

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 001**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2013 E 18164302 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3361260**

54 Título: **Un método para diagnosticar o monitorizar la función 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:
08.03.2021

73 Titular/es:

SPHINGOTEC GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 15 A
16761 Hennigsdorf, DE

72 Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 810 001 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

Un método para diagnosticar o monitorizar la función renal

Se describe 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 donde dicho suceso adverso se selecciona a partir del grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo insuficiencia renal, pérdida de la función renal y enfermedad renal en estadio terminal o la muerte debida a una disfunción renal, incluyendo insuficiencia renal, pérdida de la función renal y enfermedad renal en 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

- (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 una disfunción renal, en donde un nivel elevado superior a determinado umbral, es predictivo o diagnóstico de una 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 donde 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 donde un nivel inferior a determinado umbral es predictivo del éxito de una terapia o intervención.

La materia objeto de la presente invención es un método para diagnosticar o monitorizar una función renal en un sujeto 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

en donde durante la medición de seguimiento, un cambio relativo de la proencefalina y fragmentos de la misma que se reduce, se correlaciona con la mejora de la función renal del sujeto, o en donde durante la medición de seguimiento, un cambio relativo de la proencefalina y un fragmento de la misma que se incrementa, se correlaciona con el empeoramiento de la función renal del sujeto, en donde dicha proencefalina o fragmento de la misma se selecciona a partir del 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; y

en donde dicha determinación de la proencefalina o fragmentos de la misma de al menos 5 aminoácidos se realiza más de una vez en un paciente.

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 tiene varias funciones fisiológicas. En el SNC regula negativamente la señalización del dolor asociada a la sustancia P, desempeña funciones como citocina (Plotnikoff et al., 1997). Los péptidos relacionados con la proencefalina muestran actividades antibióticas (Goumon et al., 1998). La proencefalina y la enkefalina muestran 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).

El documento nº WO 2012/017071 da a conocer un marcador renal denominado PERLECAN.

La materia objeto de la presente descripción 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 descripción es un método para el diagnóstico o la monitorización de la función renal en un sujeto o el diagnóstico de una disfunción renal en un sujeto o la predicción del riesgo de muerte o sucesos adversos en un sujeto enfermo.

Un objetivo de la presente descripción era además proporcionar la capacidad de 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.

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

5 La materia objeto de la presente descripción 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 donde dicho suceso adverso se selecciona a partir del grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en estadio terminal o la muerte debida a una disfunción renal, incluyendo insuficiencia renal, pérdida de función renal y enfermedad renal en 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

15 (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

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 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.

25 Según la presente descripción, dicha proencefalina o fragmentos de la misma no es leu-encefalina y no es met-encefalina. En otro ejemplo descrito, dicho fragmento de proencefalina es MR-proencefalina (MRPENK) o un fragmento de la misma que presenta por lo menos 5 aminoácidos.

30 En otras palabras: la materia objeto de la presente descripción 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 donde dicho suceso adverso se selecciona a partir del grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en estadio terminal o la muerte debida a una disfunción renal, incluyendo insuficiencia renal, pérdida de función renal y enfermedad renal en estadio terminal, o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención que comprende:

35 • determinar el nivel de un 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

40 (b) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con la disfunción renal, en donde 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 donde un nivel elevado superior a determinado umbral es predictivo de un riesgo incrementado de dichos sucesos adversos, o

45 (d) correlacionar dicho nivel de analito inmunorreactivo con el éxito de una terapia o intervención en un sujeto enfermo, en donde un nivel inferior a determinado umbral es predictivo del éxito de la terapia o intervención.

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

50 Eso 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, ya 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 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". En una 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 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 realización específica de la presente invención, dicho, al menos uno, agente de unión se une a MR-proencefalina (MRPENK) o a 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 realización de la invención, dicho sujeto no ha padecido un ictus. En otra realización, dicho sujeto no es un paciente de ictus agudo.
- La expresión "nivel elevado" significa 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 una 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 de un tratamiento con ácido hialurónico en pacientes que han recibido una 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 una recuperación de la función renal en pacientes con función renal deteriorada antes y después de una terapia sustitutiva renal y/o intervenciones farmacéuticas utilizando la medición de PENK o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.
- Puede seleccionarse un fluido corporal a partir del grupo que comprende sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo (lcr) 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 la 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 un diagnóstico de disfunción renal, en donde 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, 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 predictiva de un riesgo incrementado de muerte o de sucesos adversos. También en ese 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 padecer una enfermedad seleccionada a partir de 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 cardiaca 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.

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

10 La materia objeto según la presente descripción 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, a proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos. En un ejemplo, dicho agente de unión se selecciona a partir del grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una estructura que no es una Ig que se une a proencefalina o a fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos. En un ejemplo específico, dicho agente de unión se une a una región con secuencias seleccionadas a partir del 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 de la [Met]encefalina SEC ID nº 3 y la [Leu]encefalina SEC ID nº 4. En un ejemplo específico, dicho al menos un agente de unión se une a una región con las secuencias seleccionadas a partir del grupo que comprende la SEC ID nº 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En otro ejemplo específico, dicho, al menos uno, agente de unión se une a una región con secuencias seleccionadas a partir del grupo que comprende las SEC ID nº 2, 5, 6 y 10. En otro ejemplo muy específico, dicho agente de unión se une a la proencefalina 119-159, fragmento de la región intermedia de proencefalina, MRPENK.

- 20 La proencefalina presenta la secuencia siguiente:

SEC ID nº 1 (proencefalina (1-243))

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLP SLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL
RENSKPEESHLLAKRYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMK
KDAEEDDSLANSDDLKELLETDGDNRRERSHHQDGS DNEEEVSKRYGGFMRGLKRSPQL
EDEAKELQKRYGGFMRRVGRPEWWM DYQKRYGGFLKRFAEALPSDEEGESYSKEVPE
MEKRYGGF MRF

Los fragmentos de proencefalina que pueden determinarse en un fluido corporal pueden seleccionarse, por ejemplo, a partir del grupo de los fragmentos siguientes:

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

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLP SLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL

RENSKPEESHLLA

SEC ID nº 3 (Met-encefalina)

YGGFM

SEC ID nº 4 (Leu-encefalina)

- 30 YGGFL

SEC ID nº 5 (proencefalina 90-109)

MDELYPMEPEEEANGSEILA

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

DAEEDDSLANSDDLKELLETDGDNRRERSHHQDGS DNEEEVVS

- 35 SEC ID nº 7 (Met-encefalina-Arg-Gly-Leu)

YGGFMRGL

SEC ID nº 8 (proencefalina 172-183)

SPQLEDEAKELQ

SEC ID nº 9 (proencefalina 193-203)

VGRPEWWMDYQ

SEC ID nº 10 (proencefalina 213-234)

FAEALPSDEEGESYSKEVPEME

SEC ID nº 11 (proencefalina 213-241)

5 FAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGF M

SEC ID nº 12 (Met-encefalina-Arg-Phe)

YGGFMRP

10 La determinación del nivel de proencefalina, incluyendo Leu-encefalina y Met-encefalina o fragmentos de las mismas, puede referirse a que se determina la inmunorreactividad frente a la proencefalina o fragmentos de la misma, incluyendo Leu-encefalina y Met-encefalina. Un agente de unión utilizado para la determinación de proencefalina, incluyendo Leu-encefalina o Met-encefalina o fragmentos de las mismas, 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.

15 De esta manera, según la presente descripción, se determina en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto 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 cualquiera de los péptidos y fragmentos de péptido anteriores (es decir, proencefalina (PENK) y fragmentos según cualquiera de las secuencias 1 a 12), y se correlaciona con las realizaciones específicas de relevancia clínica.

20 En un ejemplo más específico del método según la presente descripción, se determina el nivel de MRPENK (SEC ID nº 6: proencefalina 119-159, fragmento de la región intermedia de proencefalina, MRPENK). En un ejemplo más específico, 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 los ejemplos mencionados anteriormente indicados según la descripción con el ejemplo específico de relevancia clínica, por ejemplo:

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

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

35 Por tanto, la materia objeto de la presente descripción 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 donde dicho suceso adverso se selecciona a partir del grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en estadio terminal o la muerte debido a una disfunción renal, incluyendo insuficiencia renal, pérdida de función renal y enfermedad renal en estadio terminal o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención 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 un péptido seleccionado a partir del grupo que comprende los péptidos y fragmentos de SEC ID nº 1 a nº 12 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto, y:
- 45 (a) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con una función renal, en un sujeto, o
- (b) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con una disfunción renal, en donde un nivel elevado superior a determinado umbral es predictivo o diagnóstico de disfunción renal en dicho sujeto, o
- 50 (c) correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con dicho riesgo de un suceso

adverso en un sujeto enfermo, en donde 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 donde un nivel inferior a determinado umbral es predictivo de éxito de la terapia o intervención.

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 a partir del grupo que comprende proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos. En un ejemplo específico, dicho, al menos uno, agente de unión se une a una región con las secuencias seleccionadas a partir del 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, al menos uno, agente de unión se une a una región con secuencias seleccionadas a partir del grupo que comprende SEC ID nº 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En otro ejemplo específico, dicho, al menos uno, agente de unión se une a una región con secuencias seleccionadas a partir del 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 la 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 una realización de la invención, dicho agente de unión se selecciona a partir del grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una estructura que no es Ig que se une a proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.

En un ejemplo más específico, 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 la región intermedia de proencefalina, MRPENK (SEC ID nº 6) en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto.

En una 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 1. Todos los umbrales y valores deben considerarse en correlación con el ensayo y la calibración utilizados según el Ejemplo 1. El experto en la materia puede saber 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).

Según la invención, el agente de unión de diagnóstico para proencefalina se selecciona a partir del grupo que consiste en anticuerpos, por ejemplo IgG, una inmunoglobulina de longitud completa típica o fragmentos de anticuerpo que contienen por lo menos el dominio de variable F de la cadena pesada y/o ligera, tal como, por ejemplo, anticuerpos acoplados químicamente (unión de antígeno a fragmento), incluyendo, aunque sin limitación, fragmentos Fab que incluyen minicuerpos Fab, anticuerpo Fab de cadena sencilla, anticuerpo Fab monovalente con marcadores 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, BITE® (acoplador biespecífico de linfocitos T), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo, de una clase diferente a G, anticuerpos de dominio único, por ejemplo, nanocuerpos derivados de inmunoglobulina de camélidos o de peces.

En un ejemplo específico, el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma se mide con un ensayo que utiliza agentes de unión seleccionados a partir del grupo que comprende aptámeros, estructuras que no son Ig tal como se describe con mayor detalle posteriormente, que se unen a proencefalina o a 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 preferida es superior a 10^9 M^{-1} , lo 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 la 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, Berlín, 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 sintética, SEC ID nº 6) o recombinante o fragmentos de la misma.

Además de anticuerpos, también es bien conocido en la técnica que otras estructuras de biopolímero forman un complejo con una molécula diana y han sido utilizadas para la generación de biopolímeros altamente específicos hacia una diana. Son ejemplos, los aptámeros, spiegelmeros, anticalinas y conotoxinas. Las estructuras que no son Ig pueden ser estructuras proteicas y pueden utilizarse como agentes miméticos de anticuerpo ya que son capaces de unirse a ligandos o antígenos. Las estructuras que no son Ig pueden seleccionarse a partir del grupo que comprende estructuras que no son Ig a base de tetranectina (por ejemplo, descritas en el documento US 2010/0028995), estructuras de fibronectina (por ejemplo, descritas en el documento EP 1266 025; estructuras basadas en lipocalina (por ejemplo, descritas en el documento WO 2011/154420), estructuras de ubicuitina (por ejemplo, descritas en el documento WO 2011/073214), estructuras de transferencia (por ejemplo descritas en el documento US 2004/0023334), estructuras de proteína A (por ejemplo, descritas en el documento EP 2231860), estructuras basadas en la repetición de anquirina (por ejemplo, descritas en el documento WO 2010/060748), estructuras de microproteínas (preferentemente microproteínas que forman un nudo de cistina) (por ejemplo, descritas en el documento EP 2314308), estructuras basadas en el dominio Fyn SH3 (por ejemplo, descritas en el documento WO 2011/023685), estructuras basadas en el dominio EGFR-A (por ejemplo, descritas en el documento WO 2005/040229) y estructuras basadas en el dominio de Kunitz (por ejemplo, descritas en el documento EP 1941867).

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

En una realización específica, 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.

En una 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 133-140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) y los aminoácidos 152-159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14), en donde cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

En una realización de los ensayos para determinar la proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra según la presente invención, la sensibilidad de ensayo del dicho ensayo es capaz de cuantificar la proencefalina o fragmentos de proencefalina de sujetos sanos y es <15 pmol/L, preferentemente <10 pmol/L y más preferentemente <6 pmol/L.

