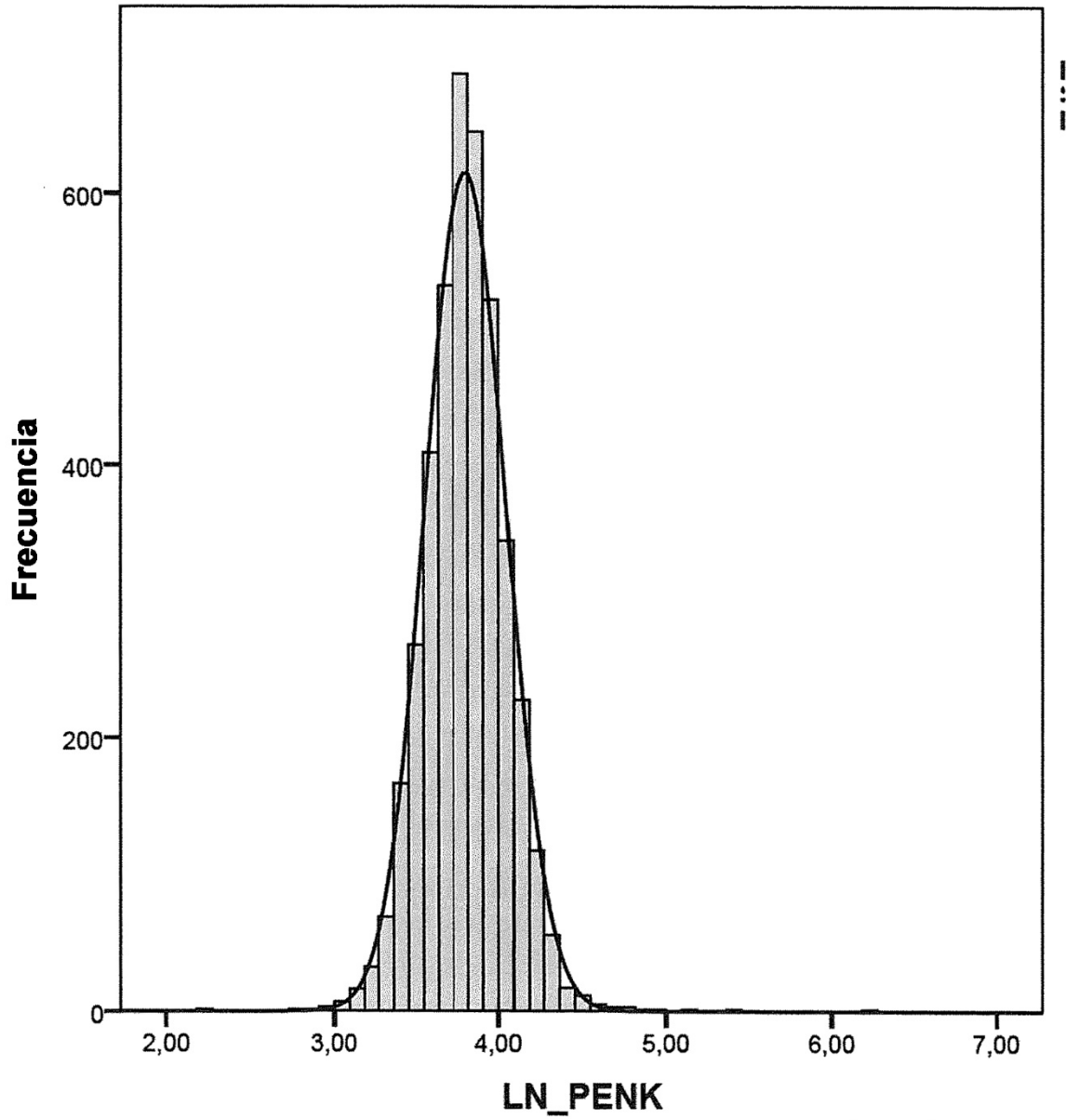


Fig. 3:

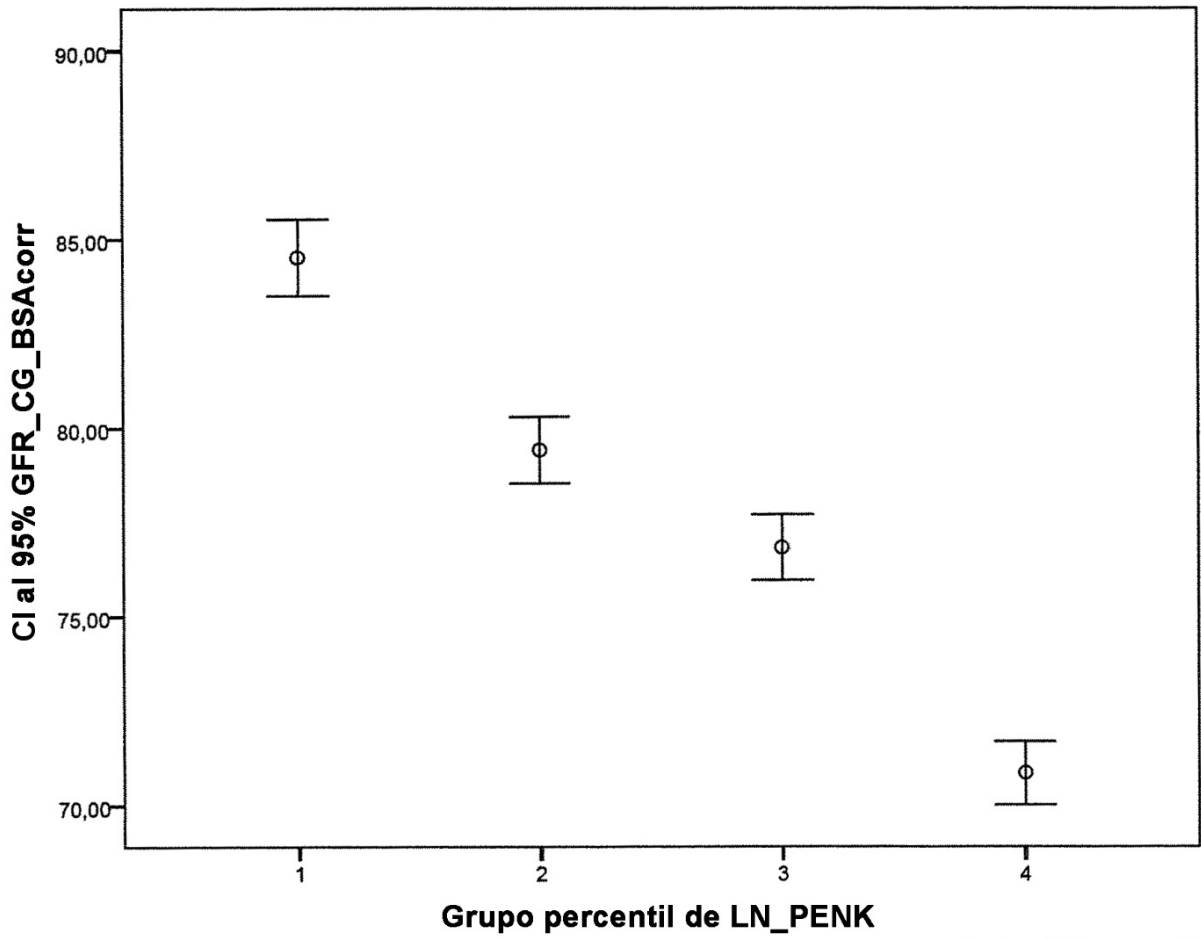


Fig. 4:

Correlación: PENK vs. Eliminación de creatinina

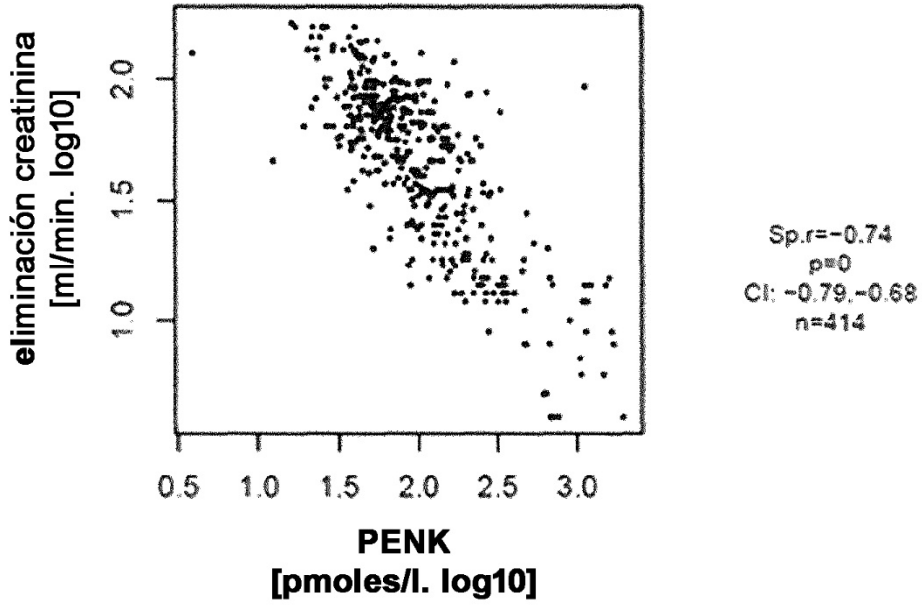


Fig. 5:

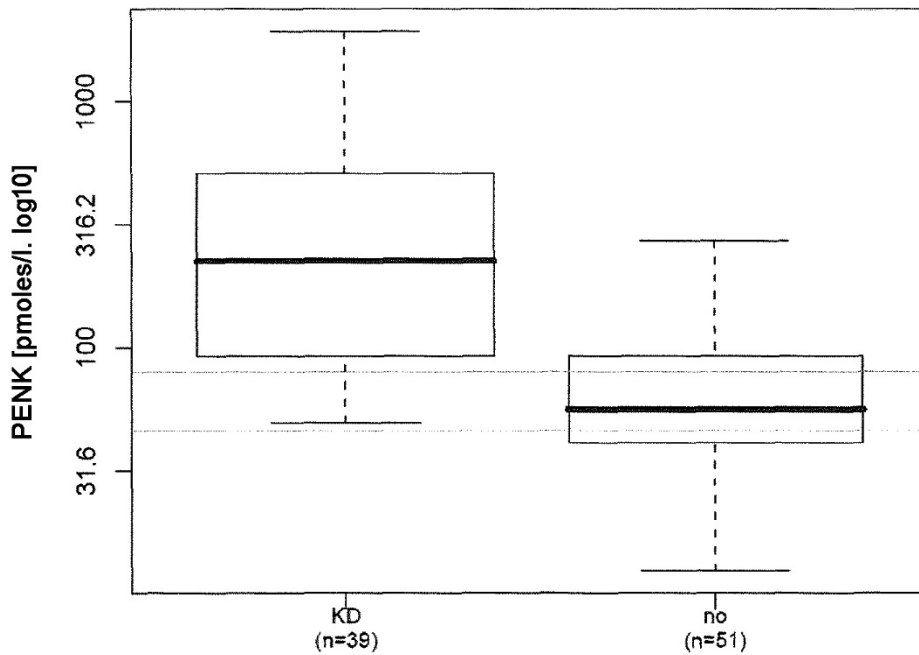


Fig. 6:

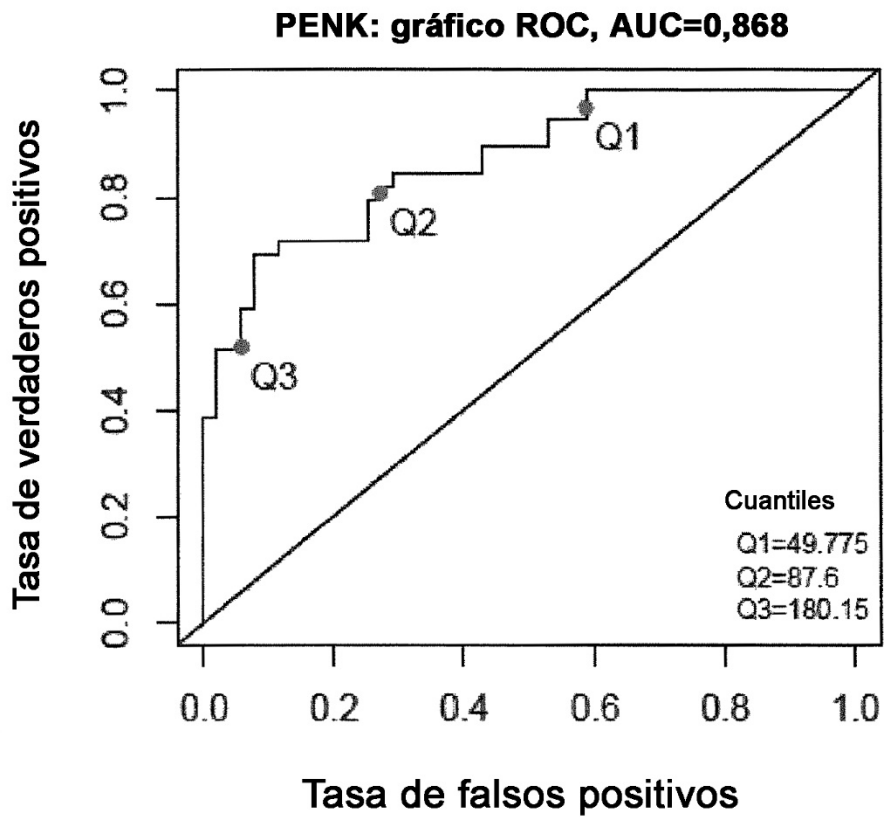


Fig. 7:

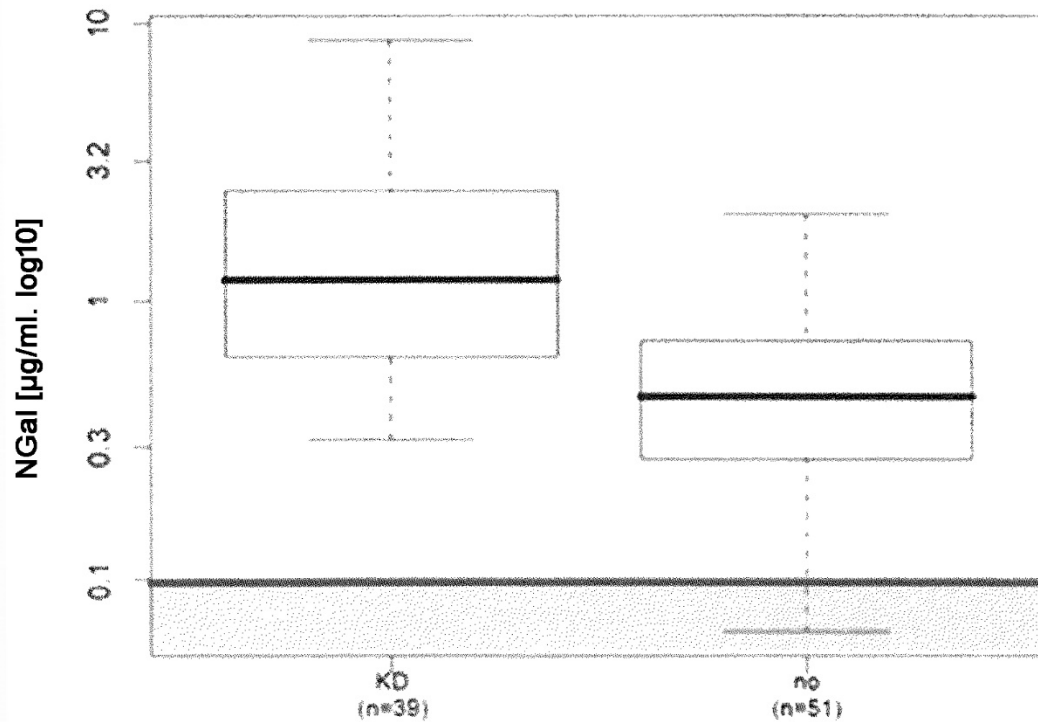


Fig. 8:

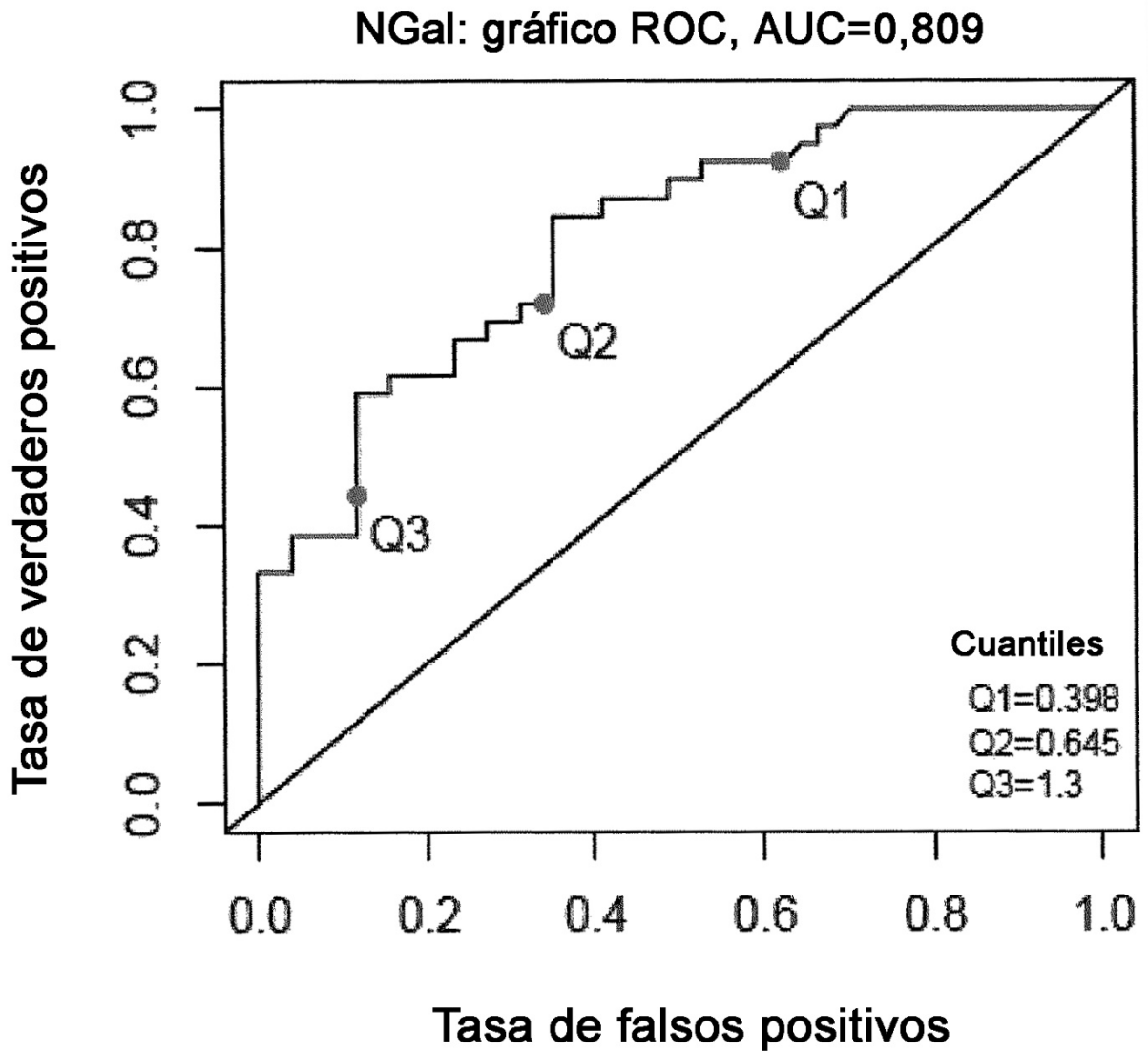


Fig. 9:

Predicción de la mortalidad hospitalaria

□ Resultados de la regresión logística:

Modelo	N	Sucesos	Chi2 modelo	d.f.	LR valor de p	índice C [CI al 95%]
aclaramiento de crea.	98	24	4.02	1	0.04485	0.638 [0.503,0.772]
PENK	101	27	17.53	1	0.00003	0.744 [0.631,0.858]
APACHE	101	27	19.98	1	0.00001	0.783 [0.681,0.886]

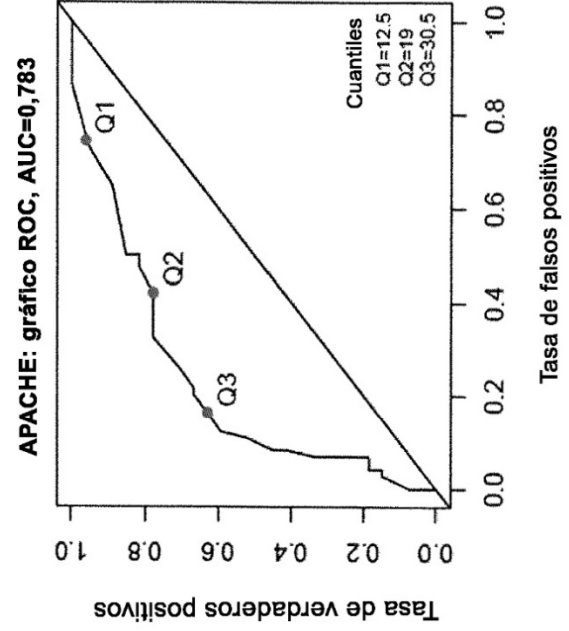
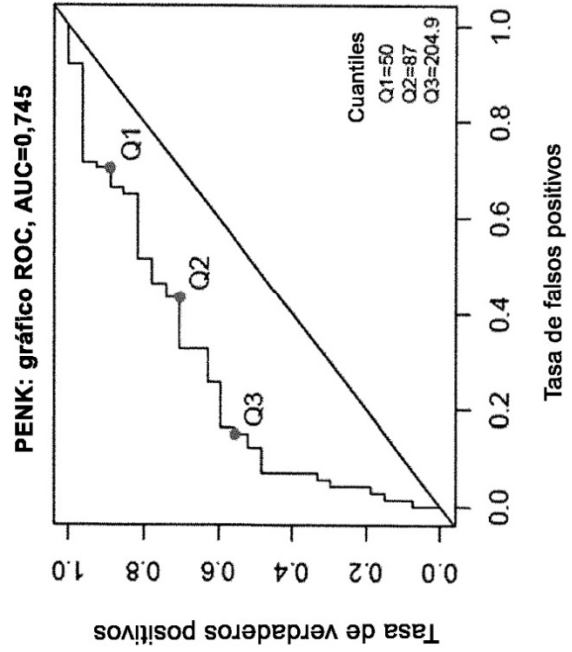


Fig. 10:

Predicción de la mortalidad hospitalaria

- PENK es independiente de Apache y proporciona información pronóstica adicional:

	LR	χ^2	d.f.	valor de p
adición de APACHE (Apache) a PENK	7.07	1	1	0.0078
adición de PENK (PENK) a APACHE	4.62	1	1	0.0316

- **AUC (PENK + APACHE):**

0,794 (vs. 0,783 para APACHE solo)

- **Chi²: 26.4 (vs. 20.0 para APACHE)**

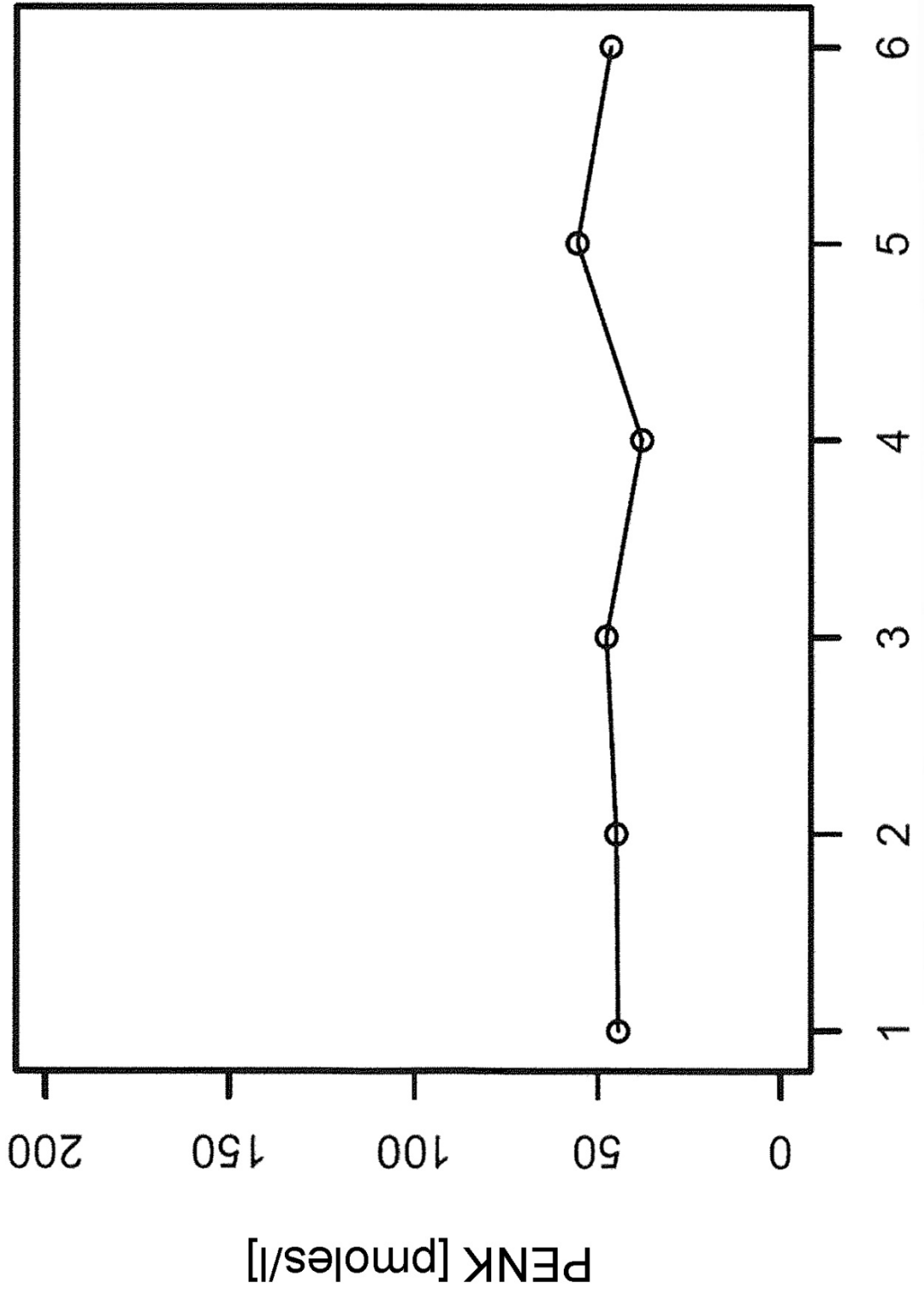


Fig. 11 a:

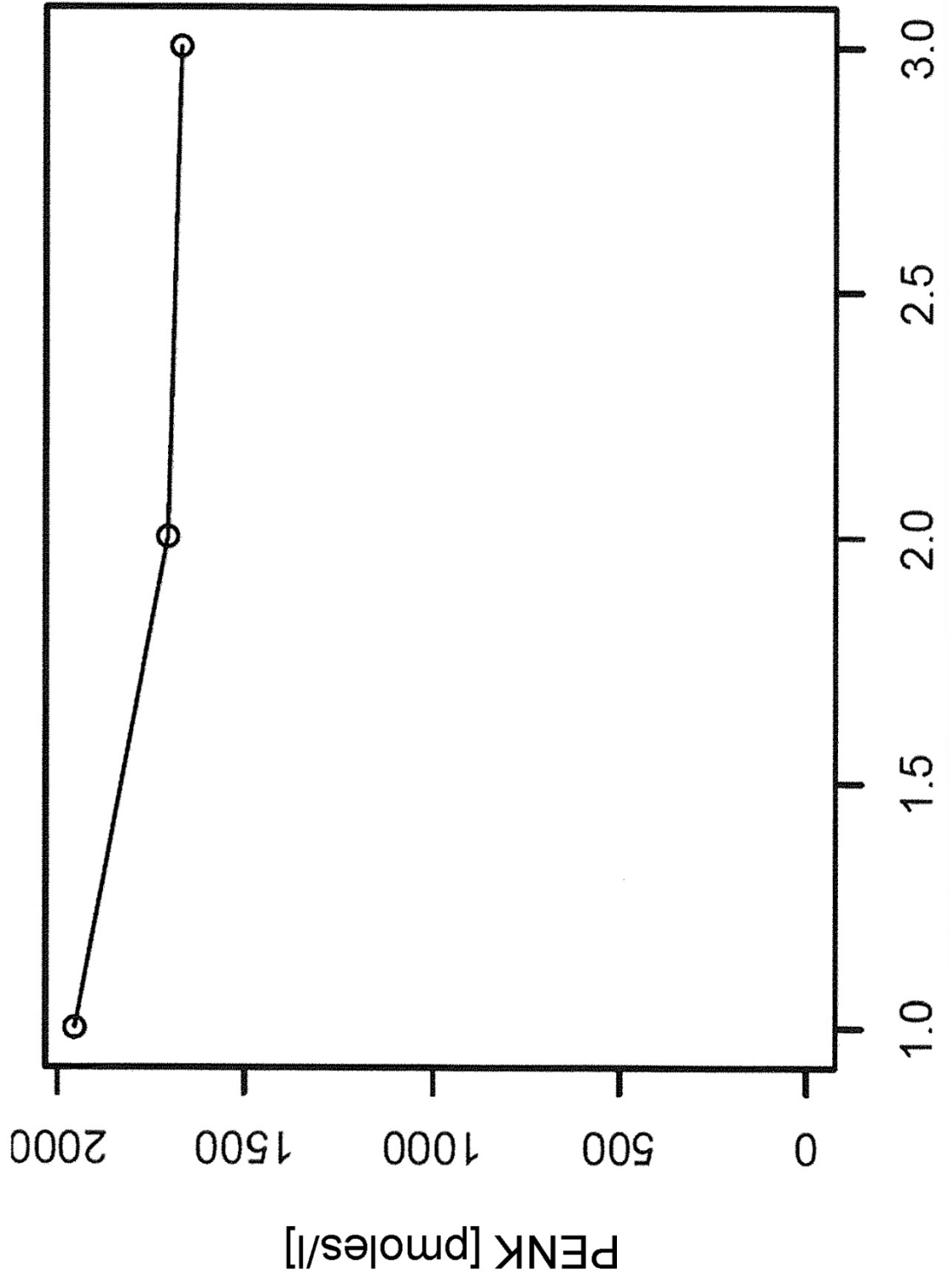


Fig. 11 b:

Fig. 11 c:

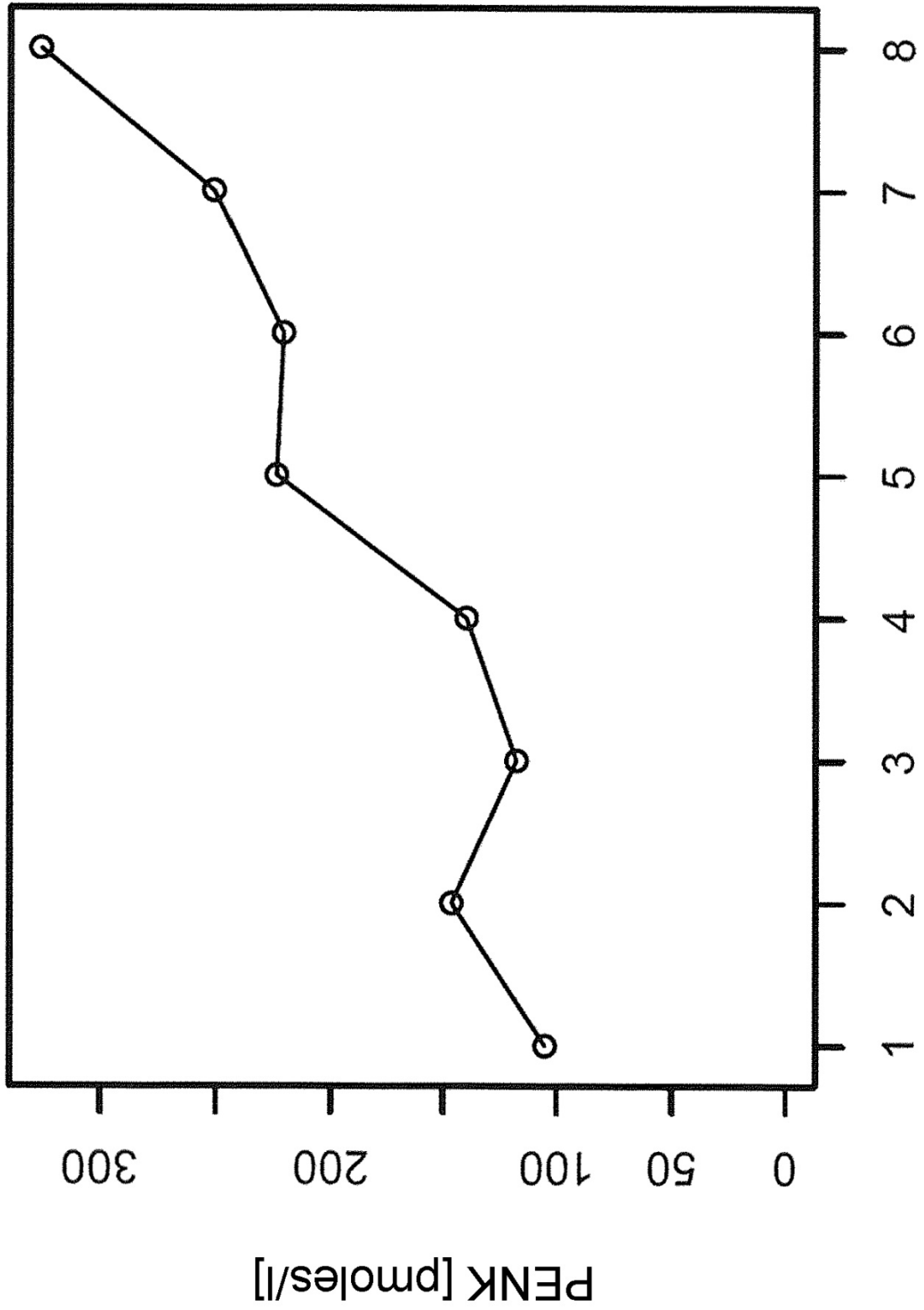


Fig. 11 d:

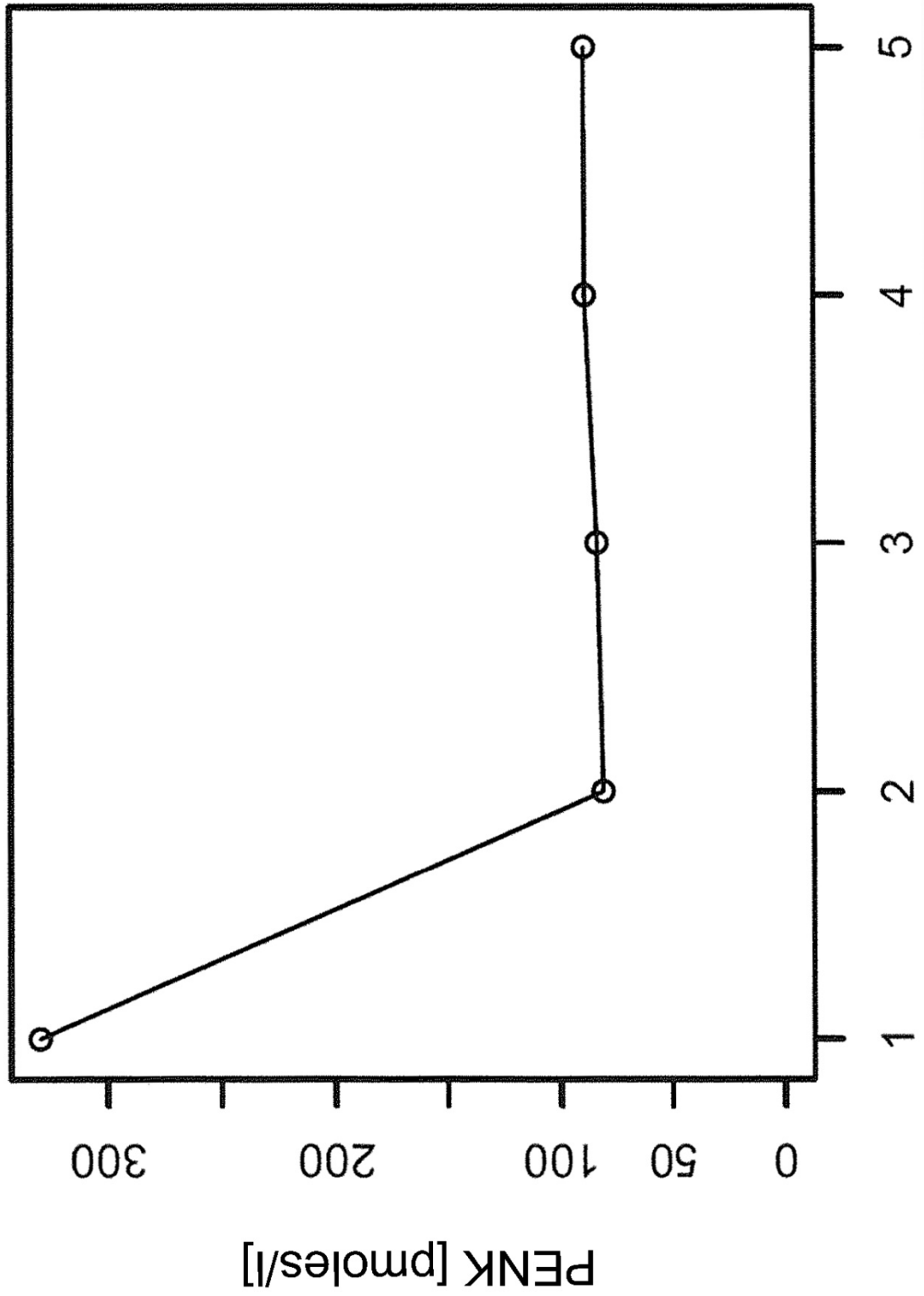


Fig. 12:

Predicción de la mortalidad hospitalaria

□ Resultados de la regresión logística:

Modelo	N	Sucesos	Chi2 modelo	d.f.	LR valor de p	índice C [CI al 95%]
aclaramiento de crea.	58	11	5.26	1	0.02188	0.721 [0.528,0.913]
PENK	60	13	18.9	1	0.00001	0.849 [0.724,0.979]
APACHE	60	13	20.19	1	0.00001	0.837 [0.693,0.981]

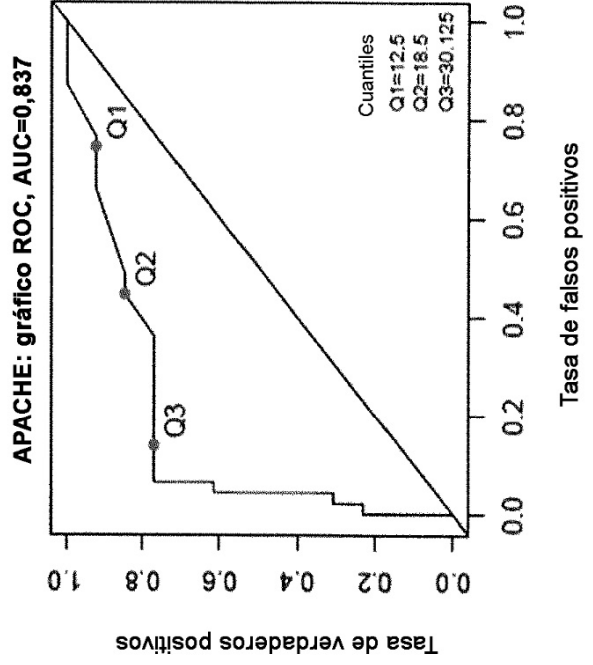
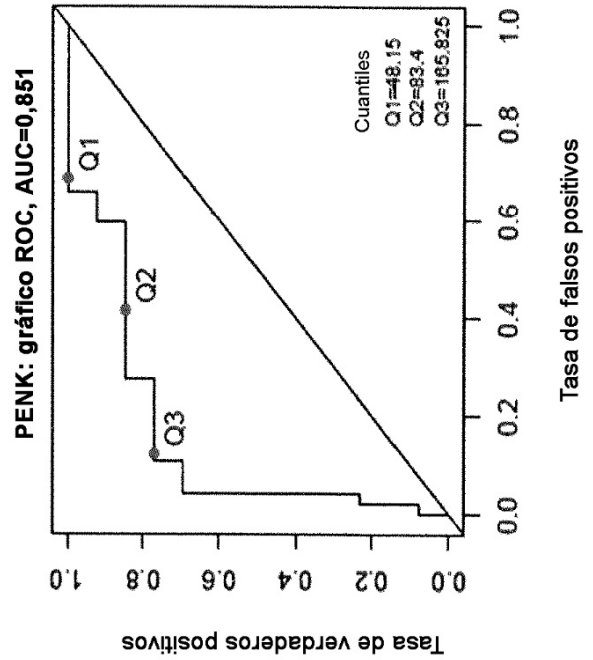


Fig. 13:

Predicción de la mortalidad hospitalaria

- PENK es independiente de Apache y proporciona información pronóstica adicional:

	LR	χ^2	d.f.	valor de p
adición de APACHE (Apache) a PENK	7.69	1	1	0.0056
adición de PENK (PENK) a APACHE	6.4	1	1	0.0114

- **AUC (PENK + APACHE): 0,890**
(vs. 0,837 para APACHE solo)
- **Chi²: 26,6 (vs. 20,2 para APACHE)**

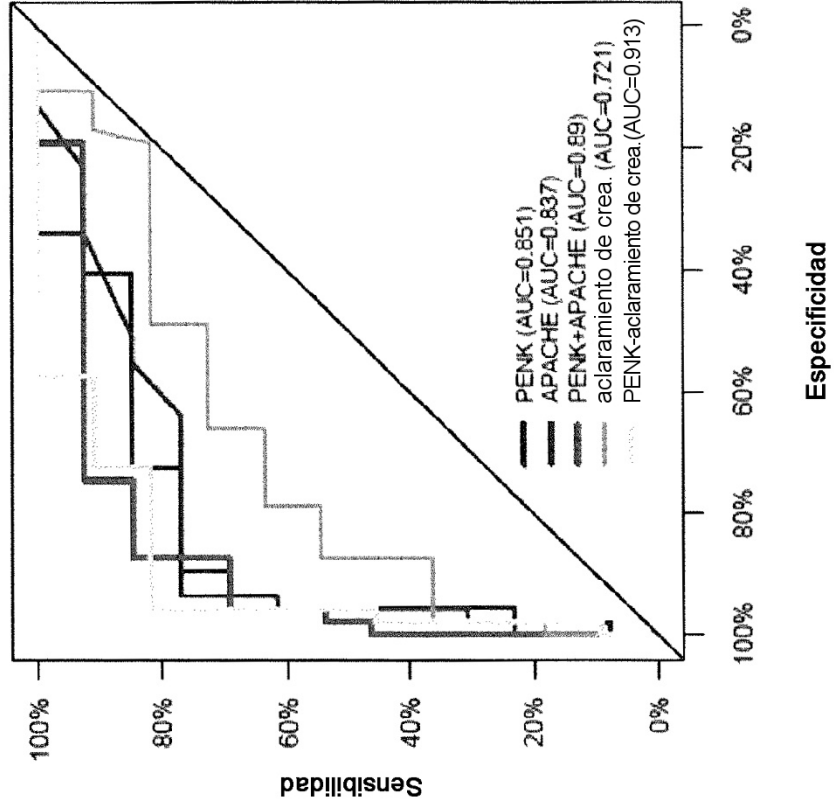


Fig. 14:

Predicción de la mortalidad hospitalaria

- PENK es independiente de la eliminación de la creatinina y proporciona información pronóstica superior:

	LR	χ^2	d.f.	valor de p
adición de aclaramiento de crea. (aclaramiento de crea.) a PENK	3.31	1	0.069	
adición de PENK (PENK) a aclaramiento de crea.	18.23	1	<0.00001	

- **AUC (PENK + Elim. Crea): 0,913**
(vs. 0,851 para PENK sola)

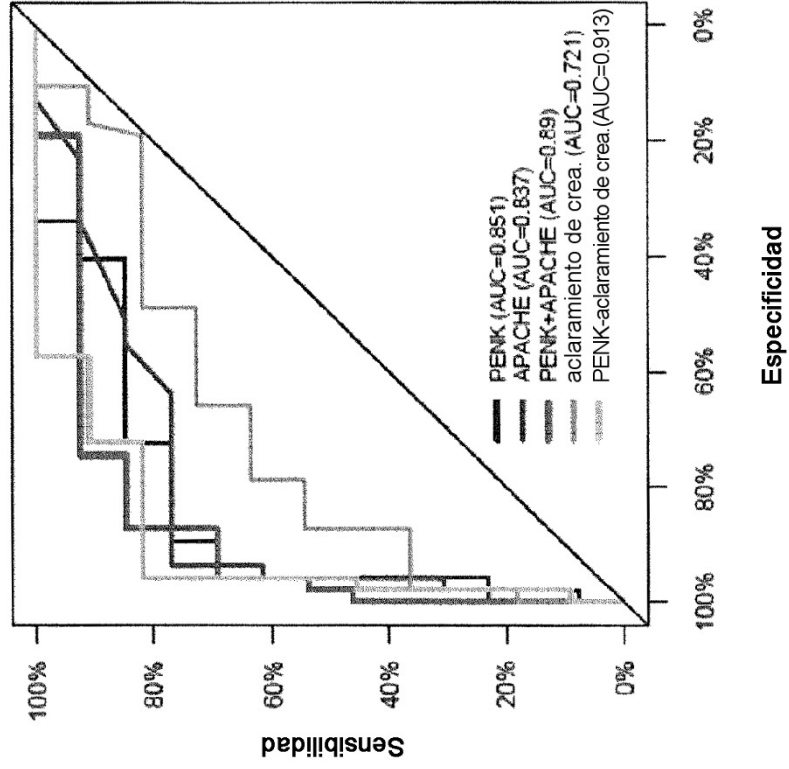
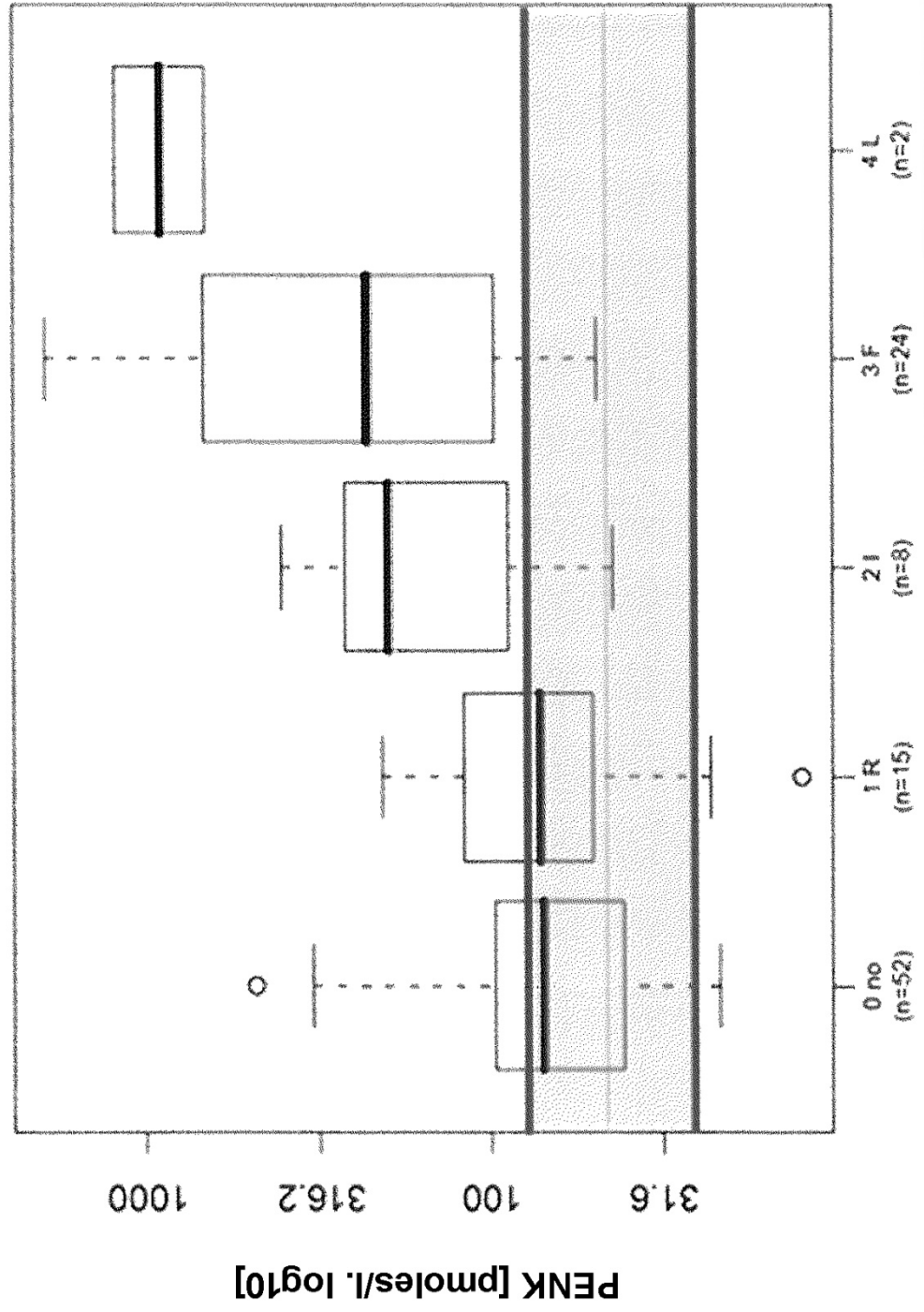


Fig. 15

A)



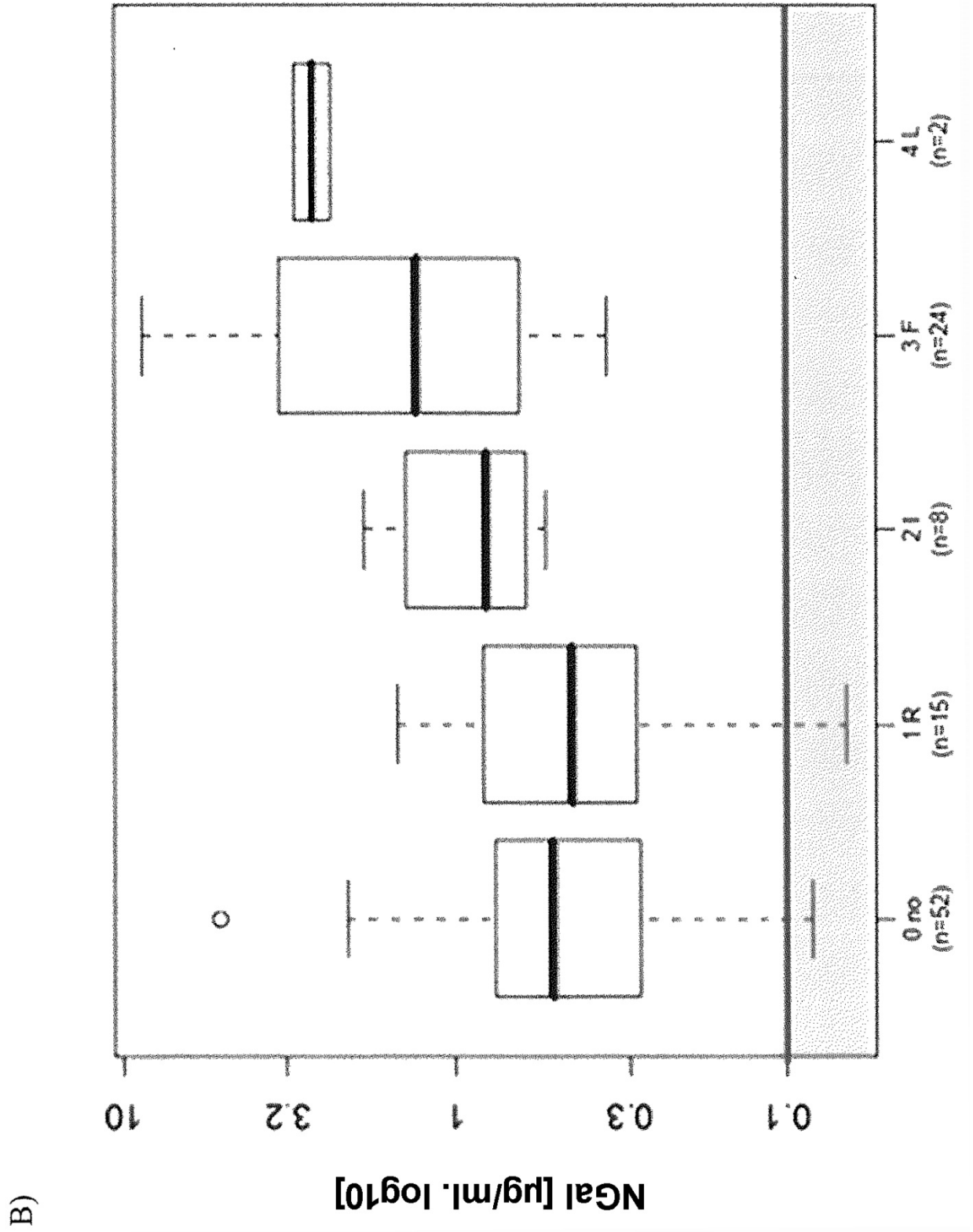
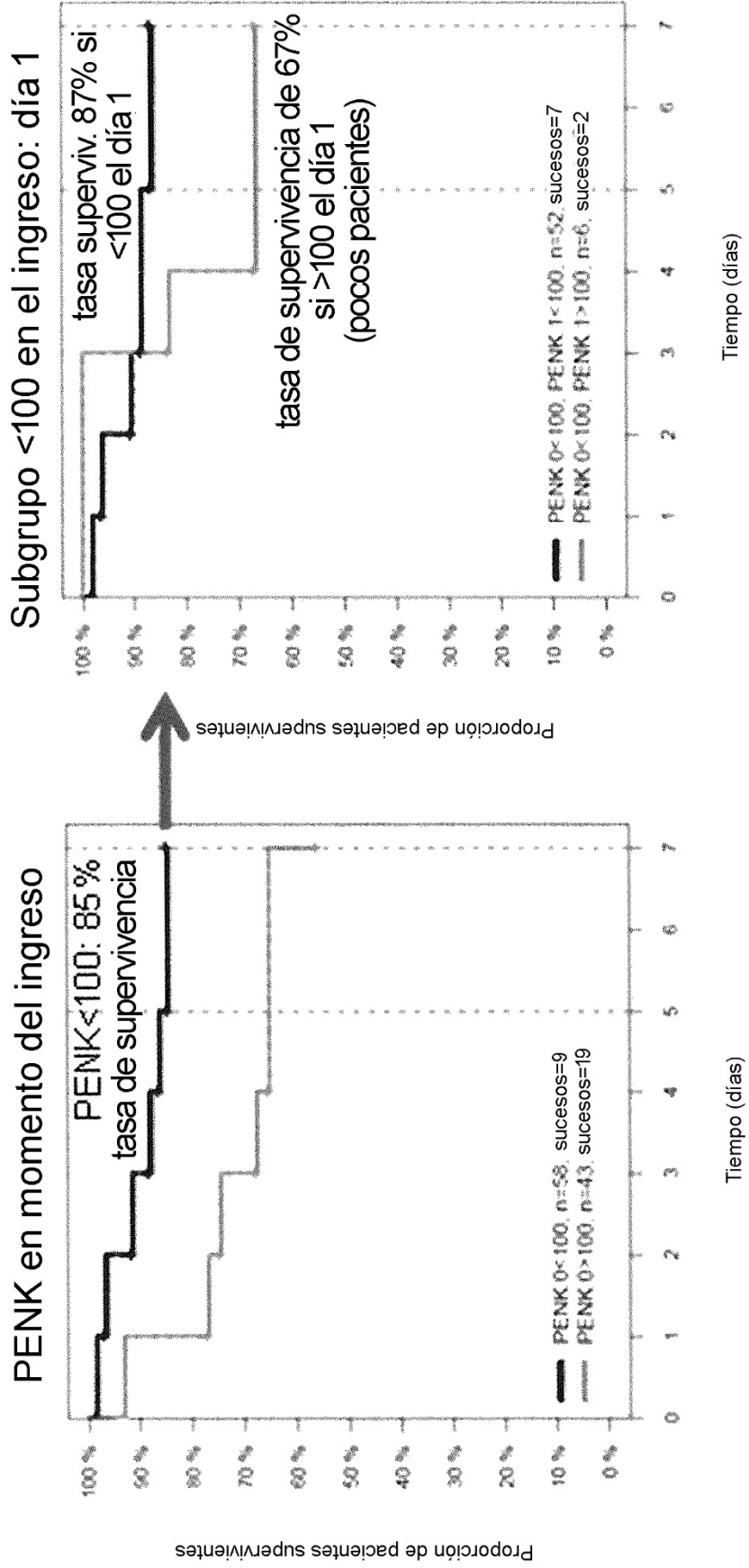


Fig. 16

A)



B)

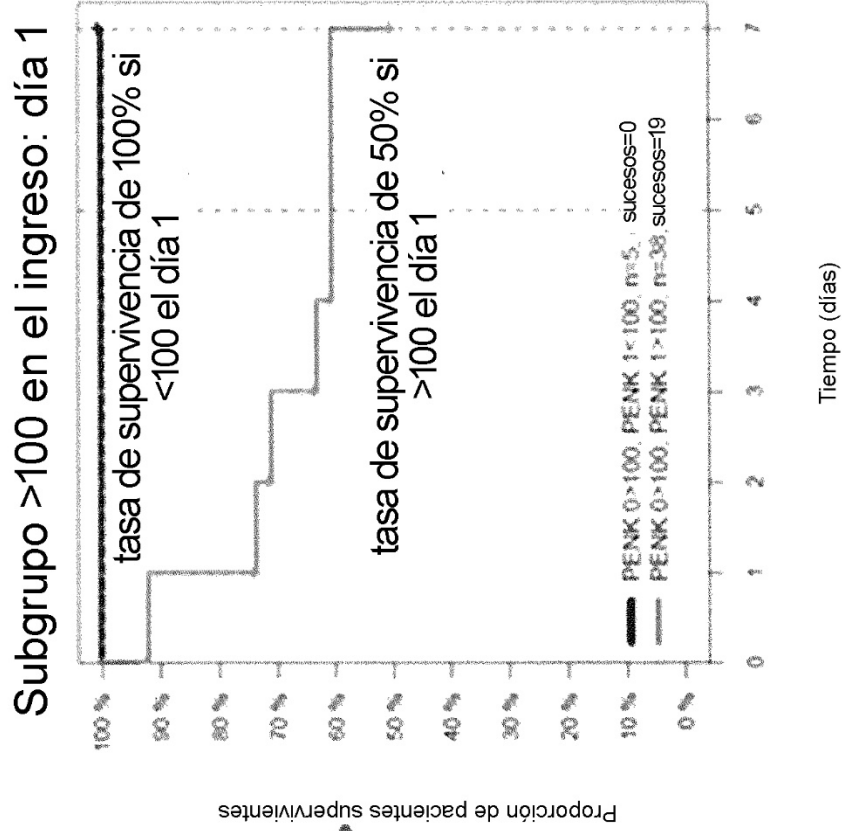
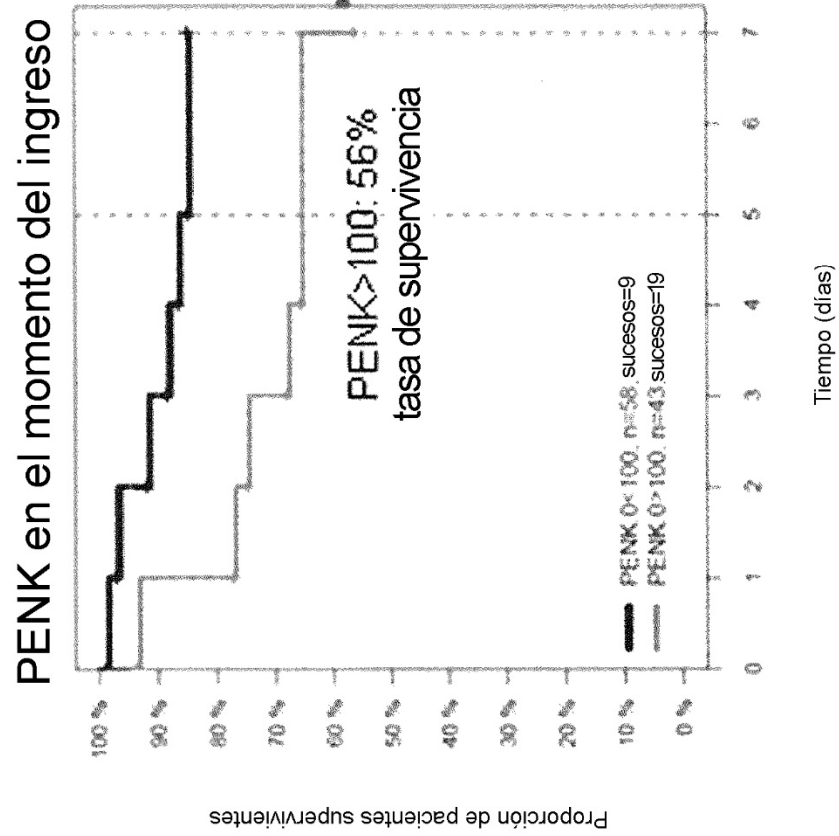


Fig. 17:

