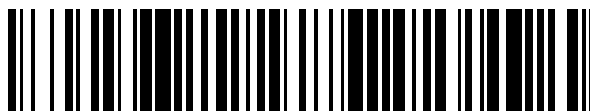


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 105**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2010 PCT/EP2010/002279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO10118855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2010 E 10717531 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2419741**

54 Título: **Evaluación de riesgos para el tratamiento con antibióticos en pacientes que padecen enfermedades primarias no infecciosas determinando el nivel de procalcitonina**

30 Prioridad:

**14.04.2009 EP 09157886**

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

**30.03.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS y  
STRUCK, JOACHIM**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 751 105 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**

Evaluación de riesgos para el tratamiento con antibióticos en pacientes que padecen enfermedades primarias no infecciosas determinando el nivel de procalcitonina

**5 Campo de la invención**

La presente invención está en el campo del diagnóstico clínico. En particular, la presente invención se refiere a la evaluación de riesgos en pacientes que padecen una enfermedad primaria no infecciosa determinando el nivel de procalcitonina (PCT) en una muestra de un paciente.

**Antecedentes de la invención**

10 Se sabe que la procalcitonina (PCT) es un marcador para la infección bacteriana y sepsis. Los niveles altos en sangre o en suero de esta prohormona peptídica son indicadores de infecciones graves.

En un entorno clínico, los pacientes con enfermedades primarias no infecciosas a menudo son, como una medida de precaución, tratados con antibióticos para prevenir o tratar infecciones potenciales que pueden o no manifestarse aún, independientemente de si la presencia de una infección bacteriana ha sido realmente diagnosticada.

15 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de los inventores de que el tratamiento de pacientes que padecen una enfermedad primaria no infecciosa con un antibiótico para tratar o prevenir infecciones potenciales bacterianas está en un grupo particular de pacientes asociados con un mayor riesgo de un resultado adverso. En particular, los pacientes que tienen un nivel bajo de PCT en sangre están sujetos a un mayor riesgo cuando se someten a antibióticos. Según la invención, es aconsejable determinar el nivel de PCT en una muestra de un fluido corporal de un paciente que padece una enfermedad primaria no infecciosa antes de comenzar una terapia antibiótica potencialmente dañina. Niveles elevados de PCT en sangre o suero indican la presencia de una infección bacteriana grave o incluso sepsis y requieren el tratamiento del paciente respectivo con antibióticos. Sin embargo, los pacientes que padecen una enfermedad primaria no infecciosa hasta ahora no son examinados de forma rutinaria para detectar niveles bajos de PCT antes de comenzar una terapia con antibióticos.

**25 Descripción de la invención**

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico para la identificación de un sujeto que padece una enfermedad primaria no infecciosa que tiene un mayor riesgo de un resultado adverso potencialmente inducido mediante la administración de un antibiótico a dicho sujeto, que comprende las etapas de:

- 30 (i) proporcionar una muestra de un fluido corporal de dicho sujeto que padece una enfermedad primaria no infecciosa,
- (ii) determinar en dicha muestra el nivel de Procalcitonina (PCT) o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos,
- 35 (iii) correlacionar el nivel determinado de procalcitonina (PCT) o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos por debajo de 200 pg/ml en dicha muestra, se correlaciona con un riesgo potencial de tener un resultado adverso inducido mediante la administración de un antibiótico y en donde dicho sujeto no muestra ningún síntoma de una infección bacteriana. El método de diagnóstico de la invención es un método in vitro.

Dicho sujeto que padece una enfermedad primaria no infecciosa no tiene una infección bacteriana, especialmente no tiene una infección bacteriana grave, preferiblemente no muestra ningún síntoma de una infección bacteriana.

40 El documento DE102006046996A1 describe un método para la estratificación de pacientes con insuficiencia cardíaca para determinar el tratamiento antibiótico, preferiblemente en el caso de cuidados médicos intensivos y emergencias médicas. Dicho método se basa en determinar el nivel de procalcitonina en sangre en donde dicho nivel está comprendido dentro del intervalo de 10 pg/ml a 1 ng/ml con un valor límite entre 30 pg/ml a 60 pg/ml.

45 El documento WO2009019230A2 describe el uso de procalcitonina en la estratificación del riesgo y el diagnóstico de pacientes con una enfermedad primaria no infecciosa, tal como cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas que incluyen la enfermedad de Alzheimer, y en particular para determinar el riesgo de contraer una enfermedad adicional (es decir, "resultado adverso") cuando dicho paciente se trata con un antibiótico y para permitir la adaptación de la terapia. El método se basa en determinar el nivel de procalcitonina o fragmentos de la misma de al menos 12 aminoácidos de longitud en donde el umbral está entre 20 y 25 pg/ml. El nivel de procalcitonina se determina utilizando el kit B.R.A.H.M.S PCT sensitive LIA (Ensayo de inmunoluminiscencia) disponible comercialmente en B.R.A.H.M.S.

50 El documento -CHRIST-CRAIN M. ET AL., "Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single blinded intervention trial", THE LANCET, (20040221), vol. 363, n° 9409, páginas 600-607 describe un estudio de tratamiento guiado por procalcitonina con antibióticos de grupos de pacientes con infecciones del tracto respiratorio inferior que incluyen EPOC, bronquitis aguda y asma y específica

que se desaconseja el uso de antibióticos cuando la concentración de procalcitonina sérica es de 100 a 250 pg/ml o por debajo de 100 pg/ml. El estudio se realiza utilizando un ensayo de tecnología TRACE llamado Kryptor PCT disponible comercialmente en B.R.A.H.M.S.

5 El documento -SANDEK A. ET AL., "Procalcitonin-guided antibiotic treatment in heart failure", THE LANCET, (20040508), vol. 363, n° 9420, página 1555- informa sobre el tratamiento antibiótico guiado por procalcitonina en la insuficiencia cardíaca utilizando el kit Kryptor PCT de B.R.A.H.M.S y describe un intervalo de valor límite de 100 a 500 pg/ml.

10 El documento WO2006/071583A2 describe métodos y composiciones para identificar sujetos en riesgo de resultados adversos relacionados con síndromes de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, en inglés systematic inflammatory response syndromes) para determinar regímenes de tratamiento, tales como terapia con antibióticos, basados en determinar el nivel de procalcitonina.

15 Los métodos descritos en la presente memoria según la invención permiten la predicción de un resultado adverso inducido por antibióticos para un sujeto que padece una enfermedad primaria no infecciosa. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria según la invención son igualmente métodos para predecir un resultado adverso inducido por antibióticos para un sujeto que padece una enfermedad primaria no infecciosa.

20 Por primerísima vez se encontró que un nivel de PCT muy bajo indica un mayor riesgo de atraer un resultado adverso para un sujeto que padece una enfermedad primaria no infecciosa cuando se administran antibióticos a dicho sujeto. Por lo tanto, en una realización preferida, si el nivel determinado de Procalcitonina (PCT) o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos va por debajo de un cierto umbral, se predice que dicho sujeto tiene un mayor riesgo de tener un resultado adverso cuando se administran antibióticos. En contraste con lo anterior, según los métodos de la técnica anterior, se sabía que existe una correlación entre el nivel determinado de Procalcitonina (PCT) o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos y el mayor riesgo de un resultado adverso inducido por el tratamiento con antibióticos para dichos sujetos.

25 Según la técnica anterior, las infecciones bacterianas sospechosas a menudo se trataban con antibióticos sin evidencia de enfermedad bacteriana clínicamente relevante. Se recomendó administrar antibióticos solo en caso de tener evidencia de una enfermedad bacteriana clínicamente relevante para ahorrar dinero, para evitar efectos secundarios o evitar la propagación de bacterias resistentes a los antibióticos. Es un éxito de la presente invención predecir el mayor riesgo de tener efectos secundarios graves o tener un resultado adverso inducido por antibióticos correlacionando un nivel determinado de Procalcitonina (PCT) o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos con dicho riesgo.

30 Por lo tanto, la determinación del nivel de procalcitonina (PCT) o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos antes del tratamiento de sujetos que padecen una enfermedad primaria no infecciosa con antibióticos es una medida absolutamente inevitable para identificar aquellos sujetos que tienen un mayor riesgo de tener un resultado adverso inducido por antibióticos.

35 Dicho resultado es preferiblemente un acontecimiento adverso. Un acontecimiento adverso se define como un acontecimiento que compromete la salud de un individuo. Dicho acontecimiento adverso no está restringido, pero puede seleccionarse del grupo que comprende un acontecimiento coronario, acontecimiento cardiovascular, muerte, insuficiencia cardíaca, diabetes, hipertensión. Los acontecimientos coronarios se definen como síndromes coronarios agudos letales o no letales, que incluye el infarto de miocardio o la muerte por cardiopatía isquémica. Los acontecimientos cardiovasculares se definen como síndromes coronarios agudos letales o no letales que incluyen el infarto de miocardio, derrame cerebral letal o no letal o muerte debido a enfermedad cardiovascular.

40 Dicho resultado adverso puede ser, efectos secundarios inducidos por el tratamiento con antibióticos, especialmente efectos secundarios graves inducidos por el tratamiento con antibióticos. Dichos efectos secundarios pueden incluir, tales como, malestar estomacal, diarrea y, en las mujeres, infecciones vaginales por hongos. Algunos sujetos pueden ser alérgicos a los antibióticos.

Dicho resultado o dicho riesgo puede, por ejemplo, considerar la supervivencia y/o un resultado funcional.

45 El término "resultado" en la presente memoria se refiere, por ejemplo, a la supervivencia del paciente después de un tiempo definido, p. ej., después de 3 días, 5 días, 10 días, 14 días, 20 días, 3 semanas, 4 semanas, 30 días, 45 días, 60 días, 90 días, 3 meses, 6 meses, 1 año, preferiblemente 30 días.

50 El término "resultado funcional" en el contexto de la presente invención se refiere al grado de gravedad de la enfermedad, es decir, el estado de salud del paciente después de un tiempo definido, p. ej., 3 días, 5 días, 10 días, 14 días, 20 días, 3 semanas, 4 semanas, 30 días, 45 días, 60 días, 90 días, 3 meses, 6 meses, 1 año, preferiblemente 30 días.

55 El resultado adverso puede ser, p. ej., la mortalidad. Esto significa que con los métodos de la presente invención, se pueden identificar sujetos para los cuales la administración de antibióticos conduciría a un mayor riesgo de un resultado

letal dentro de un período dado, p. ej., dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 20, 21, 30, 60 o 90 días después del inicio del tratamiento con un antibiótico.

5 La enfermedad primaria no infecciosa de la cual padece el sujeto puede seleccionarse preferiblemente del grupo de enfermedad cardiovascular, enfermedad cardíaca, cáncer, una enfermedad del SNC, diabetes, trastorno autoinmune y trastorno asociado con la inflamación.

10 Dicha enfermedad primaria puede ser, en un ejemplo particular, insuficiencia cardíaca. Los sujetos pueden, en una realización preferida, padecer insuficiencia cardíaca y/o dificultad para respirar. La insuficiencia cardíaca en la presente memoria se refiere preferiblemente a la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). La insuficiencia cardíaca puede ser preferiblemente insuficiencia cardíaca aguda (ICA) o insuficiencia cardíaca crónica.

15 La insuficiencia cardíaca es un estado cardíaco que aparece cuando un problema con la estructura o función del corazón afecta a su capacidad de suministrar suficiente flujo sanguíneo para satisfacer las necesidades del cuerpo. Puede causar una gran variedad de síntomas, particularmente dificultad para respirar e hinchazón de tobillos, pero algunos pacientes pueden estar completamente libres de síntomas. La insuficiencia cardíaca a menudo no se diagnostica debido a la falta de una definición universalmente acordada y los desafíos en el diagnóstico definitivo, particularmente en la primera etapa. Con la terapia adecuada, la insuficiencia cardíaca se puede controlar en la mayoría de los pacientes, pero es una afección potencialmente mortal y la enfermedad progresiva se asocia con una mortalidad anual del 10%. Es la causa principal de hospitalización en personas mayores de 65 años.

20 La dificultad para respirar (SoB, en inglés shortness of breath; también conocida como disnea o respiración dificultosa) se relaciona con una sensación de respiración difícil o incómoda o una sensación de no tener suficiente aire en un sujeto. La SoB puede tener muchas causas diferentes, entre ellas cardiopatías tales como el ataque cardíaco, insuficiencia cardíaca congestiva e hipertensión pulmonar.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el sujeto padece dificultad para respirar y posteriormente se le diagnostica insuficiencia cardíaca.

25 En el contexto de la presente invención, una concentración de PCT o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo por debajo de 200 pg/ml, preferiblemente por debajo de 150 pg/ml, más preferiblemente por debajo de 100 pg/ml, lo más preferiblemente por debajo de 50 pg/ml, en la muestra se correlaciona con un mayor riesgo inducido mediante la administración potencial de un antibiótico.

30 Estos valores se han determinado con un formato de ensayo de PCT (BRAHMS KRYPTOR PCT sensitive), que tiene la misma calibración en el intervalo de medición cuantitativa que un ensayo PCT más sensible (BRAHMS PCT LIA sensitive), siendo este último capaz de determinar cuantitativamente los niveles de PCT en la población normal, dando niveles medios de PCT. Los valores mencionados anteriormente pueden ser diferentes en otros ensayos de PCT, si estos se han calibrado de manera diferente de los BRAHMS KRYPTOR PCT sensitive. Por tanto, los valores mencionados anteriormente se aplicarán para tales ensayos de PCT calibrados de manera diferente, teniendo en cuenta las diferencias en la calibración. Una posibilidad de cuantificar la diferencia en la calibración es un análisis de comparación de métodos (correlación) del ensayo de PCT en cuestión con el PCT BRAHMS KRYPTOR sensitive midiendo la PCT en muestras utilizando ambos métodos. Otra posibilidad es determinar con el ensayo PCT en cuestión, dado que este ensayo tiene suficiente sensibilidad analítica, el nivel medio de PCT de una población normal representativa, comparar los resultados con los niveles medios de PCT y volver a calcular la calibración basada en la diferencia obtenida por esta comparación.

40 En una realización particular, se determina además al menos un parámetro clínico seleccionado del grupo que comprende: edad, sexo, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, tratamiento antihipertensivo, antecedentes de derrame cerebral, sibilancias, índice de masa corporal, frecuencia cardíaca, temperatura, presencia de diabetes mellitus y hábitos de fumar actuales, más preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en frecuencia cardíaca, temperatura, índice de masa corporal, presión arterial sistólica y presión arterial diastólica.

45 En algunas realizaciones particulares, se pueden determinar además otros parámetros de laboratorio, p. ej., el nivel de granulocitos neutrófilos o el nivel de marcadores de pronóstico adicionales, en particular otras hormonas peptídicas y fragmentos de las mismas o precursores o fragmentos de los mismos.

50 El término "muestra", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una muestra de fluido corporal obtenida con el propósito de diagnóstico, pronóstico o evaluación de un sujeto de interés, tal como un paciente. Las muestras de ensayo preferidas incluyen sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, esputo y derrames pleurales. Además, un experto en la técnica se daría cuenta de que algunas muestras de ensayo se analizarían más fácilmente después de un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo, separación de sangre completa en componentes de suero o plasma.

55 Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de saliva y una muestra de orina o un extracto de cualquiera de las muestras mencionadas anteriormente. Preferiblemente, la muestra es una muestra de sangre, lo más preferiblemente una muestra de suero o una muestra

de plasma.

5 El término "sujeto" como se utiliza en la presente memoria se refiere a un organismo humano o no humano vivo, preferiblemente un paciente que está recibiendo cuidados médicos o que debería recibir cuidados médicos debido a una enfermedad primaria no infecciosa. Esto incluye a personas sin enfermedad definida que están siendo investigadas por signos de patología. Por lo tanto, los métodos y ensayos descritos en la presente memoria se aplican tanto a enfermedades humanas como veterinarias.

10 Los "fragmentos" de PCT o precursores de la misma se refiere a fragmentos de al menos doce residuos de aminoácidos de longitud. PCT en el contexto de la presente invención se refiere preferiblemente a un péptido que abarca los residuos de aminoácidos 1-116, 2-116 o 3-116 o fragmentos de los mismos. La procalcitonina puede comprender modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, liposidación o derivatización. PCT en sí es un precursor de la calcitonina y katalcaina. La secuencia de aminoácidos de la PCT se ha dado en la SEQ ID NO: 1 (Fig. 4).

El término "nivel" en el contexto de la presente invención se refiere a la concentración (preferiblemente expresada como peso/volumen; p/v) de PCT (o un fragmento/precursor) en la muestra tomada del sujeto.

15 La determinación (o medición o detección) del nivel de PCT o un fragmento o un precursor o fragmento del mismo en la presente memoria se realiza utilizando un método de detección y/o un ensayo de diagnóstico como se explica a continuación.

20 Como se menciona en la presente memoria, un "ensayo" o "ensayo de diagnóstico" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo del diagnóstico. Dicho ensayo puede estar basado en la unión de un analito a detectar a una o más sondas de captura (moléculas de captura) con una cierta afinidad. Con respecto a la interacción entre las moléculas de captura y moléculas objetivo o moléculas de interés, la constante de afinidad es preferiblemente mayor que  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

25 En el contexto de la presente invención, las "moléculas de captura" son moléculas que pueden utilizarse para unir moléculas diana o moléculas de interés, es decir, analitos (es decir, en el contexto de la presente invención, el(los) péptido(s) cardiovascular(es)), de una muestra. Las moléculas de captura deben, por lo tanto, tener una forma adecuada, tanto espacial como en términos de características de la superficie, tales como carga superficial, hidrofobicidad, hidrofilia, presencia o ausencia de donadores y/o aceptores de Lewis, para unir específicamente las moléculas objetivo o moléculas de interés. Por este medio, la unión puede estar mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, van-der-Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrofóbicas o de enlaces de hidrógeno o una combinación de  
30 dos o más de las interacciones mencionadas anteriormente entre las moléculas de captura y las moléculas objetivo o moléculas de interés. En el contexto de la presente invención, las moléculas de captura se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de ARN, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glicoproteína. Preferiblemente, las moléculas de captura son anticuerpos, que incluyen fragmentos de los mismos con suficiente afinidad a una diana o molécula de interés, y que  
35 incluyen anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpos recombinantes, así como derivados modificados químicamente y/o bioquímicamente de dichos anticuerpos o fragmentos derivados de la cadena variante con una longitud de al menos 12 aminoácidos de la misma.

40 Los métodos de detección preferidos comprenden inmunoensayos en varios formatos tales como por ejemplo radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), matrices de perlas basadas en Luminex, ensayos de microarrays de proteínas y formatos de ensayo rápido tales como por ejemplo ensayos de tira inmunocromatográfica.

45 Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos tipo sandwich competitivos y no competitivos. En una realización particularmente preferida, el ensayo está en forma de un ensayo tipo sándwich, que es un inmunoensayo no competitivo, en donde la molécula a detectar y/o cuantificar está unida a un primer anticuerpo y a un segundo anticuerpo. El primer anticuerpo puede unirse a una fase sólida, p. ej., una perla, una superficie de un pocillo u otro recipiente, un chip o una tira, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que está marcado, p. ej., con un colorante, con un radioisótopo, o un resto reactivo o catalíticamente activo. La cantidad de anticuerpo marcado unido al analito se mide luego mediante un método apropiado. La composición general y los procedimientos involucrados con los "ensayos tipo sandwich" están bien establecidos y son conocidos por el experto en la técnica. (The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª ed. (Mayo de 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C et al., Curr Opin Chem Biol. Febrero de 2006; 10(1):4-10. PMID: 16376134).

55 En una realización particularmente preferida, el ensayo comprende dos moléculas de captura, preferiblemente anticuerpos que ambos están presentes como dispersiones en una mezcla de reacción líquida, en donde un primer componente de marcaje está unido a la primera molécula de captura, en donde dicho primer componente de marcaje es parte de un sistema de marcaje basado o en la amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia, y un segundo componente de marcaje de dicho sistema de marcaje se une a la segunda molécula de captura, de manera que tras la unión de ambas moléculas de captura al analito se genera una señal que se puede medir que permite la detección de los complejos tipo sándwich formados en la solución que comprende la muestra.

Aún más preferido, dicho sistema de marcaje comprende criptatos de tierras raras o quelatos de tierras raras en

combinación con un colorante de fluorescencia o un colorante de quimioluminiscencia, en particular un colorante del tipo cianina.

5 En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en fluorescencia comprenden el uso de colorantes, que pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que comprende FAM (5- o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, fluoresceínisotiocianato (FITC), IRD-700/800, colorantes de cianina, tales como CY3, CY5, CY3,5, CY5,5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-  
10 dimetoxifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxi-rodamina-6G (R6G5), 6-carboxi-rodamina-6G (R6G6), rodamina, verde de rodamina, rojo de rodamina, rodamina 110, colorantes de BODIPY, tales como BODIPY TMR, verde de Oregón, cumarinas tal como umbeliferona, bencimidias, tal como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como rojo Texas, amarillo Yakima, Flúor Alexa, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina y similares.

15 En el contexto de la presente invención, los ensayos basados en quimioluminiscencia comprenden el uso de colorantes, basados en los principios físicos descritos para materiales quimioluminiscentes en Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, 4ª ed., Editor ejecutivo, J. I. Kroschwitz; editor, M. Howe-Grant, John Wiley & Sons, 1993, vol.15, p. 518-562, que incluye las citas en las páginas 551-562. Los colorantes quimioluminiscentes preferidos son esteres de acridinio.

20 La presente invención también se refiere al uso de un método según la invención para la estratificación de sujetos que padecen una enfermedad primaria no infecciosa en un grupo de sujetos que tienen un mayor riesgo de un resultado adverso inducido mediante la administración de un antibiótico y un grupo de sujetos que no tienen riesgo inducido mediante la administración de un antibiótico.

25 Además, la invención atañe al uso de un kit que comprende uno o más anticuerpos dirigidos contra PCT o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo para la estratificación de sujetos que padecen una enfermedad primaria no infecciosa en un grupo de sujetos que tienen un mayor riesgo de un resultado adverso inducido mediante la administración de un antibiótico y un grupo de sujetos que no tienen riesgo inducido mediante la administración de un antibiótico.

**Secuencias**

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

1	APFRSALE 1	APFRSALE 1	APFRSALE 1	APFRSALE 1	APFRSALE 1	APFRSALE 1
51	SLDSPRSK 51	SLDSPRSK 51	SLDSPRSK 51	SLDSPRSK 51	SLDSPRSK 51	SLDSPRSK 51
101	LERDHRPH 101	LERDHRPH 101	LERDHRPH 101	LERDHRPH 101	LERDHRPH 101	LERDHRPH 101

30 **Descripción de los dibujos**

Fig. 1: Resumen de pacientes en el estudio clínico del ejemplo 1.

35 Fig. 2: La figura 2 ilustra la supervivencia (en %) de los pacientes diagnosticados con ICA en el estudio del ejemplo 1 a lo largo del tiempo (en semanas) hasta 90 días desde el ingreso. Las líneas continuas se refieren al grupo de pacientes que no han recibido tratamiento con antibióticos, mientras que las líneas discontinuas se refieren a pacientes tratados con antibióticos. A: todos los pacientes diagnosticados con ICA (n=561), tratados con antibióticos: n=104 (18 muertos después de 90 días), no tratados con antibióticos: n=457 (46 muertos después de 90 días), p=0,03011; B: pacientes diagnosticados con ICA y que tienen niveles de PCT en plasma de 0,0207 a 0,0511 pg/ml (n=112), tratados con antibióticos: n=17 (4 muertos después de 90 días), no tratados con antibióticos: n=95 (5 muertos después de 90 días), p=0,00632; C: pacientes diagnosticados con ICA y que tienen niveles de PCT en plasma de 0,0511 a 0,205 pg/ml (n=336), tratados con antibióticos: n=55 (9 muertos después de 90 días), no tratados con antibióticos: n=281 (24 muertos después de 90 días), p=0,06328; D: pacientes diagnosticados con ICA y que tienen niveles de PCT en plasma de 0,205 a 230 pg/ml (n=113), tratados con antibióticos: n 32 (5 muertos después de 90 días), no tratados con antibióticos: n=81 (17 muertos después de 90 días), p=0,06328.

45 Fig. 3: La figura 3 ilustra la supervivencia (en %) de los pacientes diagnosticados con ICA en el estudio del ejemplo 1 a lo largo del tiempo (en días) hasta 90 días desde el ingreso. Las líneas continuas se refieren al grupo de pacientes que no han recibido tratamiento con antibióticos, mientras que las líneas punteadas se refieren a pacientes tratados con antibióticos. Las figuras 3A-D corresponden a los mismos grupos de pacientes que en las figuras 2A-D, respectivamente. Los datos de la Fig. 3 se han ajustado para la aparición en los pacientes de sibilancias, antecedentes de derrame cerebral y nivel en sangre de granulocitos neutrófilos para explicar las posibles diferencias entre el grupo tratado con antibióticos y el grupo no tratado.

50 Fig. 4: Secuencia de aminoácidos de Procalcitonina (PCT), SEQ ID NO: 1

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Estudio clínico: 15 centros de inscripción: que reclutan 1641 pacientes con dificultad para respirar (SoB) e insuficiencia cardíaca aguda (ICA)

5 Este estudio fue aprobado por la Juntas de Revisión Institucional de 8 instituciones. Se inscribieron 1641 pacientes de quince centros de marzo de 2007 a febrero de 2008, que incluyeron 8 centros de Estados Unidos, 6 de Europa y 1 de Nueva Zelanda. Para ser aptos, los pacientes tenían que informar de la dificultad para respirar como su molestia principal al presentarse en el departamento de emergencias. Se excluyeron los pacientes menores de 18 años o que no podían dar su consentimiento. También se excluyeron los pacientes con un infarto de miocardio agudo con elevación de ST o en hemodiálisis. Se administraron antibióticos a algunos de los pacientes en la evaluación del médico responsable del tratamiento.

Para cada paciente inscrito en el estudio, el médico de emergencia, cegado a los resultados de los marcadores en investigación, evaluó la probabilidad de que el paciente tuviera IC aguda o neumonía a través de dos cuestionarios separados de la escala Likert, asignando un valor de 0 a 100 por ciento de certeza clínica.

15 Resumen de los detalles del estudio:

- Se incluyeron pacientes que se presentaron al departamento de emergencias (DE) con SoB no por trauma, o infarto de miocardio (IM) obvio, y no en diálisis.
- Después del consentimiento, evaluación de EM de la probabilidad de insuficiencia cardíaca y/o neumonía.
- Dos cardiólogos independientes acordaron el diagnóstico final después del alta.
- 20 - Seguimiento para la supervivencia durante 90 días; Resultado "Todas las causas de mortalidad dentro de los 90 días".

Tabla 1 y fig. 1, resumen más detallado de los pacientes en el estudio.

Confirmación de diagnóstico

25 Para determinar el diagnóstico estándar de oro, dos cardiólogos revisaron de forma independiente todos los registros médicos pertenecientes al paciente y clasificaron de forma independiente el diagnóstico como disnea debido a insuficiencia cardíaca, neumonía o debido a otra causa subyacente. Ambos cardiólogos estaban cegados a las evaluaciones de los demás, los marcadores de investigación y el diagnóstico preliminar del médico de emergencia. Tenían acceso a los formularios de informe de casos del DE que incluían los antecedentes médicos, más datos sobre la radiografía de tórax, angiografía con radionúclidos, ecocardiografía y cateterismo cardíaco, así como la trayectoria en el hospital para los que ingresaron. En caso de desacuerdo diagnóstico entre los revisores de cardiología, se les pidió que se reunieran para llegar a una conclusión común. En caso de que no pudieran llegar a una conclusión común, el comité de puntos finales asignó un tercer juez de cardiología para determinar un diagnóstico final. Para llegar a un diagnóstico de neumonía, tuvieron que cumplirse los criterios modificados de Fine et al 1990 y Leroy et al 1995 (Leroy et al. Intensive Care Med (1995) 21:24-31; Fine et al. Am J Med 1990;89:713-721).

35 Medición de biomarcadores

Se recogieron todas las muestras de sangre en tubos de plástico que contenían EDTA y se almacenó el plasma a -70°C en viales de plástico en el congelador. Se midió la PCT con un inmunoensayo de quimioluminiscencia en sándwich automatizado en el Sistema KRYPTOR (B.R.A.H.M.S AG, Hennigsdorf, Alemania). El ensayo se basa en el ensayo de quimioluminiscencia en sándwich que se describe en detalle en otro sitio (Morgenthaler et al., Clin Chem 2002; 48:788-790).

Análisis estadístico

45 Los valores se expresan como medias y desviaciones estándar o recuentos y porcentajes, según sea apropiado. Se compararon los grupos de diagnóstico con pruebas t de muestras independientes y pruebas de chi cuadrado según fuera apropiado. Se evaluaron dos objetivos principales utilizando un valor p de 0,0125 como el criterio de significación para cada uno. Todos los demás análisis son exploratorios y utilizan para la significancia un valor p de 0,05. Los análisis secundarios utilizaron regresión logística, correlación de Spearman y análisis de curva ROC. Se evaluó la predicción de resultados utilizando modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Se evaluó el valor predictivo de cada modelo mediante el modelo estadístico de chi cuadrado de la relación de probabilidad. Se utilizaron las curvas de supervivencia representadas gráficamente mediante el método de Kaplan-Meier, con fines ilustrativos y se aplicaron las pruebas de log-rank para evaluar las diferencias de supervivencia.

Resultados

Se evaluó el resultado a 90 días en términos de supervivencia para pacientes con dificultad para respirar que han sido diagnosticados con insuficiencia cardíaca aguda (ICA). 457 pacientes diagnosticados con ICA no tuvieron tratamiento con antibióticos después de la entrada en el estudio, se administraron antibióticos a 104. 90 días después de la admisión en el estudio, 46 de los pacientes no tratados con antibióticos habían muerto (10,1%). De los pacientes tratados con antibióticos, 18 pacientes habían muerto hasta el 90° día (17,3%).

El resultado (tasa de supervivencia) para los pacientes diagnosticados con ICA se ilustra en las fig. 2A-D. Se indica mediante líneas continuas el grupo de pacientes sin tratamiento con antibióticos, se indica mediante líneas discontinuas el grupo de pacientes con tratamiento con antibióticos. La Fig. 2A muestra el resultado para pacientes, independiente de su nivel de PCT en plasma. La figura 2B resume a los pacientes con niveles de PCT en plasma de 0,0207 a 0,0511 pg/ml (n=112), la figura 2C resume a los pacientes con niveles de PCT en plasma de 0,0511 a 0,205 pg/ml (n=336), la figura 2D resume a los pacientes con niveles de PCT en plasma superiores a 0,205 pg/ml (n=113). Los resultados demuestran que para pacientes con niveles bajos de PCT, es decir, por debajo de aproximadamente 0,205 pg/ml y particularmente por debajo de aproximadamente 0,0511 pg/ml, la tasa de supervivencia es menor en el grupo tratado con antibióticos que en el grupo no tratado.

Las Figuras 3A-D corresponden a las Figuras 2A-D respectivas, excepto que los resultados se han ajustado para las covariantes "aparición de sibilancias", "antecedentes de derrame cerebral" y "nivel sanguíneo de granulocitos neutrófilos" en los pacientes para explicar las diferencias entre los grupos de pacientes tratados con antibióticos y no tratados. Los resultados de la Fig. 3 muestran que en pacientes con niveles de PCT en plasma inferiores a aproximadamente 0,0511 pg/ml, la mortalidad es mayor en el grupo de pacientes tratados con antibióticos que en los pacientes que no han sido tratados con antibióticos.

Tabla 1: Características del paciente mediante diagnóstico

Variables	N	Sin ICA (N=1073)	ICA (N=568)	P
<b>Demografía</b>				
Edad	1641	59,8±17,0	71,2±13,8	<0,001
Género masculino	1641	504 (47,0)	355 (62,5)	<0,001
Raza				
Blanca	1626	659 (62,1)	431 (76,3)	<0,001
Negra		356 (33,6)	120 (21,2)	
Otra		46 (4,3)	14 (2,5)	
<b>Historia reciente</b>				
Fumar	1593	344 (33,0)	125 (22,7)	<0,001
Sibilancias	1543	359 (35,4)	109 (20,6)	<0,001
Ganancia de peso	1438	112 (11,8)	137 (28,0)	<0,001
Sudores nocturnos	1495	230 (23,4)	94 (18,3)	0,025
Ortopnea	1536	349 (35,0)	340 (63,0)	<0,001
Disnea en reposo	1605	518 (49,3)	277 (49,9)	0,834
<b>Variables del examen</b>				
Ritmo cardíaco	1632	92,6±21,6	89,2±24,8	0,005
PS sistólica	1631	139,7±26,8	143,0±31,8	0,027
PS diastólica	1630	79,6±16,4	83,0±18,7	<0,001
IMC	1399	29,6±9,1	28,5±8,1	0,035
Estertores	1624	216 (20,3)	308 (54,8)	<0,001
S3	1580	6 (0,6)	38 (7,0)	<0,001
Murmullo	1604	98 (9,3)	156 (28,3)	<0,001
PVY	1539	71 (7,0)	200 (38,2)	<0,001
Edema	1615	244 (23,1)	344 (61,5)	<0,001
Ascitis	1579	15 (1,5)	26 (4,8)	<0,001
Sibilancias	1619	350 (33,0)	102 (18,2)	<0,001
<b>Variables de la historia</b>				



## ES 2 751 105 T3

Arritmia	1555	168 (16,6)	237 (43,6)	<0,001
Asma	1594	288 (27,7)	30 (5,4)	<0,001
CRI	1584	75 (7,2)	171 (31,3)	<0,001
IC	1597	203 (19,6)	366 (65,2)	<0,001
EAC	1587	232 (22,3)	271 (49,5)	<0,001
EPOC	1594	341 (32,7)	130 (23,6)	<0,001
DM	1621	244 (23,1)	218 (38,6)	<0,001
Hiperlipidemia	1549	330 (32,4)	240 (45,3)	<0,001
Hipertensión	1614	642 (60,9)	438 (78,2)	<0,001
IM	1584	128 (12,3)	172 (31,5)	<0,001
Embolia pulmonar	1604	49 (4,7)	36 (6,5)	0,127
CABG	1615	66 (6,2)	92 (16,5)	<0,001
Angioplastia/Stent	1602	96 (9,1)	108 (19,6)	<0,001
Derrame cerebral/CV A	1608	89 (8,5)	76 (13,7)	0,001
Marcapasos/ICD	1616	55 (5,2)	107 (19,1)	<0,001
Válvula protésica	1612	13 (1,2)	30 (5,4)	<0,001

Notas: Los valores son la media±DE o N(%) y se comparan con la prueba t de muestras independientes o las pruebas exactas de Fisher, respectivamente.

### Listado de secuencias

- 5 <110> B.R.A.H.M.S AG
- <120> Evaluación de riesgos para el tratamiento con antibióticos en pacientes que padecen enfermedades primarias no infecciosas determinando el nivel de procalcitonina
- 10 <130> B60430PCT
- <150> EP09157886.4
- <151> 14-04-2009
- 15 <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 116
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 751 105 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gln Asn Ala Asn  
 115

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método de diagnóstico in vitro para la identificación de un sujeto que padece una enfermedad primaria no infecciosa que tiene un mayor riesgo de un resultado adverso que está potencialmente inducido mediante la administración de un antibiótico a dicho sujeto, que comprende las etapas de:
- (i) determinar en una muestra de sangre, plasma o suero de dicho sujeto que padece una enfermedad primaria no infecciosa el nivel de Procalcitonina (PCT) o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos,
  - 10 (ii) correlacionar el nivel determinado con un riesgo potencial inducido mediante la administración de un antibiótico,
  - (iii) en donde una concentración de PCT o un fragmento o un precursor o fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos por debajo de 200 pg/ml en dicha muestra se correlaciona con un mayor riesgo inducido mediante la administración potencial de un antibiótico y en donde dicho sujeto no muestra ningún síntoma de una infección bacteriana.
- 15 2. Método de diagnóstico in vitro según la reivindicación 1, en donde dicho resultado es un acontecimiento adverso.
3. Método de diagnóstico in vitro según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho resultado es la mortalidad.
4. Método de diagnóstico in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho sujeto tiene una enfermedad primaria no infecciosa seleccionada del grupo de enfermedad cardiovascular, enfermedad cardíaca, 20 cáncer, una enfermedad del SNC, diabetes, trastorno autoinmune, y trastorno asociado con la inflamación.
5. Método de diagnóstico in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha enfermedad primaria es la insuficiencia cardíaca congestiva.
6. Método de diagnóstico in vitro según la reivindicación 5, en donde dicha enfermedad primaria es la insuficiencia cardíaca aguda.
- 25 7. Método de diagnóstico in vitro según la reivindicación 5, en donde dicha enfermedad primaria es la insuficiencia cardíaca crónica.
8. Método de diagnóstico in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde una concentración de PCT o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos por debajo de 50 pg/ml en dicha muestra se correlaciona con un mayor riesgo inducido 30 mediante la administración potencial de un antibiótico.
9. Uso de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la estratificación de sujetos que padecen una enfermedad primaria no infecciosa en un grupo de sujetos que tienen un mayor riesgo de un resultado adverso inducido mediante la administración de un antibiótico y un grupo de sujetos que no tienen riesgo inducido mediante la administración de un antibiótico.
- 35 10. Uso de un kit para realizar un método de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende uno o más anticuerpos dirigidos contra la PCT o un fragmento de la misma o un precursor o fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos para la estratificación de sujetos que padecen una enfermedad primaria no infecciosa en un grupo de sujetos que tienen un mayor riesgo de un resultado adverso inducido mediante la administración de un antibiótico y un grupo de sujetos que no tienen riesgo inducido por la 40 administración de un antibiótico.

Fig. 1



Fig. 2

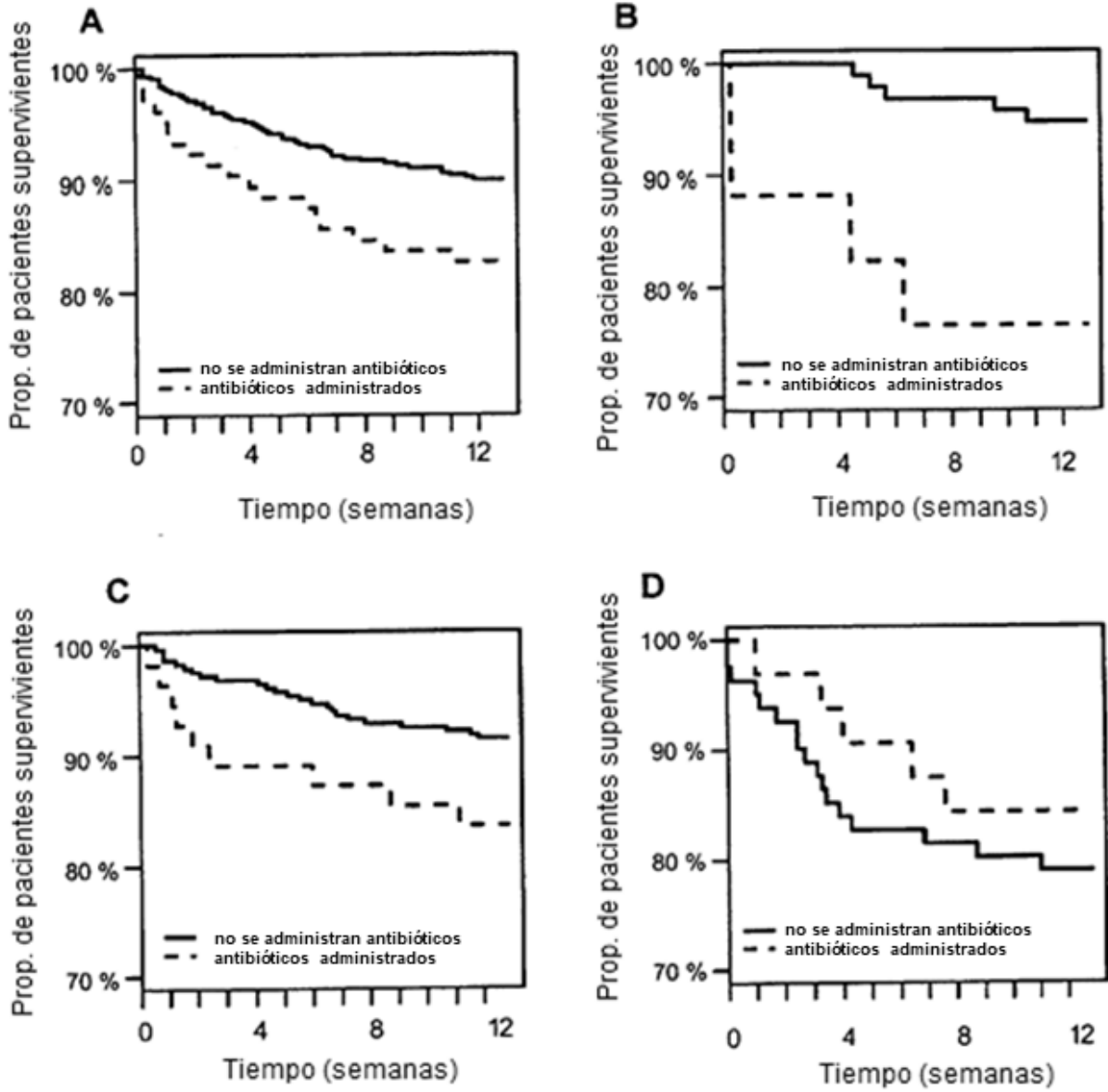
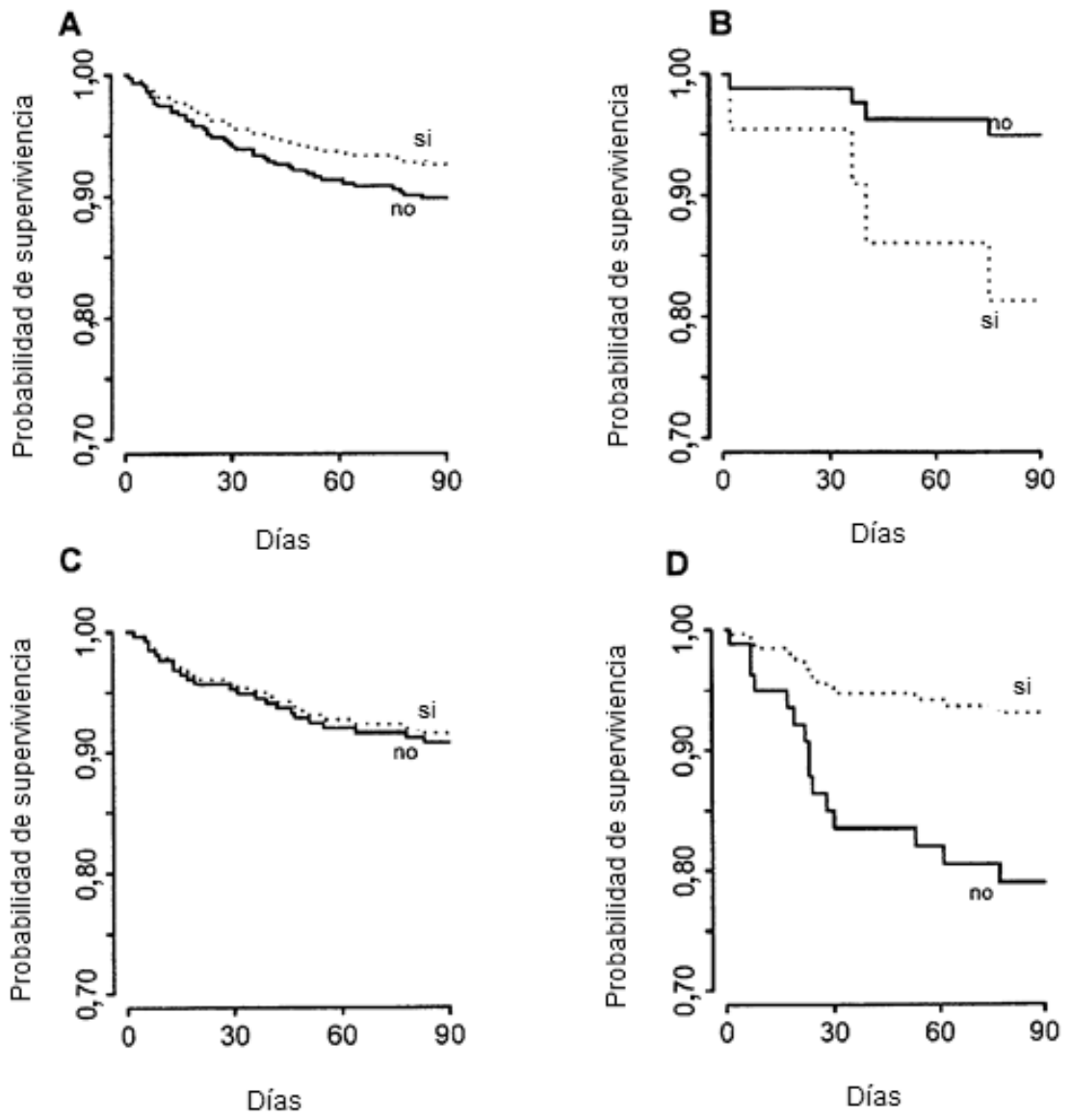


Fig. 3



**Fig. 4**

SEQ ID NO:1

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