Es materia objeto de la presente descripción 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 a partir del grupo que comprende los péptidos y fragmentos de SEC ID nº 1 a 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 donde dicho suceso adverso se selecciona a partir del grupo que comprende un agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en estadio terminal o la muerte debida a disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en estadio terminal, o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención. En una realización de la invención, dicho agente de unión se selecciona a partir del grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una estructura que no es Ig que se une a proencefalina o a fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos. En un ejemplo específico, dicho, al menos uno, agente de unión se une a una región con secuencias seleccionadas a partir del 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, al menos uno, agente de unión se une a una región con las secuencias seleccionadas a partir del grupo que comprende SEC ID nº 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En otro ejemplo específico, dicho, al menos uno, agente de unión se une a una región con secuencias seleccionadas a partir del 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 la región intermedia de proencefalina, MRPENK.

En un ejemplo más específico, el al menos uno agente de unión se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de la proencefalina 119-159, fragmento de la 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 donde 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, determinada cuantitativa, semicuantitativa o cualitativamente mediante una reacción de unión de un agente de unión a dicho analito, en donde preferentemente el agente de unión presenta una constante de afinidad para unirse 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 una estructura que no es Ig, y la reacción de unión es un inmunoensayo.

Los presentes métodos que emplean PENK y fragmentos de la misma, 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 una disfunción renal en un sujeto o (c) la predicción o monitorización del riesgo de un suceso adverso en un sujeto enfermo, en donde dicho suceso adverso se selecciona a partir del grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en estadio terminal o la muerte debida a una disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de la función renal y la enfermedad renal en estadio terminal o (d) la predicción o monitorización del éxito de una terapia o intervención. En primer lugar, PENK y fragmentos de la misma como biomarcador para los usos anteriormente indicados, es un marcador independiente de una inflamación. Ésta es una característica importante, ya que la mayoría de los biomarcadores renales conocidos, tales como NGAL y KIM, son dependientes de una inflamación, lo que significa que si el sujeto presenta una inflamación, por ejemplo, en una sepsis, la elevación de NGAL o KIM puede deberse a una inflamación o puede deberse a una 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, lo que convierte difícil una aplicación clínica de esos marcadores renales en algunas enfermedades y es imposible en otras. En contraste con lo anterior, según los presentes métodos puede utilizarse 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 de la misma como biomarcador en los métodos de la presente descripción, 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 descripción 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 donde dicho suceso adverso se selecciona a partir del grupo que comprende un agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en estadio terminal o la muerte debida a disfunción renal, incluyendo insuficiencia renal, pérdida de función renal y enfermedad renal en estadio terminal o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención con las etapas y características anteriormente indicadas, en donde se utiliza un umbral independiente del estado de inflamación.

Otra ventaja de los métodos anteriormente indicados y la utilización de PENK y sus 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 donde dicho suceso adverso se selecciona a partir del grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en estadio terminal o la muerte debida a disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en estadio terminal o (d) predecir o monitorizar el éxito de una terapia o intervención, es que PENK y sus fragmentos como biomarcador son un biomarcador muy temprano de la función renal, disfunción renal, riesgo de un suceso adverso, éxito de una terapia o intervención. Muy temprano significa, por ejemplo, más temprano que la creatinina y más temprano 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 muy graves el día del ingreso con su tasa de mortalidad a los 7 días: las concentraciones de PENK de los supervivientes difieren significativamente de las de los no supervivientes, mientras que esto no es el caso para la aclaramiento de la creatinina. La mortalidad en esa población de pacientes está dirigida principalmente por una 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 una disfunción renal.

Un objeto de la presente descripción es también 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 donde dicho suceso adverso se selecciona a partir del grupo que comprende el agravamiento de la disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en estadio terminal o la muerte debida a disfunción renal, incluyendo la insuficiencia renal, la pérdida de función renal y la enfermedad renal en 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 realizaciones anteriores, en donde se usa el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto, solo o junto con otros parámetros de laboratorio o clínicos útiles para el pronóstico que pueden seleccionarse 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",

5 • 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, al menos un parámetro clínico se puede determinar seleccionado a partir del grupo que comprende: edad, NGAL, cistatina C, aclaramiento de creatinina, creatinina, urea y puntuación Apache.

10 En una realización de la descripción, 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 un tratamiento renal y/o de una enfermedad. En una realización específica, 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 una realización de la invención, el método se utiliza con el fin de estratificar dichos sujetos en grupos de riesgo.

15 Una materia objeto de la descripción es 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 comprende los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) y los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14), en donde cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

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

25 En un ejemplo de los ensayos para determinar la proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, 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} , lo más preferentemente inferior a 10^{10} M^{-1} . Un experto en la materia sabe que se puede considerar compensar la afinidad más baja mediante la aplicación de una dosis más alta de compuestos y que esa medida no conduciría a apartarse del alcance de la invención, la afinidad de unión puede determinarse tal como se ha indicado anteriormente.

30 En un ejemplo se puede denominar ensayo POC (prueba en el punto de atención ("point of care")), que es una tecnología de ensayo que permite llevar a cabo el ensayo en menos de 1 hora cerca del paciente sin necesidad de un sistema de ensayo totalmente automatizado. Un ejemplo de esa tecnología es la tecnología de ensayo inmunocromatográfico.

35 En un ejemplo, ese ensayo es un inmunoensayo de tipo sándwich que utiliza cualquier tipo de tecnología de detección, incluyendo, aunque sin limitación, marcador enzimático, marcador quimioluminiscente, marcador electroquimioluminiscente, preferentemente un ensayo totalmente automatizado. En un ejemplo, un ensayo de ese tipo es un ensayo de tipo sándwich con marcador 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.

40 Se conoce una diversidad de inmunoensayos y pueden utilizarse para los ensayos y métodos de la presente descripción; 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 realización de la invención, por lo menos uno de dichos dos agentes de unión se marca con el fin de poder detectarlo.

45 Los métodos de detección preferentes comprenden inmunoensayos en diversos formatos, tales como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos de quimioluminiscencia y de fluorescencia, 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.

50 En una realización preferida, dicho marcador se selecciona a partir del grupo que comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador fluorescente y un marcador 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, por ejemplo, con un pigmento, un isótopo radioactivo o un resto reactivo o catalíticamente activo. La cantidad de anticuerpo marcado que se une al analito seguidamente se mide a continuación mediante un método apropiado. La composición general y los procedimientos implicados en los "ensayos de tipo sándwich" se encuentran bien establecidos y son conocidos por el experto en la materia (23).

En otra realización, 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 fija un primer componente de marcador a la primera molécula de captura, en donde dicho primer componente de marcador forma parte de un sistema de marcador basado en la desactivación o amplificación de la fluorescencia o quimioluminiscencia, y se fija un segundo componente de marcador de dicho sistema de marcador 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 realización, dicho sistema de marcador comprende criptatos de tierras raras o quelatos de tierras raras en combinación con un pigmento fluorescente o un 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, por ejemplo, se pueden seleccionar a partir del 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), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxi-rodamina-6G (R6G5), 6-carboxi-rodamina-6G (RG6), rodamina, verde de rodamina, rojo de rodamina y rodamina 110; pigmentos BODIPY, tales como BODIPY TMR; verde Oregon; cumarinas, tales como umbeliferona; bencimidias, tales como Hoechst 33258; fenantridinas, tales como rojo de Texas, amarillo de Yakima, Alexa Fluor, PET, 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. Un ensayo de ese tipo 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 las moléculas de captura y las 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 unirse a moléculas diana o a moléculas de interés, es decir, analitos (es decir, en el contexto de la presente invención, PENK y fragmentos de la misma) de 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 unirse específicamente a las moléculas diana o de interés. Para ello, la unión puede estar 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, a partir del grupo que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de carbohidrato, una molécula de PNA, una proteína, un anticuerpo, un péptido o una glicoproteína. Preferentemente, las moléculas de agente de unión son anticuerpos, incluyendo fragmentos de los mismos con afinidad suficiente hacia 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 marcador quimioluminiscente puede ser un marcador de éster de acridinio, marcadores de esteroides que implican marcadores de isoluminol y similares.

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

En una 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.

5 En un ejemplo de los ensayos para determinar proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, de acuerdo con la presente descripción ese 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 (prueba en el punto de atención). 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 anteriormente ejemplos de formatos de ensayo.

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

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

15 En un ejemplo de los ensayos para determinar proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, de acuerdo con la presente descripción, dicho marcador se selecciona a partir del grupo que comprende un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador fluorescente, un marcador de yodo radioactivo. Otro objeto de la presente descripción es un kit que comprende un ensayo de acuerdo con la presente descripción en donde los componentes de dicho ensayo pueden estar comprendidos en uno o varios recipientes.

20 Se describe un dispositivo de prueba en el punto de atención para llevar a cabo un método de acuerdo con la invención, en donde dicho dispositivo de prueba en el punto de atención comprende por lo menos un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo dirigido a los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) o a los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14), en donde cada una de dichas regiones comprende al menos 4 o 5 aminoácidos.

25 Se describe un dispositivo de prueba en el punto de atención para llevar a cabo un método de acuerdo con la invención, en donde dicho dispositivo de prueba en el punto de atención comprende por lo menos dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos a los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) o a los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14), en donde cada una de dichas regiones comprende al menos 4 o 5 aminoácidos.

30 Se describe un kit para llevar a cabo un método de acuerdo con la invención, en donde dicho dispositivo de prueba en el punto de atención comprende por lo menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido a los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) o a los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14), en donde cada una de dichas regiones comprende al menos 4 o 5 aminoácidos.

35 Se describe un kit para llevar a cabo un método de acuerdo con la invención, en donde dicho dispositivo de prueba en el punto de atención comprende por lo menos dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos a los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 13) o a los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 14), en donde cada una de dichas regiones comprende al menos 4 o 5 aminoácidos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Desarrollo de los anticuerpos

40 Péptidos

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

Péptidos/conjugados para la inmunización:

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

Tabla 1:

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

(C)SDNEEEVS	152-159
-------------	---------

Los anticuerpos se generaron de acuerdo con el siguiente método:

5 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.

10 Se fusionaron esplenocitos del ratón inmunizado y células de la línea celular de mieloma SP2/0 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 de HAT]. Tras dos semanas, el medio HAT se sustituye por medio HT durante tres pases, seguido por una vuelta al medio de cultivo celular normal.

15 Los materiales sobrenadantes del cultivo celular se sometieron a un cribado primario en busca de 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 clonaron de nuevo utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos.

20 (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).

Producción de anticuerpos monoclonales

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

25 Marcado de anticuerpos y recubrimiento

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

30 El compuesto marcado (trazador): 100 µg (100 µl) de anticuerpo (1 mg/ml en PBS, pH 7,4) se mezcló con 10 µl de éster de NHS de acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (documento EP 0353971) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. El anticuerpo marcado se purificó mediante HPLC con filtración en gel en un aparato Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.). El anticuerpo marcado y purificado se diluyó en (fosfato de potasio 300 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, Na-EDTA 10 mmol/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).

35 Anticuerpo en fase sólida (anticuerpo para el recubrimiento):

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 mmol/L, Tris/HCl 50 mmol/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.

Especificidad de los anticuerpos

40 Tabla 2:

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 incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, los tubos se lavaron 5 veces (con 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 mmol/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%).

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

Tabla 3:

Anticuerpo	DAEEDD	EEDDSLANSDDLK	LKELLETG	TGDNRRERSHHQDGSNE	SDNEEEVS	MRPENK (SEC ID nº 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 unían 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.

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 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 mmol/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 pmol/ de MRPENK. Las proporciones de señal (RLU con 1.000 pmol 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 esa combinación de anticuerpos para llevar a cabo el inmunoensayo de MRPENK para investigaciones adicionales. Se utilizó el anticuerpo de MR-MRPENK como anticuerpo para recubrir el tubo y se utilizó el anticuerpo de CT-MRPENK como anticuerpo marcado.

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:

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, Berlín, Alemania.

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 pmol/L.

Aclaramiento de creatinina

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

Ejemplo 2:

PENK en sujetos sanos

5 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 pmol/L de MRPENK; el valor más bajo era de 9 pmol/L y el percentil 99 era de 80 pmol/L. Debido a que la sensibilidad del ensayo era de 5,5 pmol/L, el 100% de todos los sujetos sanos era detectable utilizando el ensayo de MRPENK descrito (véase la Fig. 2).

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

10 Inesperadamente, la proencefalina se correlacionaba negativamente con el aclaramiento de creatinina en sujetos sanos (r= -0,33, p<0,0001), véase la Fig. 3. El coeficiente de correlación era ligeramente más alto en los varones que en las mujeres (r= -0,34 frente a -0,29, ambos p<0,0001). Estos datos indican una fuerte asociación entre PENK y la función renal.

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.

15 Ejemplo 3:

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

Tabla 5:

Enfermedad	Valor de r	Valor de p
Insuficiencia cardíaca crónica N=122	-0,55	<0,0001
Insuficiencia cardíaca 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

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

Ejemplo 4: PENK en pacientes enfermos graves

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

25 Estudio clínico

Se hospitalizaron 101 pacientes de urgencias que cumplían la definición de sepsis (Crit. Care Med. 36(1):296-327, enero de 2008) (promedio de 5 días de hospitalización) y recibieron cuidados convencionales como tratamiento. 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 era inferior a 4 h.

30

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

ES 2 810 001 T3

Datos demográficos				
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
Hipertensión - 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 de laboratorio de rutina				
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) - mediana [IQR]	48 [23,25-23,25]	56 [29,25-80]	31,5 [14,75-66]	0,043
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
bilirru - 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 todos los pacientes moría durante la estancia hospitalaria y se contaron como no respondedores al tratamiento; el 73,3% de todos los pacientes sobrevivía a la sepsis y se contaron como respondedores al tratamiento.

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

Resultados del estudio clínico

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

PENK diagnostica la disfunción renal:

10 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 (presentaban riesgo de enfermedad renal, lesión renal, insuficiencia renal, pérdida de función renal o enfermedad renal en estadio terminal) y 51
15 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 la disfunción renal, los presentes inventores utilizaron NGAL como marcador de referencia (Soni et al., 2010). Se midió NGAL utilizando un ELISA comercial (kit ELISA para NGAL, Bioporto, Gentofte, Dinamarca).

20 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).

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

Tabla 7:

Modelo	N	Sucesos	Chi2 del modelo	d.f.	valor de p de LR	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]

25

La PENK inicial es una herramienta de pronóstico notable

30 Los presentes inventores correlacionaron el valor inicial de PENK y la mortalidad hospitalaria y compararon PENK con la puntuación de sepsis de APACHE 2 (véase Knaus et al., 1985, 2001) y el aclaramiento de creatinina. PENK es una herramienta de pronóstico notable para un resultado de sepsis (véase 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 es una herramienta de pronóstico sustancialmente más fuerte que el aclaramiento de creatinina (AUC 0,638). Inesperadamente, el valor pronóstico de PENK era más fuerte después del primer día de tratamiento en la UCI (AUC 0,79).

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

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

40 En pacientes por debajo del nivel de corte en el momento de presentación en el hospital y que permanecían por debajo del nivel de corte después de iniciar el tratamiento en la UCI, la mortalidad era de un 11% (bien tratados antes y durante la hospitalización). En el caso de que PENK se encontrara por encima del nivel de corte en ambos puntos temporales, la mortalidad era aproximadamente 5 veces superior (52,5%) (no respondían al tratamiento) y en el caso de que los pacientes se presentasen con valores de PENK superiores a 100 pmol/L y reducían sus niveles de PENK a valores inferiores a 100 pmol/L durante el tratamiento en la UCI, la mortalidad era de 0
45 (respondían al tratamiento). Estos datos indican una fuerte asociación entre PENK y el éxito de un tratamiento, apoyando su utilización para el seguimiento de una terapia (ensayo en serie).

Tabla 8:

	mortalidad	N pacientes muertos frente a la totalidad
PENK > 100 pmol/L en la presentación y primer día después del tratamiento en la UCI	52,5%	21/40
PENK > 100 pmol/L en la presentación y < 100 pmol/L el primer día después del tratamiento en la UCI	0%	0/7
PENK < 100 pmol/L en la presentación y el primer día de tratamiento en la UCI	11%	6/54

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

- 5 a) Un paciente (superviviente) presentaba una PENK inicial <100 pmol/L y se mantuvo <100 pmol/L durante la estancia hospitalaria.
- b) Un paciente (murió durante la estancia hospitalaria) presentaba una PENK inicial >100 pmol/L y no se redujo a valores <100 pmol/L.
- c) Un paciente (murió durante la estancia hospitalaria) presentaba una PENK inicial >100 pmol/L y no se redujo a valores <100 pmol/L.
- 10 d) Un paciente (superviviente) con PENK inicial >100 pmol/L; el valor de PENK disminuyó a valores <100 pmol/L en un día de tratamiento en la UCI.

Ejemplo 5: Utilización de mediciones en serie de PENK

En la población de pacientes descrita en el Ejemplo 4 (pacientes con sepsis, sepsis grave 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 pmol/L, que es próximo al percentil 99 del intervalo normal, se segmentó la población en dos grupos (superior e inferior a 100 pmol/L) y las tasas de supervivencia a los 7 días correspondientes se ilustran en gráficos de Kaplan-Meier (Figuras 16 a) y b)). Los pacientes con una concentración de PENK inferior a 100 pmol/L el día del ingreso, cuya concentración de PENK se mantenía inferior a 100 pmol/L el día 1, presentaban una tasa de supervivencia elevada, del 87%, mientras que en el caso de un incremento de la concentración de PENK a más de 100 pmol/L el día 1, la tasa de supervivencia disminuía al 67%. En contraste, los pacientes con una concentración de PENK superior a 100 pmol/L el día de ingreso, cuya concentración de PENK se mantenía por encima de 100 pmol/L el día 1, presentaban una tasa de supervivencia deficiente, de sólo un 50%, mientras que en el caso de una disminución de la concentración de PENK a valores inferiores a 100 pmol/L el día 1, la tasa de supervivencia era del 100%.

25 Ejemplo 6:

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

Tabla 9:

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	Muertes hospitalarias	Supervivientes a los 7 días	Valor de p
	(n=101)	7 días (n=28)	(n=73)	
PENK (pmol/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

35

PENK en varones

Mediante la utilización de PENK como marcador de pronóstico, PENK el primer día (presentación en el servicio de urgencias) era incluso más fuerte como herramienta de pronóstico de una muerte hospitalaria en la población masculina (AUC: 0,849, Fig. 12); una combinación de PENK y APACHE daba lugar a una AUC de 0,89 frente a 0,837 solo con APACHE (Fig. 13). La combinación de PENK y aclaramiento de creatinina generaba un valor pronóstico superior de AUC: 0,91 frente a 0,721 para el aclaramiento de creatinina solo (Fig. 14). Respecto a la población de pacientes completa, el valor pronóstico de PENK era más fuerte después del primer día de tratamiento en la 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 pmol/L, desviación estándar= 1,27; el percentil 99 (intervalo normal superior) era de 80 pmol/L de PENK. 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.

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

Figura 5: PENK incrementada se correlacionaba significativamente con una disfunción renal.

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

Figura 7: NGAL incrementado se encontraba significativamente incrementado en pacientes con disfunción renal. Los intervalos normales de NGAL (intervalo de 0,037 a 0,106 $\mu\text{g/ml}$; http://www.bioporto.com/products/bioporto_diagnostics/ngal_elisa_kits/ngal_rapid_elisa_kit_ce_ivd) están indicados 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 (véase anteriormente). Los presentes inventores utilizaron NGAL como marcador de referencia para la disfunción renal. La AUC era de 0,809, sustancialmente más baja que para la proencefalina (AUC: 0,868, Fig. 6), indicando el valor añadido de la proencefalina.

Figura 9: PENK es una herramienta de pronóstico notable para un 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 pmol/L, se mantuvo con <100 pmol/L durante la estancia hospitalaria.

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

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

Figura 11d): un paciente (superviviente) con PENK inicial >100 pmol/L; el valor de PENK disminuyó a valores <100 pmol/L durante el primer día de tratamiento en la UCI.

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

Figura 13: una combinación de PENK y APACHE daba lugar a una AUC de 0,89 frente a 0,837 solo con APACHE

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

Figura 15: Fig. 15 A/B: concentraciones de PENK (A) y NGAL (B) en plasma, respectivamente, en pacientes sépticos clasificados según el grado de disfunción renal aguda. 0= sin disfunción renal; R= riesgo; I= 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 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 $\mu\text{mol/L}$ (con un aumento >44) (>4 mg/dl); OR 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 (véase 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 fuertemente elevadas en pacientes sépticos, incluso en el caso de que no presenten disfunción renal, mientras que ese no es el caso para PENK.

5

Figura 16: tasas de supervivencia de pacientes gravemente enfermos dependiendo de 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 pmol/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 pmol/L, respectivamente, que presentaban una concentración de PENK inferior a 100 pmol/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 pmol/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 pmol/L, respectivamente, que presentaban una concentración de PENK superior a 100 pmol/L el día del ingreso.

10

15

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 el aclaramiento de creatinina. Se calculó la regresión lineal utilizando las variables indicadas 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, Crea Clearance (aclaramiento de creatinina) 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. Debe apreciarse que la edad, el género, etc., no presentan una influencia significativa sobre las concentraciones de PENK.

20

25

ES 2 810 001 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sphingotec GmbH

5 <120> Un método para diagnosticar o monitorizar la función renal o diagnosticar la disfunción renal
 <130> B75021WOEP-A

<140> 12187051.3
 <141> 02-10-2012

10 <140> 13170327.4
 <141> 03-06-2013

<160> 19

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Glu Cys Ser Gln Asp Cys Ala Thr Cys Ser Tyr Arg Leu Val Arg Pro
 1 5 10 15

Ala Asp Ile Asn Phe Leu Ala Cys Val Met Glu Cys Glu Gly Lys Leu
 20 25 30

Pro Ser Leu Lys Ile Trp Glu Thr Cys Lys Glu Leu Leu Gln Leu Ser
 35 40 45

Lys Pro Glu Leu Pro Gln Asp Gly Thr Ser Thr Leu Arg Glu Asn Ser
 50 55 60

Lys Pro Glu Glu Ser His Leu Leu Ala Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met
 65 70 75 80

Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Lys Lys Met Asp Glu Leu Tyr Pro Met
 85 90 95

Glu Pro Glu Glu Glu Ala Asn Gly Ser Glu Ile Leu Ala Lys Arg Tyr
 100 105 110

Gly Gly Phe Met Lys Lys Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Leu Ala Asn
 115 120 125

Ser Ser Asp Leu Leu Lys Glu Leu Leu Glu Thr Gly Asp Asn Arg Glu
 130 135 140

25

ES 2 810 001 T3

Arg Ser His His Gln Asp Gly Ser Asp Asn Glu Glu Glu Val Ser Lys
 145 150 155 160

Arg Tyr Gly Gly Phe Met Arg Gly Leu Lys Arg Ser Pro Gln Leu Glu
 165 170 175

Asp Glu Ala Lys Glu Leu Gln Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg
 180 185 190

Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly Gly
 195 200 205

Phe Leu Lys Arg Phe Ala Glu Ala Leu Pro Ser Asp Glu Glu Gly Glu
 210 215 220

Ser Tyr Ser Lys Glu Val Pro Glu Met Glu Lys Arg Tyr Gly Gly Phe
 225 230 235 240

Met Arg Phe

<210> 2
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Glu Cys Ser Gln Asp Cys Ala Thr Cys Ser Tyr Arg Leu Val Arg Pro
 1 5 10 15

Ala Asp Ile Asn Phe Leu Ala Cys Val Met Glu Cys Glu Gly Lys Leu
 20 25 30

Pro Ser Leu Lys Ile Trp Glu Thr Cys Lys Glu Leu Leu Gln Leu Ser
 35 40 45

Lys Pro Glu Leu Pro Gln Asp Gly Thr Ser Thr Leu Arg Glu Asn Ser
 50 55 60

Lys Pro Glu Glu Ser His Leu Leu Ala
 65 70

10

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 3
 Tyr Gly Gly Phe Met

1 5

20

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 4
 Tyr Gly Gly Phe Leu

1 5

ES 2 810 001 T3

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 5
 Met Asp Glu Leu Tyr Pro Met Glu Pro Glu Glu Glu Ala Asn Gly Ser
 1 5 10 15

 Glu Ile Leu Ala
 20

 10 <210> 6
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 6
 Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Leu Ala Asn Ser Ser Asp Leu Leu Lys
 1 5 10 15

 Glu Leu Leu Glu Thr Gly Asp Asn Arg Glu Arg Ser His His Gln Asp
 20 25 30

 Gly Ser Asp Asn Glu Glu Glu Val Ser
 35 40

 20 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 7
 Tyr Gly Gly Phe Met Arg Gly Leu
 1 5

 30 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 Ser Pro Gln Leu Glu Asp Glu Ala Lys Glu Leu Gln
 1 5 10

 35 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 40 <400> 9
 Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Met Asp Tyr Gln
 1 5 10

 45 <210> 10
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 10

ES 2 810 001 T3

Phe Ala Glu Ala Leu Pro Ser Asp Glu Glu Gly Glu Ser Tyr Ser Lys
 1 5 10 15

 Glu Val Pro Glu Met Glu
 20

 <210> 11
 <211> 29
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 Phe Ala Glu Ala Leu Pro Ser Asp Glu Glu Gly Glu Ser Tyr Ser Lys
 1 5 10 15

 Glu Val Pro Glu Met Glu Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met
 20 25
 10
 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 12
 Tyr Gly Gly Phe Met Arg Phe
 1 5

 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20

 <400> 13
 Leu Lys Glu Leu Leu Glu Thr Gly
 25 1 5

 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30

 <400> 14
 Ser Asp Asn Glu Glu Glu Val Ser
 1 5
 35

 <210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40

 <400> 15
 Asp Ala Glu Glu Asp Asp
 1 5

 <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45

 <400> 16
 Glu Glu Asp Asp Ser Leu Ala Asn Ser Ser Asp Leu Leu Lys
 50 1 5 10

 <210> 17

ES 2 810 001 T3

<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 17
Leu Lys Glu Leu Leu Glu Thr Gly
1 5

<210> 18
<211> 17
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Thr Gly Asp Asn Arg Glu Arg Ser His His Gln Asp Gly Ser Asp Asn
1 5 10 15

15 Glu
<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 19
Ser Asp Asn Glu Glu Glu Val Ser
1 5

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar o monitorizar la función renal en un sujeto que comprende:
 - determinar el nivel de proencefalina o de fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido a partir de dicho sujeto; y
- 5 en donde durante la medición de seguimiento, un cambio relativo de la proencefalina y fragmentos de la misma que se reduce, se correlaciona con la mejora de la función renal del sujeto, o

en donde durante la medición de seguimiento, un cambio relativo de la proencefalina y un fragmento de la misma que se incrementa, se correlaciona con el empeoramiento de la función renal del sujeto,
- 10 en donde dicha proencefalina o un fragmento de la misma se selecciona a partir del 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; y

en donde dicha determinación de la proencefalina o sus fragmentos de al menos 5 aminoácidos se realiza más de una vez en un paciente.
- 15 2. Un método según la reivindicación 1, en el que el nivel de proencefalina o de fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos se determina utilizando un agente de unión de proencefalina o de fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente de unión se selecciona a partir del grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una estructura que no es una Ig que se une a la proencefalina o a fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.
- 20 4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que dicho por lo menos un agente de unión se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que comprende SEC ID nº 1, 2, 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 con las secuencias seleccionadas a partir del grupo que comprende SEC ID nº 2, 5, 6 y 10, preferentemente se une a SEC ID nº 6.
- 25 5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, 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 la proencefalina o a fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.
- 30 6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 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 donde cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.
- 35 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se utiliza un ensayo para determinar el nivel de proencefalina o de 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 los fragmentos de proencefalina de sujetos sanos y es <15 pmol/L.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho fluido corporal puede seleccionarse a partir del grupo que comprende sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo (lcr) y saliva.
- 40 9. Un método según las reivindicaciones 1 a 8, en el que adicionalmente se determina por lo menos un parámetro clínico seleccionado a partir del grupo que comprende: edad, BUN, NGAL, aclaramiento de creatinina, creatinina y puntuación Apache.
10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha monitorización se lleva a cabo para evaluar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas adoptadas.
11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para estratificar dichos sujetos en grupos de riesgo.

Fig. 1:

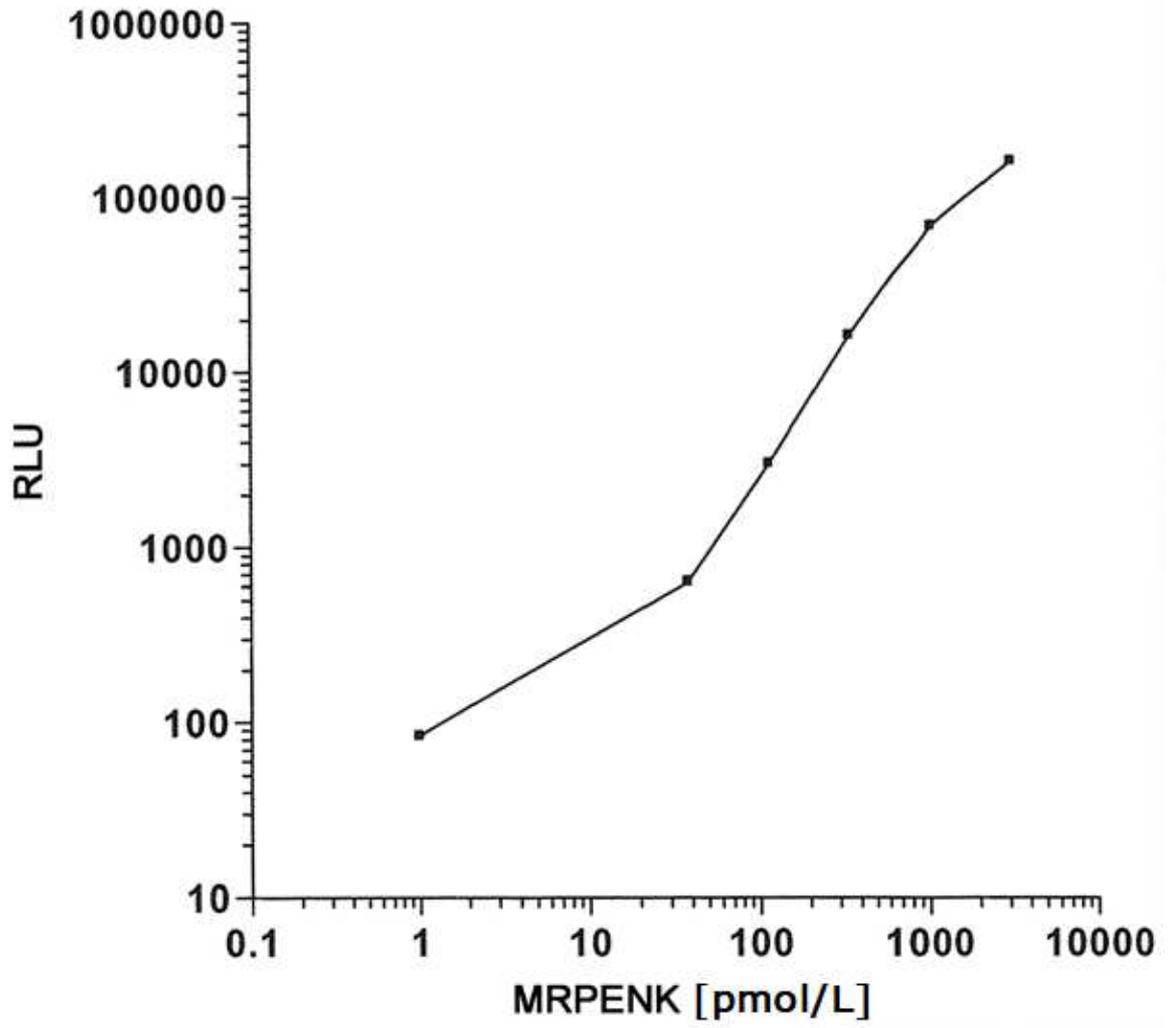


Fig. 2:

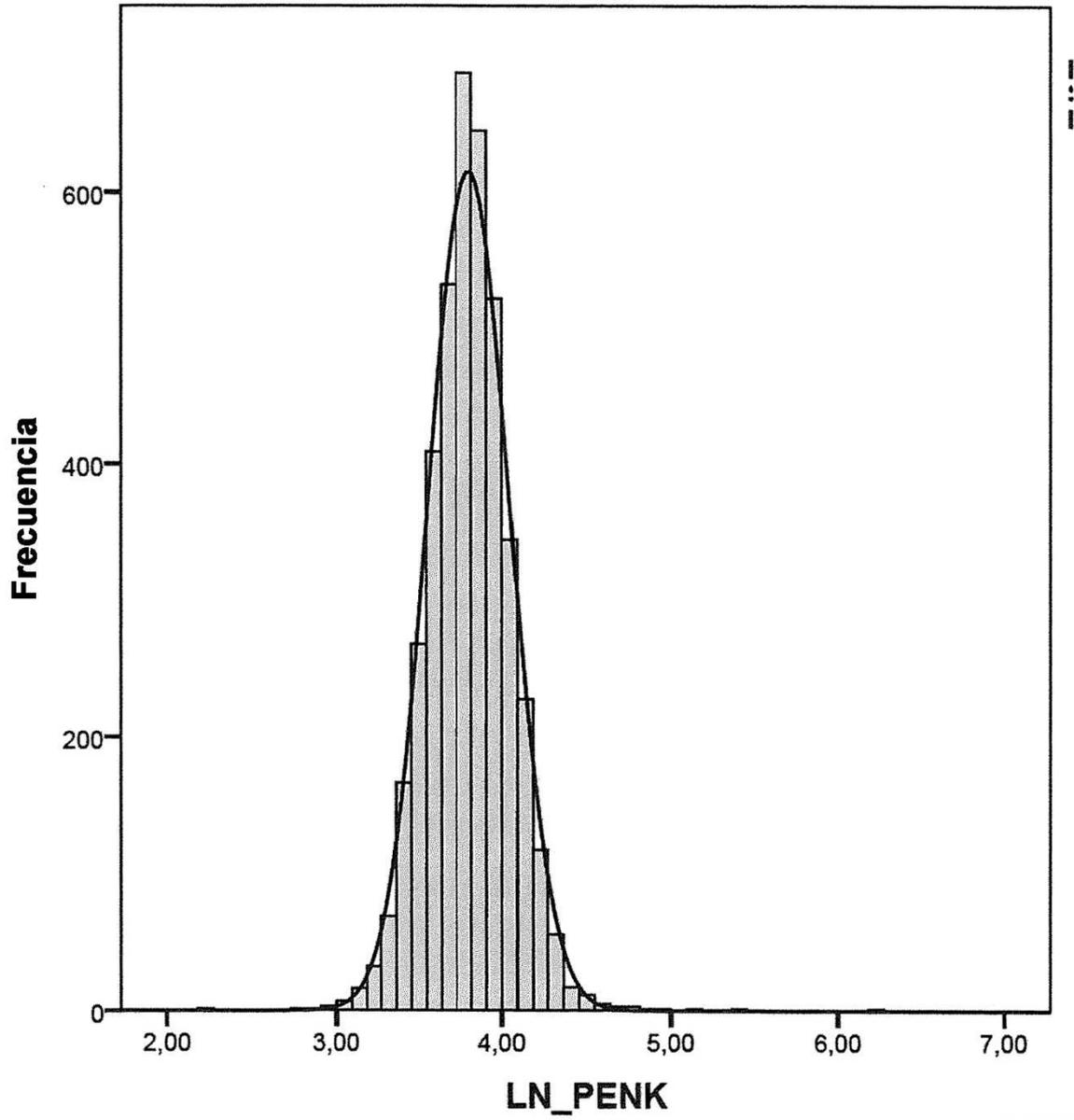


Fig. 3:

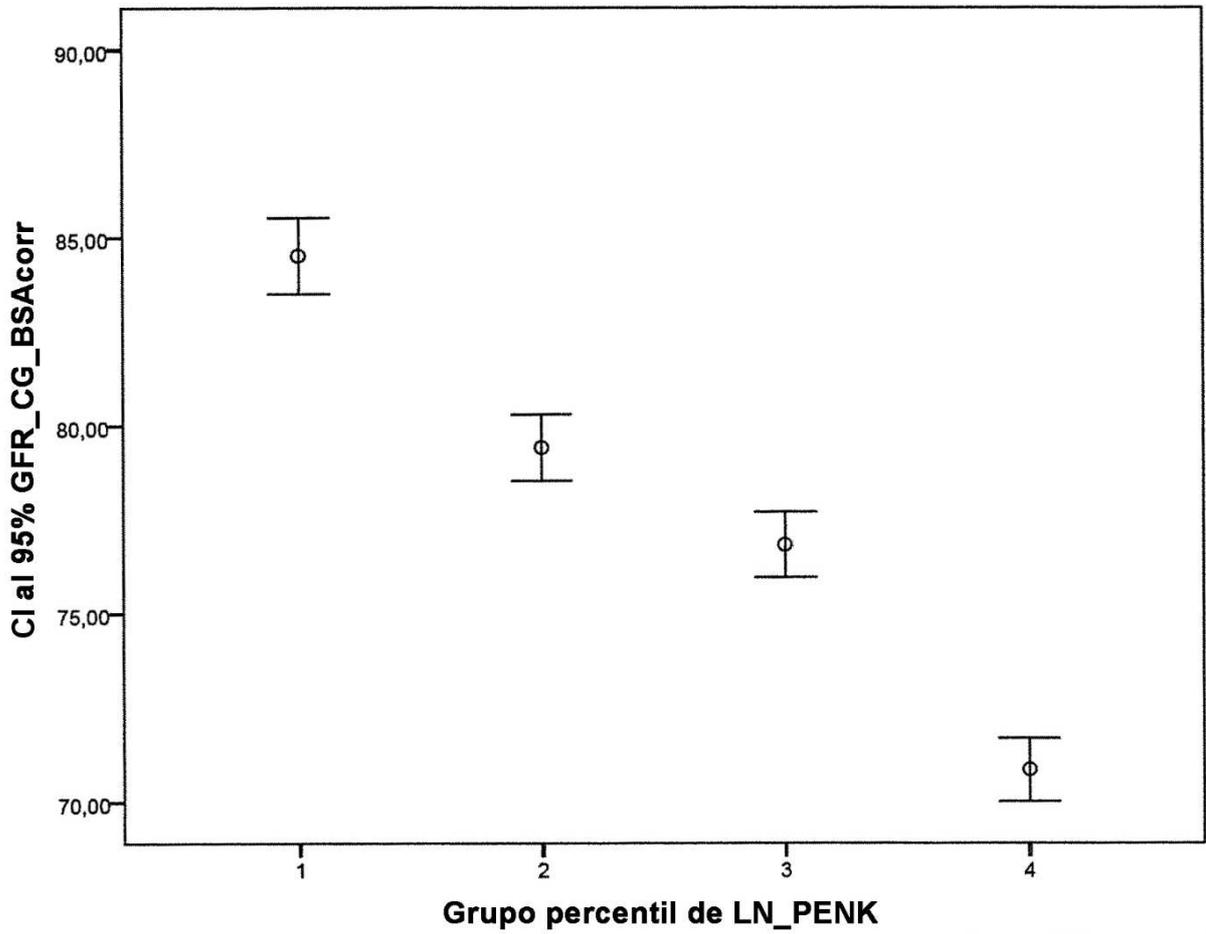


Fig. 4:

Correlación: PENK frente a aclaramiento de creatinina

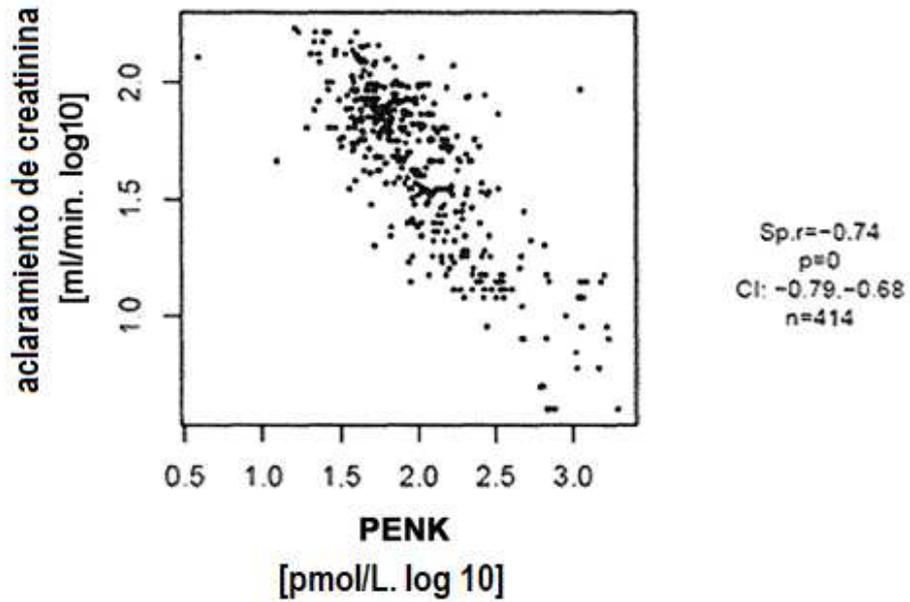


Fig. 5:

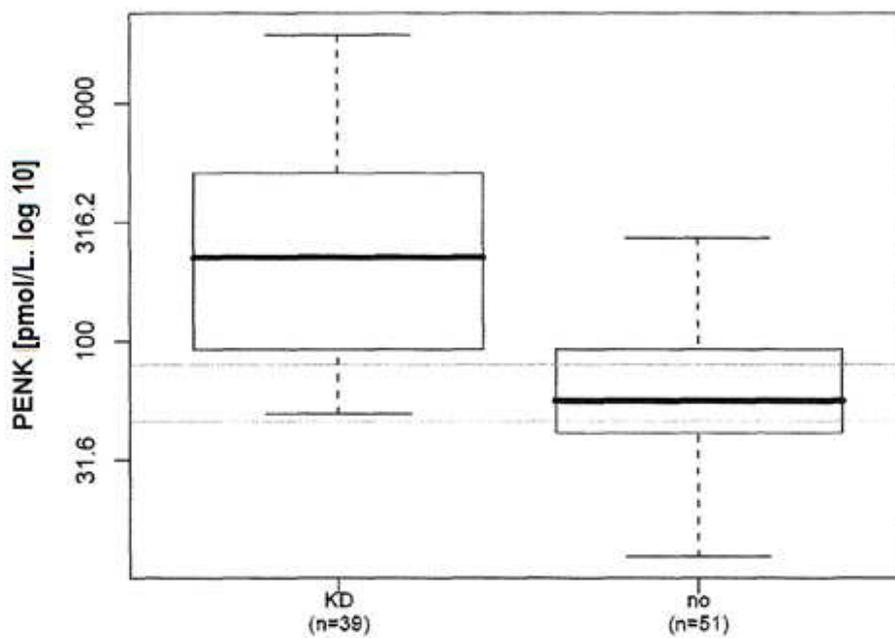


Fig. 6:

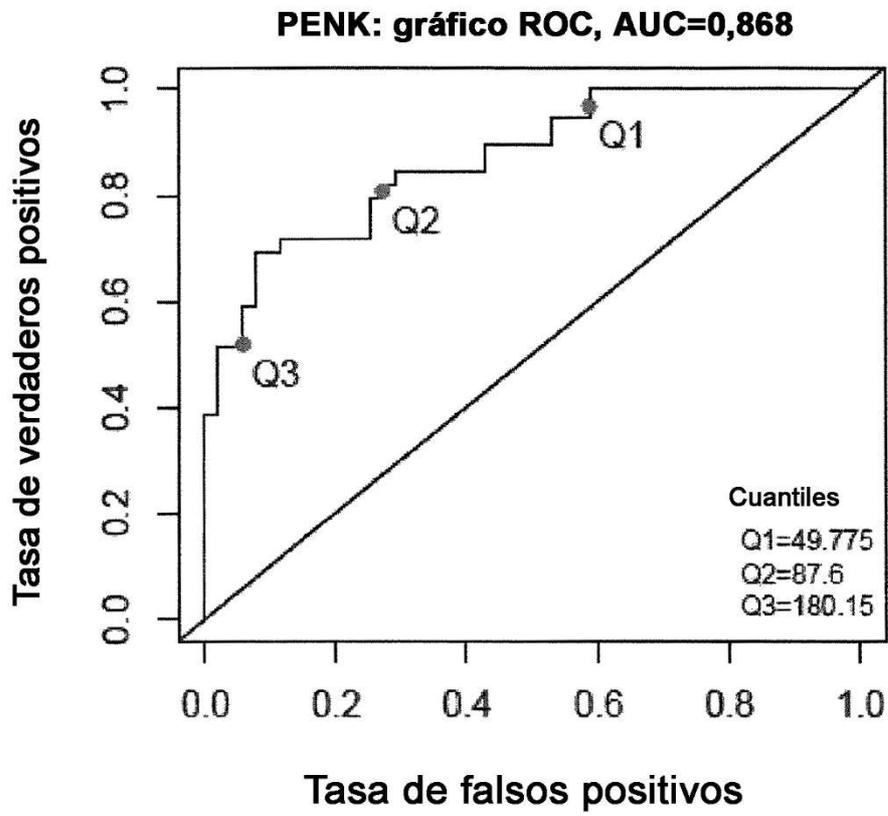


Fig. 7:

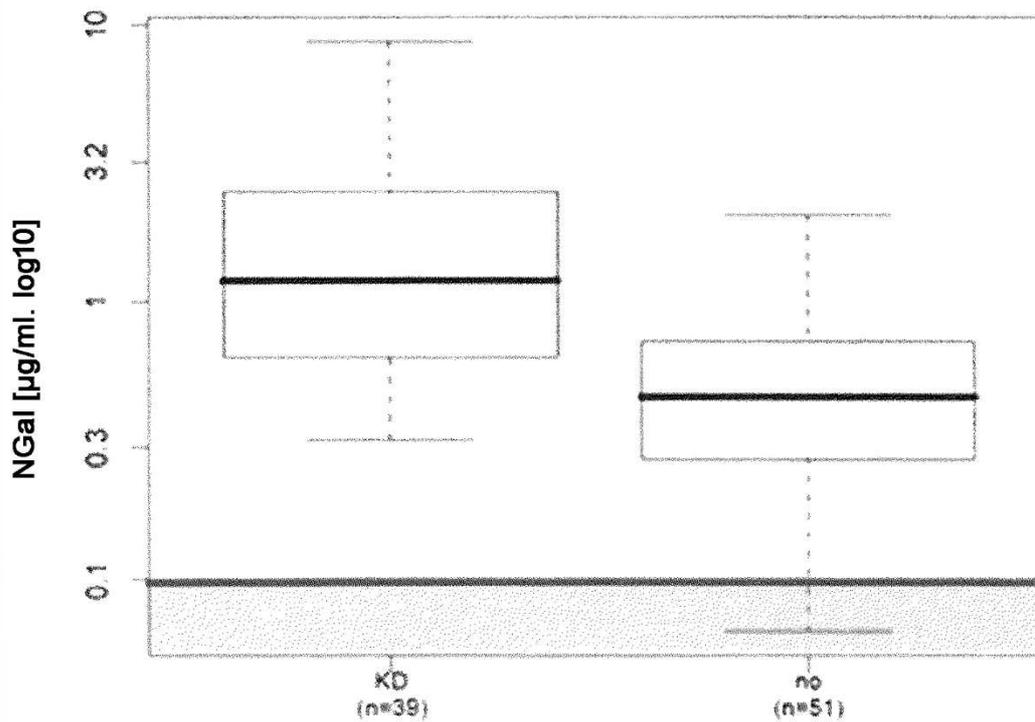


Fig. 8:

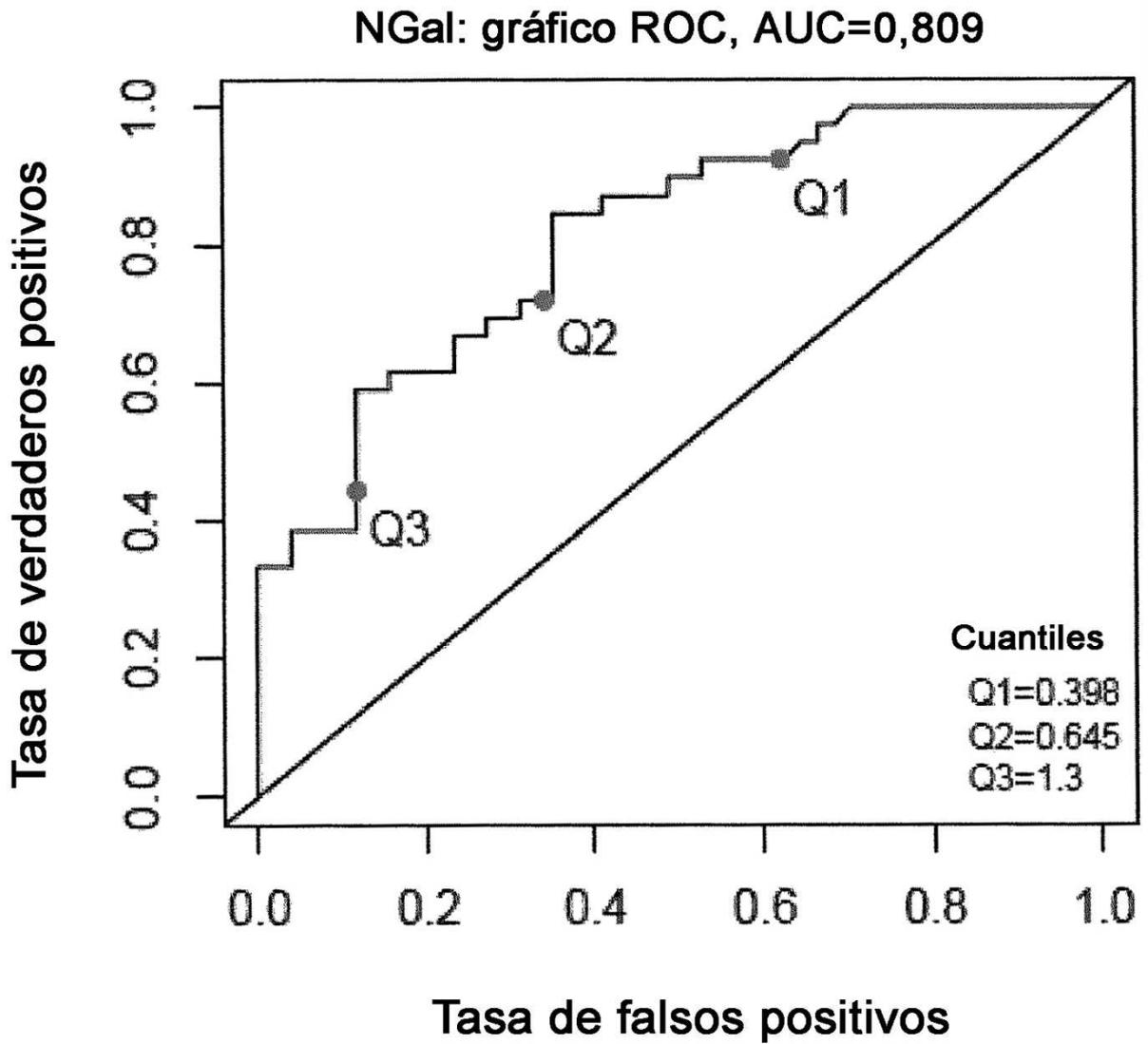


Fig. 9:

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]

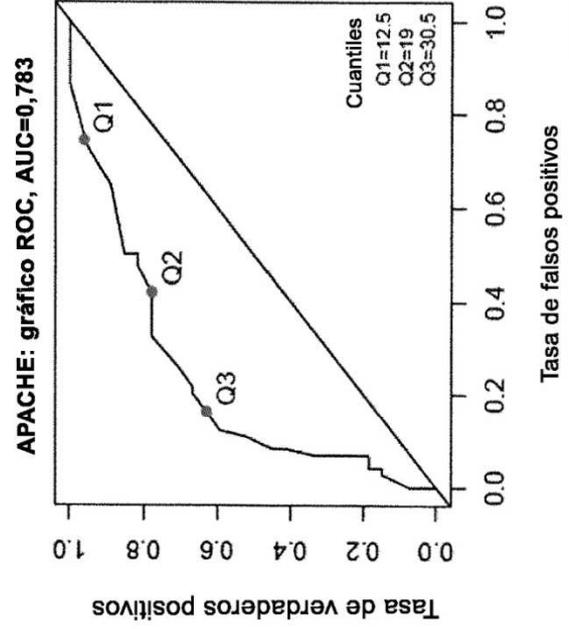
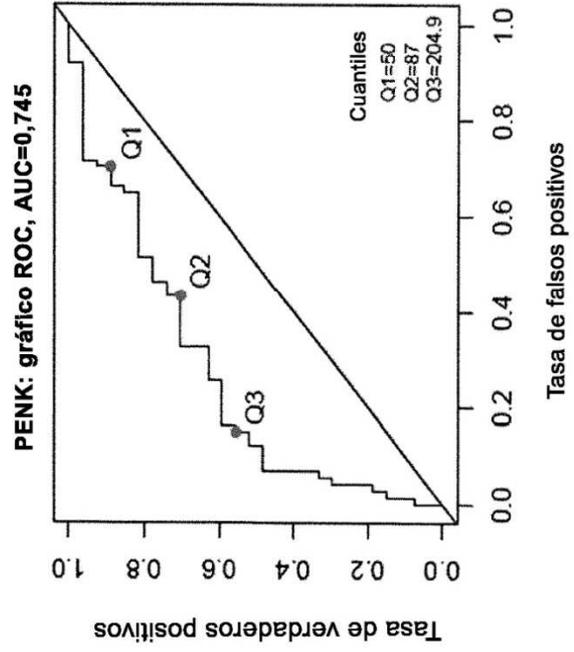


Fig. 10:

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)**

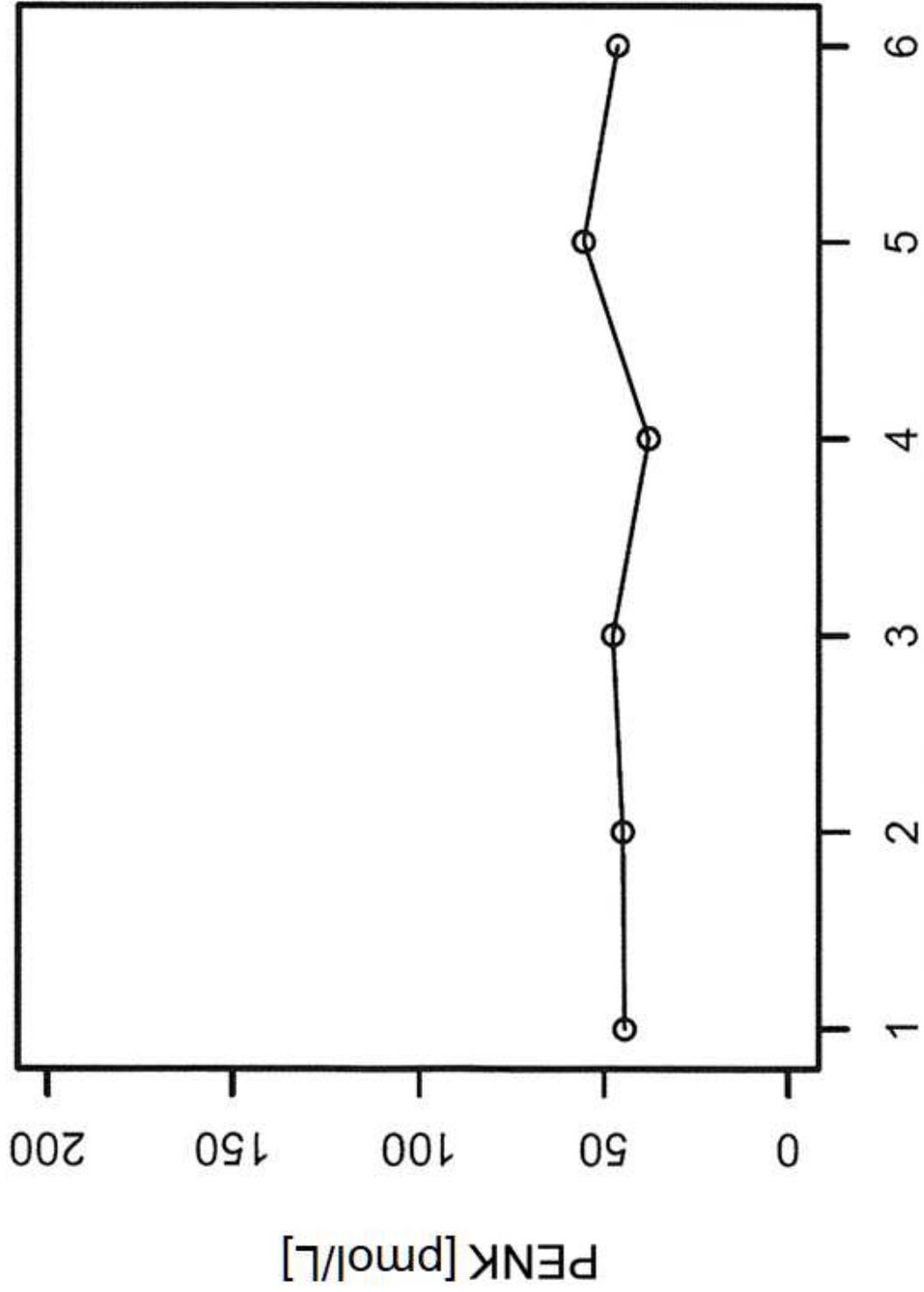


Fig. 11 a:

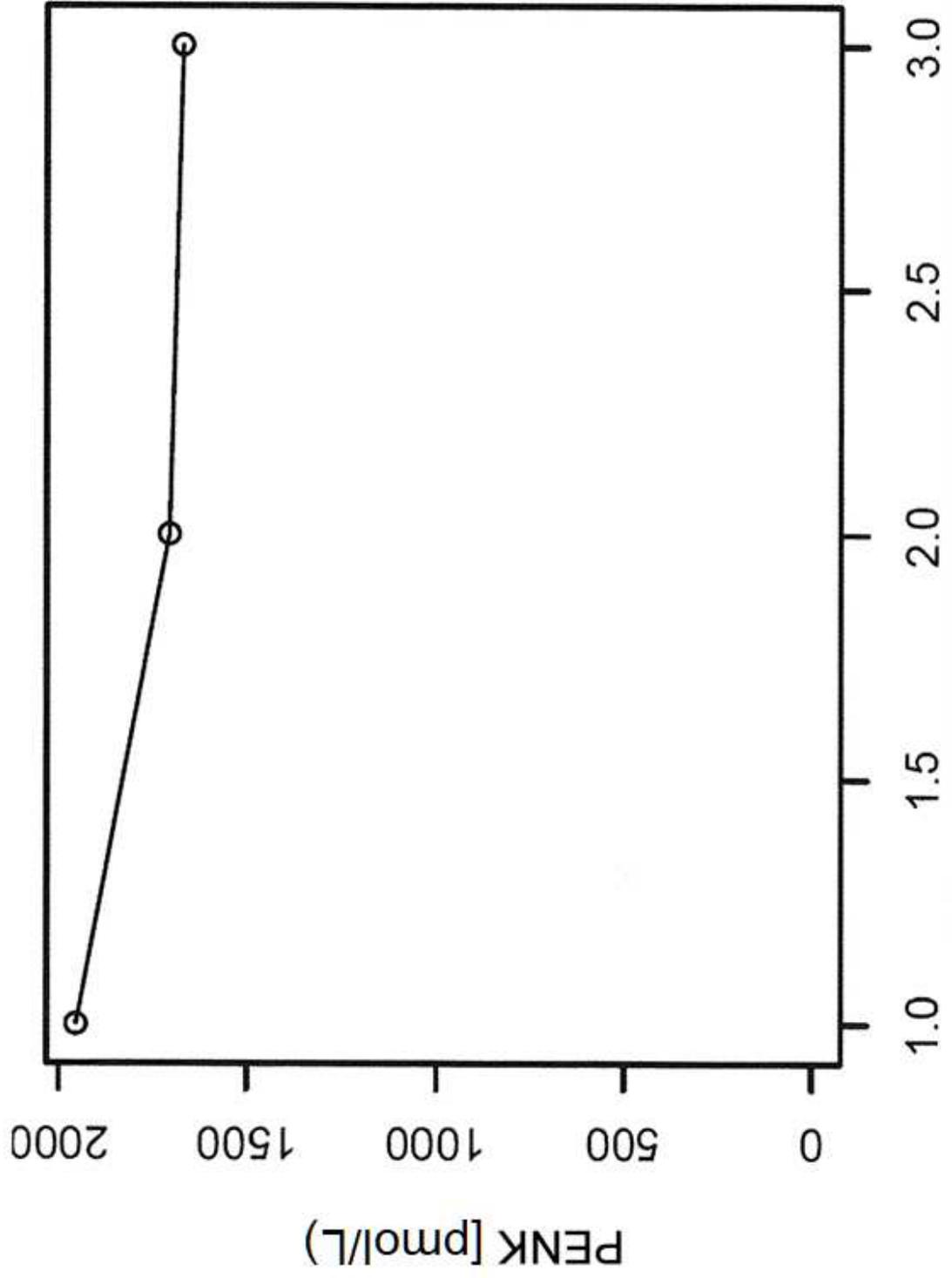


Fig. 11 b:

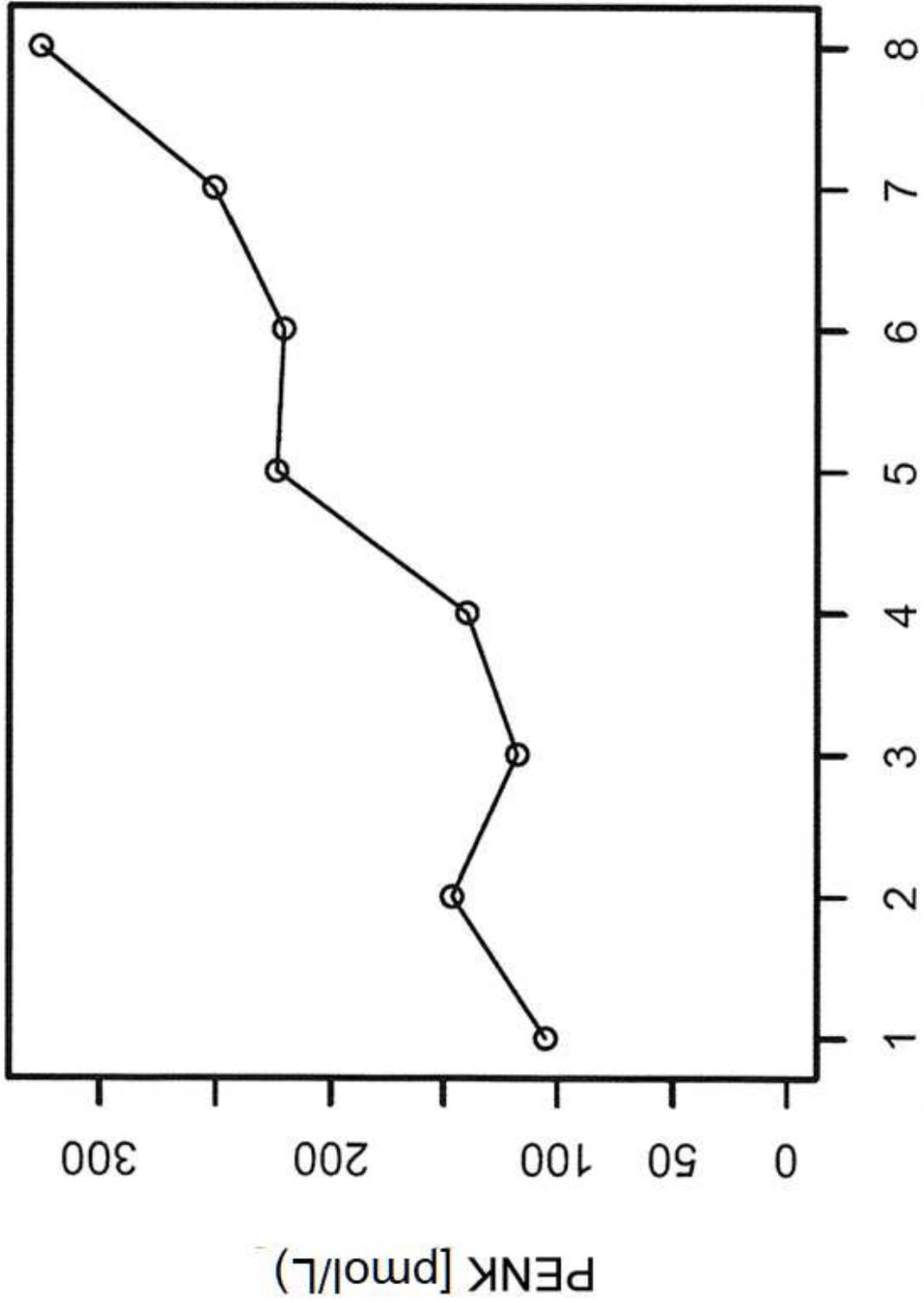


Fig. 11 c:

Fig. 11 d:

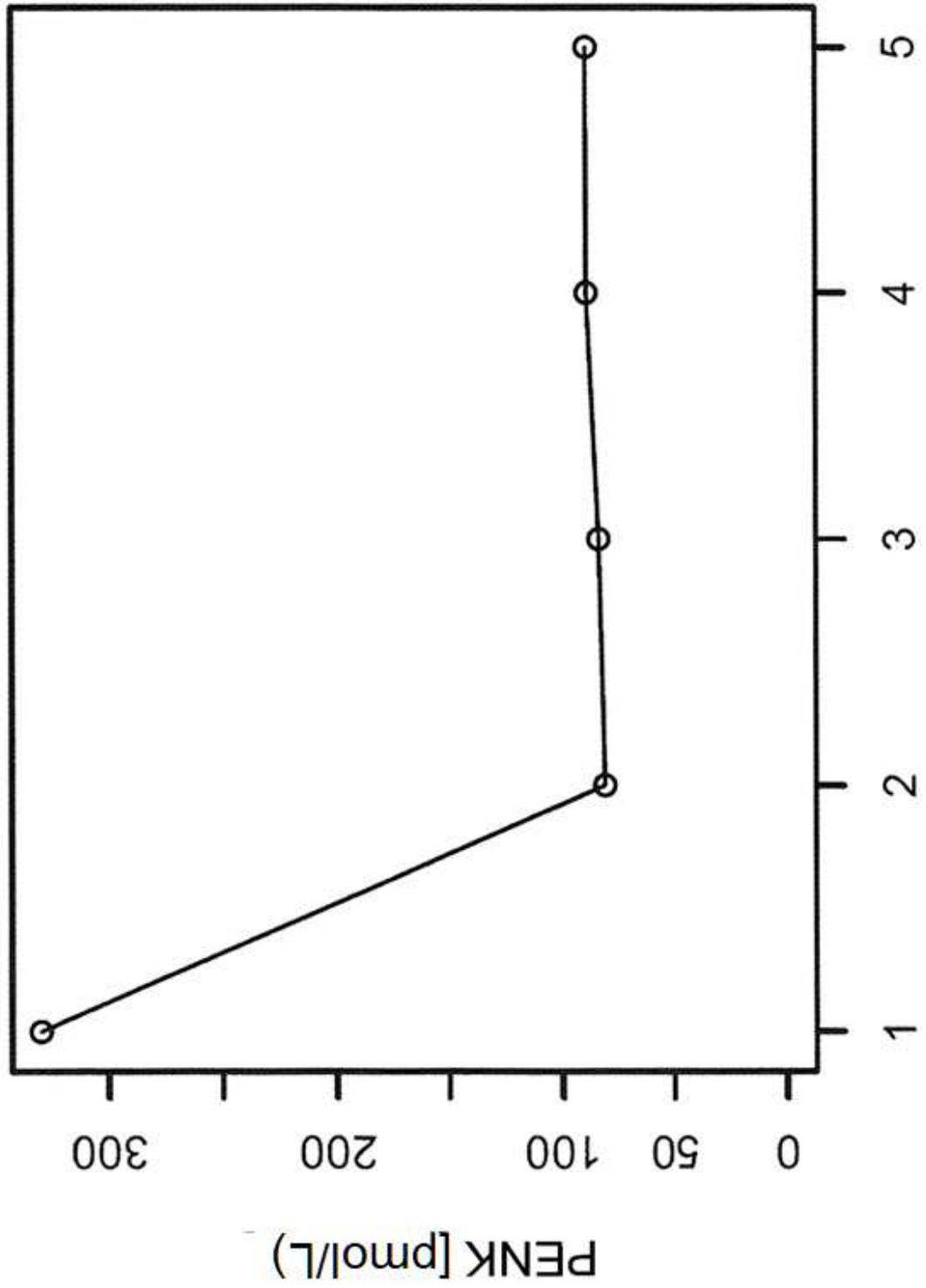


Fig. 12:

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]

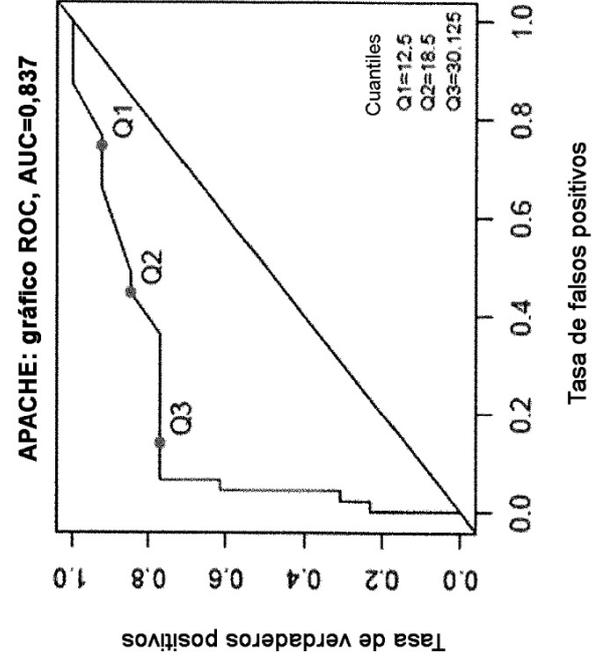
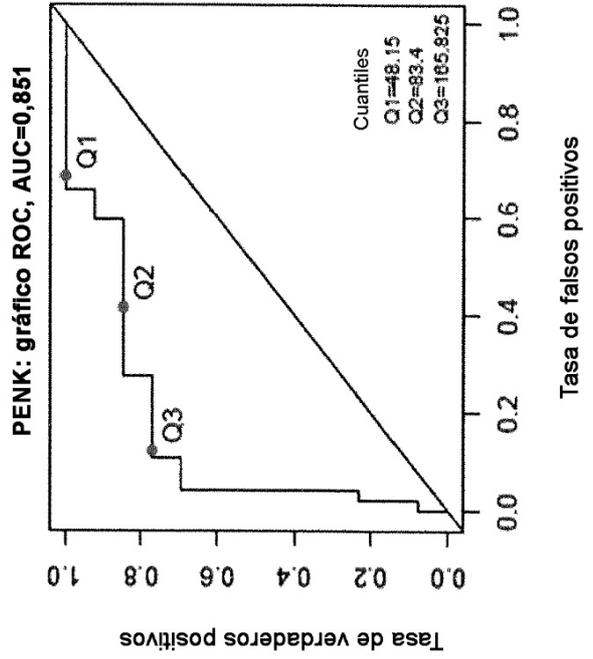


Fig. 13:

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)**

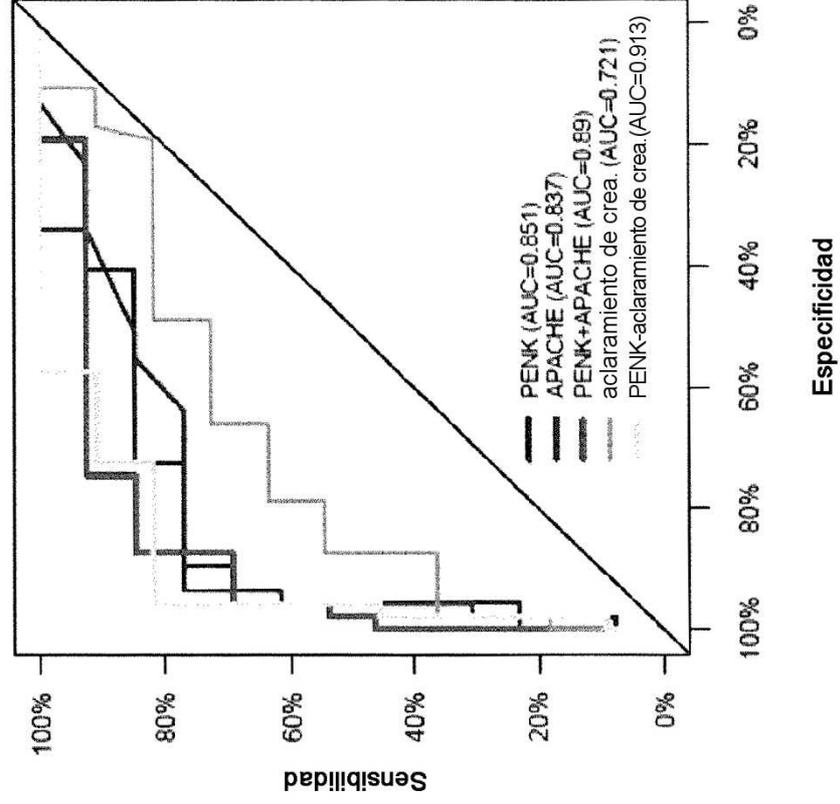


Fig. 14:

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	1	0.069
adición de PENK (PENK) a aclaramiento de crea.	18.23	1	1	<0.00001

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

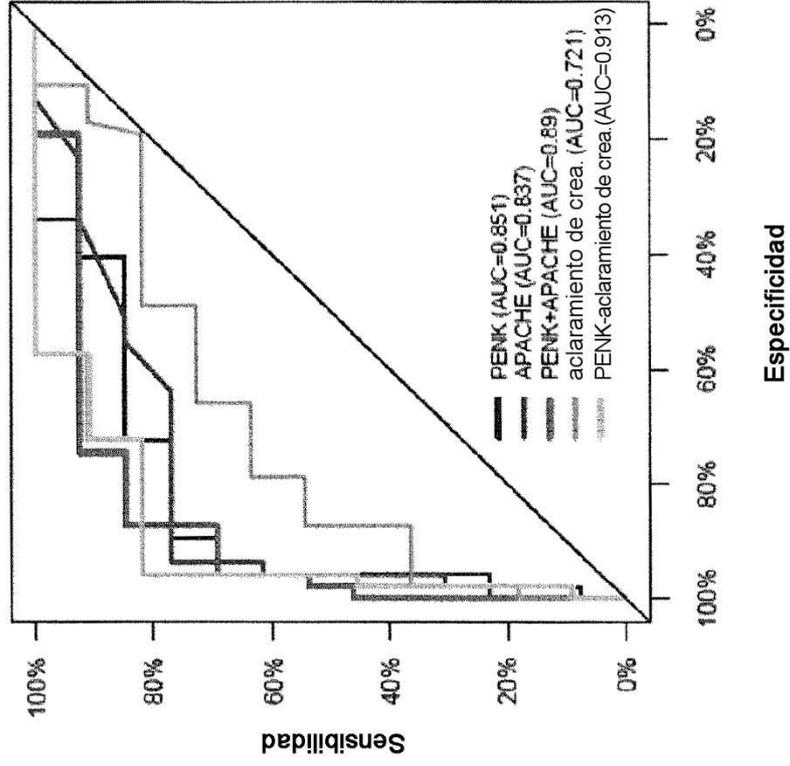
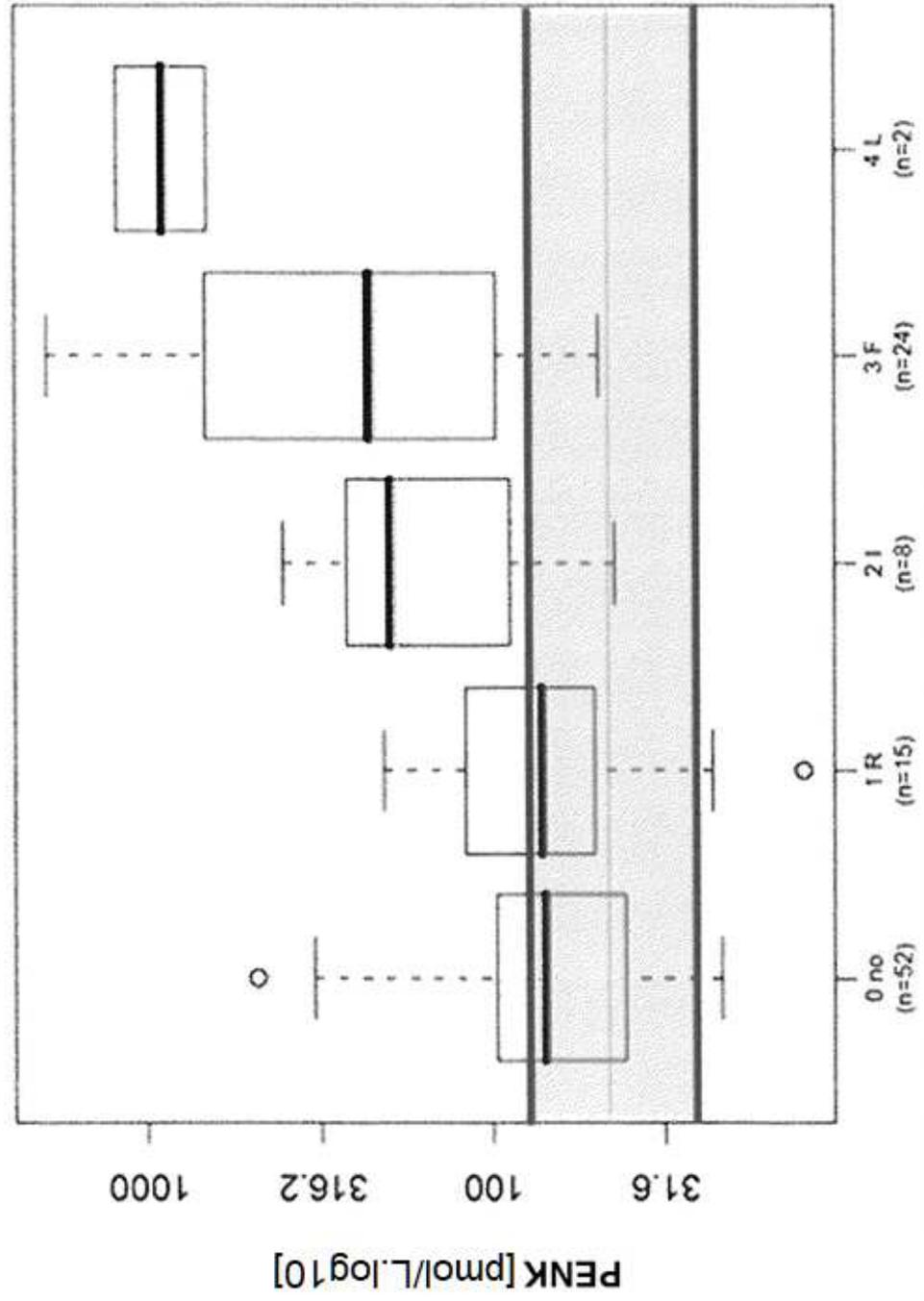


Fig. 15

A)



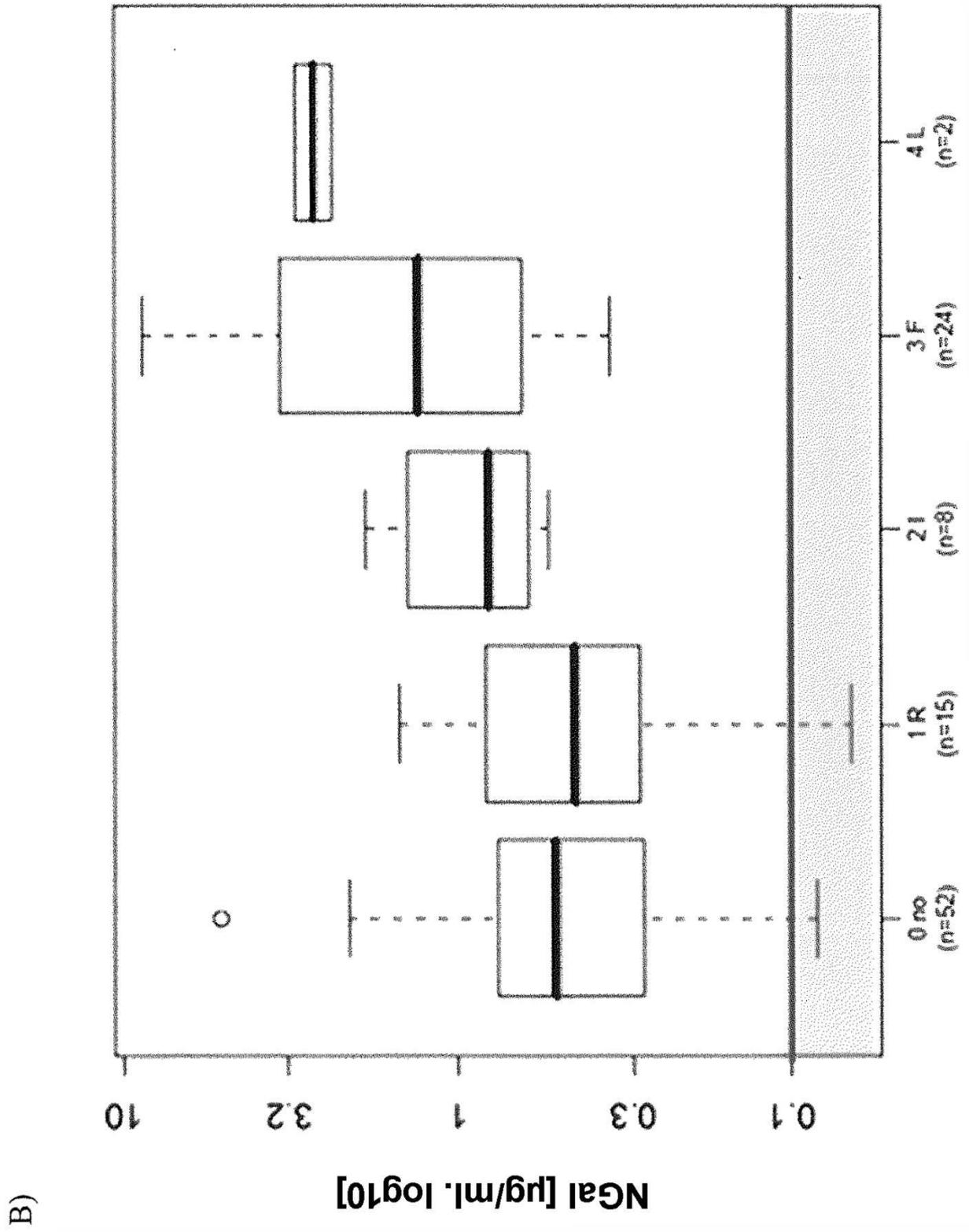
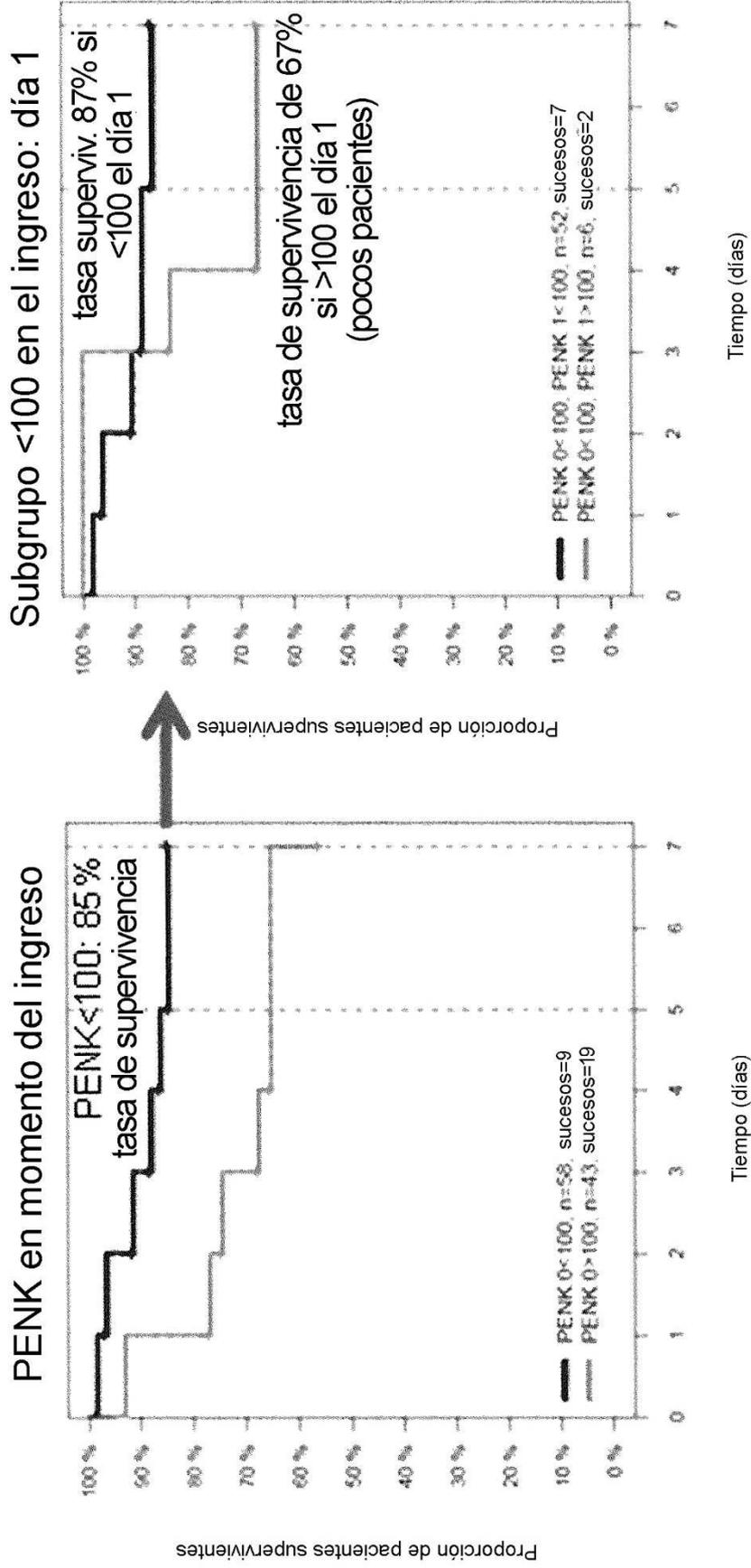


Fig. 16

A)



B)

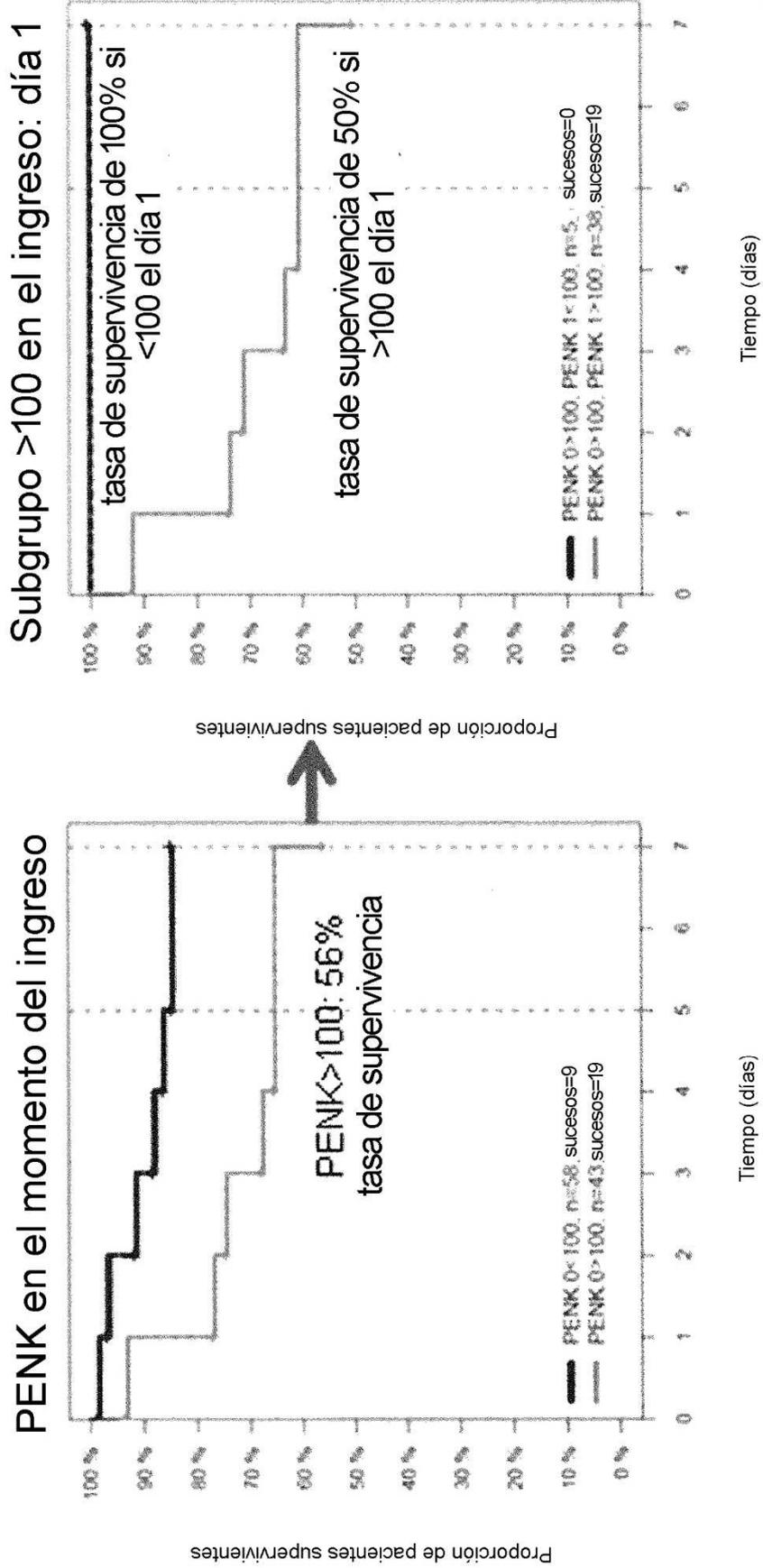


Fig. 17:

