



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 320 848**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00914195 .3**

(96) Fecha de presentación : **20.03.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1166122**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

(54) Título: **Procedimiento para la predicción de fracturas óseas mediante mediciones de osteocalcina.**

(30) Prioridad: **29.03.1999 FI 19990693**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.05.2009

(73) Titular/es: **Sanna-Maria Käkönen**
Mikonluodontie 55
21240 Askainen, FI
Heikki Luukinen,
Kim Pettersson,
Timo Lövgren y
H. Kalervo Väänänen

(72) Inventor/es: **Käkönen, Sanna-Maria;**
Luukinen, Heikki;
Pettersson, Kim;
Lövgren, Timo y
Väänänen, H. Kalervo

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 320 848 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

Procedimiento para la predicción de fracturas óseas mediante mediciones de osteocalcina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la evaluación de la fragilidad ósea y el riesgo de fractura, y la osteoporosis, utilizando como marcador una determinación cuantitativa de la razón de osteocalcina humana (hOC) γ -carboxilada circulante con respecto a la concentración de hOC total o con respecto a la de hOC intacta.

10 **Introducción y antecedentes**

La osteocalcina humana (hOC), también denominada proteína Gla ósea (BGP), es la proteína no colagenosa más abundante sintetizada por los osteoblastos de hueso (Poser *et al.* J Biol Chem 1980; 255:8685-91). Aunque la mayor parte de la osteocalcina sintetizada se absorbe a la hidroxiapatita de hueso mediante ácidos glutámicos γ -carboxilados (Gla), una pequeña parte de la misma pasa a la circulación sanguínea en la que puede detectarse (Price *et al.* J Biol Chem 1981; 256:12760-6). También se cree que parte de la hOC hallada en la sangre se origina a partir del proceso de resorción, cuando se libera la hOC en el interior de los tejidos óseos durante la degradación ósea (Gundberg y Weinstein J Clin Invest 1986; 77:1762-7). Los niveles de hOC circulante se han utilizado ampliamente en las investigaciones clínicas como marcador de la formación ósea (Power y Fottrell Crit Rev Clin Lab Sci 1991; 28:287-335) y se ha demostrado que los niveles de hOC séricos están correlacionados con las mediciones de densidad mineral ósea en muchas situaciones (Yasamura *et al.* J Clin Endocrinol Metab 1987; 64:681-S).

Los resultados discordantes obtenidos a partir de diferentes ensayos de hOC han dificultado la utilización generalizada de hOC en aplicaciones clínicas (Masters *et al.* Clin Chem 1994; 40:358-63, Deftos *et al.* Clin Chem 1992; 38:2318-21, Delmas *et al.* J Bone Miner Res 1990; 5:5-11 y Diego *et al.* 1994; 40:2071-7). Este fenómeno podría explicarse parcialmente debido a los diferentes formatos de ensayo es decir ensayos de tipo sándwich frente a competitivos o debido a las diferentes técnicas de detección. En la actualidad no se encuentra disponible ningún patrón de calibración. Sin embargo, incluso si se utiliza la misma preparación patrón, los niveles de hOC medidos en diferentes laboratorios no pueden compararse directamente (Delmas *et al.* J Bone Miner Res 1990). La diversidad de la propia molécula de hOC en circulación presenta una contribución evidente a su inmunorreactividad en diversos ensayos. El grado de γ -carboxilación dependiente de la vitamina K del residuo de ácido glutámico varía (Poser *et al.* J Biol Chem 1980; 255:8685-91). La insuficiencia de γ -carboxilación de hOC purificada a partir de hueso se ha indicado por Cairns y Price, J Bone Min Res 1994; 9:1989-97 y confirmado en estos estudios (Hellman *et al.* J Bone Miner Res 1996; 11:1165-75). Se sabe que cuando Ca^{2+} se une a residuos de Gla se forma una estructura de hélice α (Hauschka y Carr, Biochemistry 1982; 21:2538-47 y Atkinson *et al.* Eur J Biochem 1995; 232: 515-21). Tras la eliminación de Ca^{2+} con EDTA se destruye esta conformación helicoidal. La conformación de OC descarboxilada se encuentra aproximadamente entre la forma helicoidal o de hélice aleatoria. Por tanto, en disolución el péptido aparece como una estructura flexible y no puede definirse una única conformación para el mismo (Atkinson *et al.* Eur J Biochem 1995; 232:515-21). Los enlaces peptídicos entre los residuos de arginina 19 y 20 y entre los residuos 43 y 44 son susceptibles de experimentar hidrólisis trípica que conduce a los péptidos 1-19, 20-43, 45-49, 1-43 y 20-49 que pueden ser los productos principales de la degradación de hOC en la circulación (Farrugia y Melick, Calcif Tissue Int 1986; 39:234-8, Hellman *et al.* J Bone Miner Res 1996; 11: 1165-75 y Gamero *et al.* J Bone Miner Res 1994; 9:255-4). Se han descubierto múltiples formas inmunorreactivas de hOC en circulación (Garnero *et al.* J Bone Miner Res 1994; 9:255-4) y también en la orina (Matikainen *et al.* J Bone Miner Res 1999; 14:431-8, Taylor *et al.* J Clin Endocrinol Metab 1990; 70:467-72). Los fragmentos de hOC pueden producirse o bien durante la degradación osteoclástica de la matriz ósea o como resultado de la degradación catabólica de la proteína circulante tras la síntesis por osteoblastos.

El grado de γ -carboxilación dependiente de la vitamina K en los residuos de ácido glutámico varía, de modo que la hOC circulante es un conjunto de moléculas de hOC con γ -carboxilación variable (Cairns y Price J Bone Min Res 1994;9:1989-97). Durante los últimos años, se ha investigado la relevancia del grado de γ -carboxilación de osteocalcina para predecir el estado del recambio óseo. Es conocido que la osteocalcina se une al contenido mineral óseo, la hidroxiapatita, mediante ácidos glutámicos γ -carboxilados. Por tanto, la hidroxiapatita se ha utilizado para distinguir la forma de proteína completamente γ -carboxilada de las formas no carboxilada o subcarboxilada (uchOC) (Price *et al.* J Biol Chem 1981;256:12760-6). Se ha informado de que la capacidad de unión a hidroxiapatita de la osteocalcina circulante es anormalmente baja en ancianos cuando se compara con el grupo premenopáusico (Knapen *et al.* Ann Intern Med 1989;111:1001-5, Merle y Delmas Bone Miner 1990;11:237-45). Szulc *et al.* (J Clin Invest 1993;91:1769-74, J Bone Miner Res 1994;9:1591-5, Bone 1996;18:487-8) han demostrado que la uchOC circulante es un marcador del riesgo de fractura de cadera en una población de mujeres internadas y que la BMD (densidad mineral ósea) disminuye significativamente en mujeres con uchOC elevada. Sin embargo, los ensayos basados en hidroxiapatita proporcionan solamente una estimación bruta del grado de carboxilación. La separación completa de las dos formas es difícil debido a la unión incompleta de formas carboxiladas a concentraciones inferiores y particularmente debido a la unión no específica de osteocalcina subcarboxilada a concentraciones superiores (Merle y Delmas Bone Miner 1990;11:237-45, Käkönen *et al.* Protein Expres Purif 1996;8:137-44, Szulc *et al.* J Clin Invest 1993;91:1769-74). Además, los procedimientos podrían ser sensibles a los cambios en condiciones tampón y la calidad de los reactivos de hidroxiapatita empleados. Gundberg *et al.* demostraron que N-terminal se une menos. Recientemente, Vergnaud *et al.* (J Clin Endocrinol Metab 1997;82:719-24) desarrollaron un nuevo ELISA para detectar uchOC basado en AcM, con

baja reactividad cruzada con respecto a la hOC carboxilada. Utilizando este inmunoensayo específico demostraron que la uchOC, pero no la hOC total, predecía el riesgo de fractura de cadera independientemente de la masa ósea en mujeres ancianas que provenían de la población general. Las fracturas osteoporóticas presentan graves consecuencias entre los ancianos. Dan como resultado una elevada mortalidad, una frecuente hospitalización, costes sanitarios elevados, deterioro funcional, dolor y una reducción de la calidad de vida (Ross Arch Intern Med 1996;156:1399-411). Por tanto, son necesarios procedimientos válidos fácilmente implementados para evaluar el riesgo de fractura.

Una baja densidad ósea predice la aparición de fractura (Hui *et al.* Ann Intern Med 1989;111:355-61, Melton *et al.* J Bone Miner Res 1993;8:1227-33) y de fractura de cadera (Cummings *et al.* Lancet 1993;341:72-5). La osteocalcina sérica como medida del aumento de recambio óseo es un determinante de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas, y las concentraciones séricas de osteocalcina aumentan al avanzar la edad (Garnero *et al.* J Bone Miner Res 1996;11:337-49, Melton *et al.* J Bone Miner Res 1997;12:1083-91), tanto en hombres como en mujeres (Epstein *et al.* Lancet 1984;307-10). Los resultados referentes a la relación entre la osteocalcina y la aparición de fractura son contradictorios, ya que algunos autores sugieren que existe una asociación positiva (Riis *et al.* Bone 1996;19:9-12), mientras que otros sugieren que no existe ninguna asociación (Åkesson *et al.* J Bone Miner Res 1995;10:1823-9, Garnero *et al.* J Bone Miner Res 1996;11:1531-8).

El grado de γ -carboxilación dependiente de la vitamina K de la osteocalcina (Plantalech *et al.* J Bone Miner Res 1991;6:1211-6, Obrant *et al.*, J Bone Miner Res 1999;14:555-60) se reduce con el envejecimiento (Knapen *et al.* Ann Intern Med 1989;111:1001-5, Merle y Delmas Bone Min 1990;11:237-45) y afectando la capacidad de unión a calcio de la proteína puede conducir a osteopenia (Pastoreau *et al.* J Bone Miner Res 1993;8:1417-26). A la par de estos hallazgos, las altas proporciones de osteocalcina subcarboxilada se asocian a la aparición de fracturas de cadera en los ancianos internados (Szulc *et al.* J Clin Invest 1993;91:1769-74). Este hallazgo se apoyó por los resultados de un estudio caso-control dentro de un estudio de gran perspectiva entre mujeres sanas que viven en una comunidad de ancianos (Vergnaud *et al.* J Clin Endocrinol Metab 1997;82:719-24).

Sumario de la invención

Según un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la evaluación de la fragilidad ósea y el riesgo de fractura, o la osteoporosis, en una persona, que comprende las etapas siguientes

- a) medir la concentración de osteocalcina gamma-carboxilada (COC) por medio de por lo menos un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmento del mismo que es específico para la osteocalcina gamma-carboxilada y siendo un anticuerpo o fragmento cuya especificidad para la osteocalcina gamma-carboxilada depende de la presencia de iones Ca^{2+} , disminuyendo dicha especificidad en presencia de dichos iones Ca^{2+} ; y también la concentración de osteocalcina total (TOC) u osteocalcina intacta (IOC) en una muestra de suero o de plasma de dicha persona,
 - b) comparar la razón determinada COC/TOC o COC/IOC para dicha persona con la razón media COC/TOC (razón media COC/TOC) o COC/IOC, respectivamente determinadas a partir de mediciones en unas muestras de fluidos corporales similares de la población del mismo sexo y edad,
- y
- c) utilizar la razón determinada COC/TOC o COC/IOC que es inferior a la razón media COC/TOC o COC/IOC, respectivamente como indicación de osteoporosis, fragilidad ósea o aumento del riesgo de fractura ósea en dicha persona.

Según otro aspecto, esta invención se refiere a un kit para la evaluación de la fragilidad ósea y el riesgo de fractura ósea, o la osteoporosis en una persona, que comprende un reactivo de captura que consiste en por lo menos un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmento del mismo que es específico para la osteocalcina gamma-carboxilada en una muestra de suero o de plasma de dicha persona que es un anticuerpo o fragmento cuya especificidad por la osteocalcina gamma-carboxilada depende de la presencia de iones Ca^{2+} , disminuyendo dicha especificidad en presencia de dichos iones Ca^{2+} , y un reactivo de detección, que puede detectar el complejo formado entre el reactivo de captura y el antígeno; y que comprende asimismo otro reactivo de captura que consiste en por lo menos un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmento del mismo, pudiendo capturar dicho anticuerpo o fragmento cualquier osteocalcina (OC intacta; OC total) en una muestra de suero o de plasma de una persona, y un reactivo de detección, que puede detectar el complejo formado entre el reactivo de captura y el antígeno.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Una representación de los epítomos reconocidos por los AcM utilizados en ensayos de hOC de dos sitios. La molécula se ha dividido en cuatro zonas supuestas, de las que cada una está reconociéndose por diferentes AcM. Los aminoácidos amino y carboxi-terminales se han marcado como 1 y 49, respectivamente. Los sitios sensibles a proteasa se han indicado como R-R (arginina-arginina), los tres residuos de Gla se muestran también como el puente disulfuro (C-C).

Figura 2. Curvas de dosis-respuesta de los ensayos nº 2 (IOC, cuadrado en negro), nº 4 (TOC, círculo en negro) y nº 9 (COC, triángulo en negro) dados como recuentos de fluorescencia frente a concentraciones convencionales de hOC a lo largo del intervalo (0,017, 13,5 nM) y CV intraensayo correspondientes (símbolos en blanco) calculados a partir de 12 repeticiones.

Figura 3. Las razones de concentración COC/TOC (nº 9/nº 4) y COC/IOC (nº 9/nº 2) en sujetos tratados con warfarina (n=37) y sujetos control (n=30). Las líneas horizontales de los diagramas de cajas representan los percentiles 10, 25, 50, 75 y 90.

Descripción detallada de la invención

Para la evaluación de riesgo de fractura entre los ancianos son necesarios procedimientos válidos y de fácil puesta en práctica. Las hOC γ -carboxilada, total e intacta séricas se midieron mediante ensayos inmunofluorométricos de osteocalcina en 792 personas que viven en su hogar de 70 años o mayores mediante ensayos inmunofluorométricos de dos sitios en una etapa. La aparición de fracturas se siguió durante cinco años. La hOC γ -carboxilada sérica y especialmente, la razón de hOC γ -carboxilada con respecto a hOC total o hOC γ -carboxilada con respecto a hOC intacta predecían la aparición de fracturas independientemente de otros factores de riesgo de fracturas iniciales relacionados con los sujetos. El mayor riesgo relativo se daba en la población mayor de 80 años y el valor de predicción duraba tres años. La medición de la razón es un procedimiento válido y de fácil puesta en práctica para la evaluación de riesgo de fractura entre los ancianos.

En la presente invención, debe entenderse que la expresión "osteocalcina intacta" o IOC en una muestra de fluido corporal de una persona incluye el fragmento de longitud completa de la molécula de osteocalcina, independientemente de su gamma-carboxilación. Debe entenderse que la expresión "osteocalcina total" o TOC en una muestra de fluido corporal de una persona incluye el fragmento de longitud completa y/o un fragmento NH₂-terminal grande de la molécula de osteocalcina, independientemente de su gamma-carboxilación. La expresión "osteocalcina gamma-carboxilada" o COC incluye las osteocalcinas mono-, di- y tricarboxiladas, pero no formas no carboxiladas de osteocalcina. Fluidos corporales adecuados para la medición de estos marcadores son por ejemplo suero, plasma u orina.

Puede considerarse que una persona pertenece a un grupo con propensión a padecer osteoporosis, fragilidad ósea o aumento del riesgo de fractura ósea si dicha razón del fluido corporal de la persona de "osteocalcina gamma-carboxilada con respecto a osteocalcina intacta" (COC/IOC) o de "osteocalcina gamma-carboxilada con respecto a osteocalcina total" (COC/TOC) es inferior al valor de COC/IOC o al valor de COC/TOC medio de la población del mismo sexo y edad.

Debe entenderse que el término "fragmento" de anticuerpo significa un fragmento de anticuerpo producido de manera recombinante o proteolítica.

La osteocalcina gamma-carboxilada (COC) se mide por medio de por lo menos un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmento del mismo, siendo dicho anticuerpo o fragmento específico para la osteocalcina gamma-carboxilada. Se utilizan un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, o una mezcla de varios anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos para reconocer uno cualquiera de los epítopos específicos para la osteocalcina gamma-carboxilada. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento reconoce un epítipo que aparece en la región de los aminoácidos 17-24 de la molécula de osteocalcina gamma-carboxilada. Según otra forma de realización preferida, el anticuerpo o fragmento reconoce la estructura terciaria asociada a la osteocalcina gamma-carboxilada.

La especificidad del anticuerpo o fragmento por la osteocalcina gamma-carboxilada depende de la presencia de iones metálicos divalentes, tales como Ca²⁺. La especificidad disminuye en presencia de dichos iones metálicos.

El reactivo de detección debe entenderse como un anticuerpo monoclonal o policlonal marcado o fragmento del mismo que puede unirse al complejo formado entre el anticuerpo de captura (o fragmento de anticuerpo) y el antígeno.

La invención se da a conocer con mayor detalle en la sección experimental.

Sección experimental

1. Producción de los anticuerpos monoclonales frente a osteocalcina

Materiales y equipo

Se produjo GST-rhOC (GST = glutatión S-transferasa) utilizada como inmunógeno tal como se describe (Käkönen *et al.* Prot Exp Purif 1996; 3:137-44). La osteocalcina bovina (bOC) se obtuvo de Bidesign International, Kennebunkport, ME. El adyuvante completo de Freund (Fca) y el adyuvante incompleto de Freund (Fia) se obtuvieron de Sigma Immuno Chemicals, St Louis, MO. Optimem-1 con glutamax-1, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, 10 x líquido), L-glutamina, piruvato de sodio (sometido a prueba para cultivo tisular), bicarbonato de sodio

(calidad para cultivo tisular) y disolución de penicilina-estreptomina (P/S) se adquirieron de Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, Hepes de Boehringer Mannheim, Alemania y el suero bovino fetal de Hyclone, Logan, UT y se utilizaron como componentes en los medios de cultivo. Los reactivos y el equipo utilizados para la selección de líneas celulares de hibridoma específicas de hOC se obtuvieron de Wallac Oy, Turku, Finlandia excepto la hOC marcada con europio que se preparó según Hellman *et al.* (J Bone Miner Res 1996; 11: 1165-75). El biorreactor de fibra hueca Tecnomouse utilizado para la producción a gran escala de AcM se obtuvo de Integra Biosciences AG, Wallisellen, Suiza y la proteína A-agarosa Affigel® para la purificación de los AcM se obtuvo de Bio-Rad, Richmond, CA.

10 *Inmunización de los ratones y selección de los AcM específicos frente a hOC*

Anteriormente se ha descrito la utilización de proteína de fusión de OC recombinante como inmunógeno (Matikainen *et al.* En "Animal cell technology: Developments towards the 21st century" 1995; páginas 475-9). Se inmunizó por vía intraperitoneal un ratón Balb/c macho de diez meses de edad con 413 µg de antígeno de GST-rhOC (correspondiente a 75 µg de la parte de rhOC) mezclados con Fca. Se le administró una inmunización de recuerdo al ratón 15 semanas más tarde con 358 del mismo antígeno (60 µg de rhOC) mezclados en Fia. La dosis de inmunización de recuerdo final, 110 µg de antígeno (20 µg de rhOC) en PBS se administró por vía i.p. tras 8 semanas.

Se acopló la osteocalcina bovina a hemocianina de lapa californiana (KLH) tal como se describe (Young *et al.* Prostaglandines 1982; 23:603-13). Se inmunizaron por vía i.p. dos ratones macho Balb/c de tres meses de edad con 50 µg de antígeno de bOC-KLH mezclado con Fca. Se les administró una inmunización de recuerdo a los ratones con la misma cantidad de antígeno en Fia. La dosis de inmunización de recuerdo final, 10 µg de bOC-KLH en PBS, se administró por vía intravenosa.

Tres días tras la inmunización de recuerdo final se fusionaron esplenocitos a células de mieloma de ratón SP 2/0 tal como se describió en más detalle anteriormente (Lilja *et al.* Clin Chem 1991; 37:1618-25). Se hicieron crecer los hibridomas en Optimem-1 con glutamax-1 que contenía suero bovino fetal al 20%. Se seleccionaron los AcM específicos frente a hOC con un ensayo inmunofluorimétrico (IFMA) utilizando pocillos de microtitulación con Ig de conejo anti-ratón y hOC marcada con europio tal como se describió anteriormente (Matikainen *et al.* 1995).

35 *Producción y purificación a gran escala de los AcM*

Antes de la producción a gran escala de los AcM, se clonaron los hibridomas positivos por lo menos dos veces mediante el procedimiento de dilución limitante. Se utilizó Optimem-1 con glutamax-1 complementado con suero bovino fetal al 20% como medio de cultivo. Se seleccionaron las líneas celulares 2H9F11F8 (2H9) y 6F9G4E10 (6F9) obtenidas de la inmunización con GST-rhOC y 3H8H2D2A12F12 (3H8) obtenida de la inmunización con bOC para su caracterización adicional. Se produjeron los AcM en un biorreactor de fibra hueca Tecnomouse. Se utilizó DMEM (disolución 1 x) complementado con L-glutamina, Hepes, piruvato de sodio, bicarbonato de sodio y P/S como medio de cultivo en circulación intracápsular. Se utilizó Optimem-1 con glutamax-1 complementado con suero bovino fetal al 2,5% como medio de recogida en la zona extracápsular. Se purificaron los AcM producidos mediante cromatografía en proteína A-agarosa utilizando el kit de purificación Affigel® según las sugerencias del fabricante.

50 *2. Mapeo de epítomos, caracterización de los AcM y ensayos de dos sitios*

Materiales y equipo

En la determinación de las subclases de los AcM, las placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina se obtuvieron de Wallac Oy y los AcM específicos de la subclase Ig de rata anti-ratón biotinilada de Serotec, Oxford, Inglaterra. Para el mapeo de epítomos, el péptido de osteocalcina sintético 7-19 que contenía Glu en el residuo 17 se adquirió de Bachem, Suiza y la osteocalcina bovina (bOC) se obtuvo de Biodesign International, Kennebunkport, ME. Se purificó la osteocalcina de fémures humanos modificando un procedimiento descrito anteriormente (Gundberg *et al.* Meth Enzymol 1984; 107:516-544) tal como se explica en detalle por Hellman *et al.* (1996). Anteriormente se ha descrito también la digestión con carboxipeptidasa Y, digestión con tripsina, alquilación y descarboxilación de hOC (Hellman *et al.* 1996). La caracterización detallada de la hOC y sus modificaciones se describen por Hellman *et al.* (1996). Las formas recombinantes de osteocalcina se produjeron tal como se describió anteriormente (Käkönen *et al.* Protein Express Purif 1996; 8:137-44).

La producción y purificación de una forma truncada de rhOC (rhOC del.) (que carece de 10 residuos de aminoácido COOH-terminales) de un gen que portaba una mutación de parada en la región estructural se realizaron en condiciones similares. Tanto rhOC como rhOC del. presentan una extensión de tres residuos de aminoácidos en sus extremos NH₂ terminales; además, carecen de la γ-carboxilación características de la hOC aislada a partir de hueso. Los reactivos para la biotinilación, isotiocianato de biotina (BITC) y el marcado, quelato de europio (III) de 4-[2-(4-

isotiocianatofenil)etnil]-2,6-bis-[[N,N-bis(carboximetil)amino]-metil]piridina (Takalo *et al.* Helv Chim Acta 1993; 76:877-83) procedían de Wallac Oy. Las placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina, el tampón Delfia®, la disolución de lavado Delfia®, la disolución de potenciación Delfia® y el fluorómetro de investigación Delfia®, modelo 1234 utilizado en mediciones de IFMA se obtuvieron de Wallac Oy. Los reactivos y el equipo utilizados en los inmunoensayos fueron similares a lo largo del estudio.

Caracterización de los AcM

El marcado de los péptidos para la determinación de subclases y el mapeo de epítomos se realizaron según Hellman *et al.* 1996. Los AcM 3G8, 6F9 y 3H8 pertenecían a la subclase IgG1 y el AcM 2H9 a la subclase IgG2a tal como se determina según Matikainen *et al.*, 1995.

Se caracterizaron los AcM para determinar su unión a hOC intacta, bOC y péptidos tripticos o sintéticos marcados con Eu tal como se describe (Hellman *et al.* 1996). El AcM 3H8 obtenido mediante inmunización con bOC conjugado a KLH reconocía el fragmento 20-43 triptico. El AcM 6F9 reconocía los péptidos 1-19 triptico y 7-19 sintético. El AcM 2H9 reconocía el péptido 20-43 triptico. El AcM 3G8 reconocía solamente hOC no marcada de longitud completa y hOC cuando se sometía a prueba con combinaciones de dos sitios. Resumen de los AcM en la tabla 1. Según la información obtenida se creó un mapa de epítomos (figura 1).

TABLA 1

Caracterización de AcM frente a hOC

Clon de hibri-doma	Inmunógeno	Clase de inmunoglobulina	Formas de OC marcadas con Eu reconocidas					
			Eu- hOC	Eu-hOC (1-19)	Eu-hOC (7-19)	Eu-hOC (15-31)	Eu- hOC	(20-43) Eu-bOC
2H9	rGST-hOC	IgG2a	+	-	-	+	+	+
3H8	bOC-KLH	IgG1	+	-	-	+	+	+
6F9	rGST-hOC	IgG1	+	+	+	+	-	-
3G8	bOC-KLH	IgG1	+	-	-	+	-	+

*El AcM 3G8 reconoce bOC y hOC sin marcar cuando se somete a prueba con combinaciones de dos sitios.

Biotinilación y marcado con Eu de los AcM

Con el fin de crear ensayos de combinación de dos sitios, se biotinilaron los AcM 3G8, 2H9 y 6F9 con BITC y se marcaron los AcM 2H9, 6F9 y 3H8 con quelato de europio (III) en las condiciones de reacción descritas anteriormente (Hellman *et al.*, 1996). El inmunoensayo de dos sitios utilizaba fluorimetría de resolución temporal utilizando marcadores de quelato lantánido, como europio, como sistema de detección (Soini y Lövgren CRC Crit Rev Anal Chem. 1987; 18:105-53).

Caracterización de los ensayos de dos sitios

Las combinaciones de dos sitios nº 2, nº 4 y nº 9 se validaron en más detalle mediante la determinación de las reactividades cruzadas para la hOC alquilada, hOC descarboxilada, hOC Y-digerida con carboxipeptidasa (CPY-hOC), hOC recombinante y hOC recombinante truncada. Según la información obtenida mediante la determinación de la reactividad cruzada y el mapeo de epítomos, el ensayo nº 2 (bio-3G8/Eu-2H9) podía detectar solamente hOC de longitud completa (hOC intacta o IOC). Los ensayos nº 4 (bio-2H9/Eu-6F9) y nº 9 (bio-6F9/Eu-3H8) podían detectar la hOC de longitud completa (1-49) y también el fragmento NH₂-terminal grande (1-43). Los ensayos nº 2 y nº 4 medían tanto la forma γ -carboxilada como completamente descarboxilada de hOC. El ensayo nº 9 prefería de manera muy particular la forma carboxilada de hOC (hOC γ -carboxilada de COC). La determinación de las constantes de afinidad de los AcM marcados se realizó según Hellman *et al.* 1996 utilizando el análisis de Scatchard (Scatchard, Ann NY Acad Sci 1949; 51: 660-72). En la tabla 2, se resumen las características de los ensayos.

TABLA 2

Características de los IFMA n° 2, n° 4 y n° 9

Antígeno	Tampón ^a	Constante de afinidad/B _{máx} ^b	n° 2 (bio-3G8/Eu-2H9)	n° 4 (bio-2H9/Eu-6F9)	n° 9 (bio-6F9/Eu-3H8)
hOC	AB+EDTA	Constante de afinidad	3,4	0,83	0,64
		B _{máx}	1,2	0,44	0,3
	AB	Constante de afinidad	3,3	0,7	0,68
		B _{máx}	1,4	0,47	0,35
	AB+CaCl ₂	Constante de afinidad	4,2	0,42	0,2
		B _{máx}	1,4	0,26	0,1
rhOC	AB+EDTA	Constante de afinidad	5,7	0,25	c
		B _{máx}	0,92	0,17	c
	AB	Constante de afinidad	5,9	0,19	c
		B _{máx}	0,94	0,23	c
	AB+CaCl ₂	Constante de afinidad	6,0	0,19	c
		B _{máx}	0,92	0,12	c
Reactividad cruzada en porcentaje (p/p) ^d		hOC	100	100	100
		hOC desc.	64	46	8
		rhOC	69	44	7
		CPYhOC	9	150	156
		rhOC del.	1	65	6
		hOC alquil.	76	75	3

^a Se utilizó tampón de ensayo (Wallac Oy) como tal, con EDTA 5 mM o con CaCl₂ 25 mM.

^b Las constantes de afinidad se expresan como el valor x 10⁹ l/mol y los valores de B_{máx} como el valor x 10¹⁰ mol/l.

^c Constante de afinidad y B_{máx} por debajo del límite de detección.

^d Medido tal como se describe en Hellman *et al.*

Además de ensayos no competitivos de dos sitios, los anticuerpos específicos frente a hOC podrían utilizarse en ensayos competitivos como anticuerpo de captura. En el ensayo competitivo, las formas de hOC en la muestra compiten con los péptidos de hOC o hOC marcada con Eu por la unión al número limitado de AcM de captura. Con los AcM 2H9 y 3H8 también podría utilizarse bOC marcada con Eu debido a la reactividad cruzada explicada en la tabla 1.

3. Procedimientos de ensayo optimizado para la medición de OC intacta, total y γ -carboxilada

Materiales y equipo

En la sección anterior, se han caracterizado los AcM empleados. Además de los AcM producidos en cultivos celulares de hibridoma, también podrían utilizarse fragmentos de anticuerpo recombinante en el concepto de ensayo. Las hOC y CPYhOC utilizadas para la normalización de los ensayos se produjeron tal como se explica en la sección 2. BSA tratada con DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) en tampón TSA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ 15 mM, pH 7,75) utilizada como diluyente en la normalización, se obtuvo de Wallac Oy. En la sección 2 se han enumerado los materiales y el equipo utilizados en los IFMA de OC.

Ensayos todo en uno

Se añadieron 10 μ l de muestras y patrones a cada pocillo de placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina seguido de una mezcla de AcM biotinilados y marcados con Eu en 50 μ l de tampón de ensayo Delfia[®] que contenía ED-

ES 2 320 848 T3

TA 5 mM. La cantidad de AcM de captura era de 200 ng/pocillo y 200 (nº 4) o 100 ng (nº 2 y nº 9) por pocillo de AcM trazadores. Se incubaron las placas con agitación continua a temperatura ambiente (durante 2 horas) o a +35°C (durante 1 hora) seguido de un lavado de seis veces con disolución de lavado Delfia®. Para potenciar la fluorescencia del quelato de Eu, se añadieron 200 µl de disolución de potenciación Delfia® por pocillo, tras lo que se agitaron las placas durante 30 min. a temperatura ambiente. Se midió la señal con el fluorómetro de investigación Delfia® (modelo 1234, Wallac).

Los tres ensayos permiten una estimación sensible de hOC en el intervalo de concentración de hOC desde 0,1-90 µg/l. En la figura 2 se representan los perfiles de precisión obtenidos de 12 repeticiones de cada calibrador patrón de cada ensayo. Los CV variaban entre el 2 y el 8 por ciento por encima del intervalo convencional. Los límites de detección, definidos como la concentración correspondiente al valor medio de 12 determinaciones del calibrador cero + 2 DE, eran de 0,06, 0,05 µg/l y 0,07 µg/l para los IFMA nº 2, nº 4 y nº 9, respectivamente. Se calcularon las variaciones intra e interensayo de los ensayos con tres muestras de suero que contenían una concentración baja, media y alta de hOC. Los CV intraensayo eran inferiores al 5% (n=12) y los CV interensayo (n=12) eran inferiores al 8% en cada uno de los ensayos. La linealidad de los ensayos era excelente tal como se estimaba mediante diluciones de 2, 4 y 8 veces de cinco muestras de suero con el calibrador cero. Las recuperaciones analíticas de hOC (10, 20 y 50 µg/l tal como se cuantifica mediante secuenciación N-terminal) añadidas a sueros humanos (n=9) fueron del 92±8,2%, 91±5,3% y el 95±4,6% para los IFMA nº 4 y nº 9, respectivamente. Las características de estos ensayos se han descrito en detalle por Käkönen *et al.* Clin Chem 2000;46:332-7.

4. Determinación de concentraciones de osteocalcina en pacientes tratados con warfarina

Materiales y equipo

En la sección 3 se han descrito los protocolos de los IFMA de OC que medían la hOC total (nº 4) o γ-carboxilada (nº 9).

Sujetos y recogida de muestras

Se estudió la respuesta al tratamiento que afectaba a la γ-carboxilación de hOC utilizando una cohorte clínica de 37 pacientes con tratamiento continuo con warfarina (19 mujeres y 18 hombres, 73±8 años) y 30 controles de la misma edad sin tratar (12 mujeres y 18 hombres, 72±6 años). Todas las mujeres eran posmenopáusicas. El fármaco de warfarina se había administrado para tromboembolia recurrente o cardiopatía crónica durante por lo menos 12 meses y la dosificación semanal variaba entre 8,75-78,75 mg (media, 33,6). Todos menos uno de los pacientes presentaban niveles terapéuticos de protrombina (PT) con una INR (razón normalizada internacional) de 2,0-3,8 tal como se mide mediante la prueba de complejo de protrombina (SPA 50, Diagnostic Stago, Francia). Un paciente tomaba una mini-dosis fijada de warfarina (1,25 mg/día) y presentaba un nivel de PT normal. Se midió la concentración de hOC en las muestras de suero con los IFMA de OC nº 4 y nº 9. Se recogió el panel de warfarina en el Hospital Universitario de Malmö, Suecia y se aprobó el estudio en todas las partes por el comité ético local. La información detallada de este panel se ha notificado por Obrant *et al.* J Bone Miner Res;1999;14:555-60.

Osteocalcina total y γ-carboxilada en sujetos tratados con warfarina

La concentración de hOC tal como se mide con el ensayo nº 9 era inferior en los pacientes tratados con warfarina en comparación con los pacientes de control (tabla 3.). A la inversa, no había ninguna diferencia significativa entre los pacientes tratados con warfarina y los controles en la cantidad de hOC total medida mediante el ensayo nº 4. Además, la proporción de hOC carboxilada/hOC total era extraordinariamente baja en los pacientes tratados con warfarina en comparación con los controles (p<0,0001) y un solo nivel de límite de corte de 0,8 separaba completamente los dos grupos de pacientes (figura 3).

TABLA 3

Niveles séricos de hOC total y γ-carboxilada y la razón de hOC γ-carboxilada con respecto a hOC total en 37 pacientes tratados con warfarina y 30 pacientes control (media ± DE)

	OC total (nº 4) (ng/ml)	OC carboxilada (nº 9) (ng/ml)	OC carboxilada/ OC total
Pacientes tratados con warfarina	9,4±8,9	4,9±3,8	0,55±0,11
Pacientes control	12,7±10,6	13,1±9,7	1,07±0,09
Nivel de significación	n.s.	p<0,0001	p<0,0001

5. Determinación de concentraciones de osteocalcina en ancianos

Materiales y equipo

5 En la sección 3 se han descrito los protocolos de los IFMA de OC que miden la hOC intacta, total o γ -carboxilada.

Sujetos y recogida de muestras

10 La población consistía en su totalidad en personas de 70 años de edad o más que vivían en su hogar que habitaban en cinco municipios rurales alrededor de la ciudad de Oulu en el norte de Finlandia, a 1 de septiembre de 1991 (N=954). Los exámenes iniciales se llevaron a cabo durante del 1 de septiembre de 1991 al 29 de febrero de 1992 por dos equipos que consistían en un médico, dos enfermeras y un fisioterapeuta. Setecientos noventa y dos (el 87% de los vivos en el punto medio de los exámenes) participaron en estos exámenes y el registro de caídas. Las características de la población se describen en la tabla 4. Basándose en los datos de los registros médicos, las características de los que no participaron (53 hombres y 64 mujeres) no diferían de las de los participantes en cuanto a la edad; hombres 75,5 años (DE 4,8), mujeres 76,9 años (5,3); que vivían solos (43%); e incapacidad para salir de casa (11%).

TABLA 4

Características de la población del estudio (N=792)

Característica	Hombres (N=301)	Mujeres (N=491)
Edad, años (media, DE)	75,5 (4,9)	76,5 (4,9)
IMC, kg/m ² (media, DE)	26,8 (3,8)	29,1 (5,2)
Incapaz de salir de casa (%)	6	11
Mala autovaloración de su salud (%)	23	22
*Resultado del MMSE $\leq$ 23 (%)	32	31
Ninguna actividad de trabajo fuera de casa (%)	28	46
Utilización de estrógeno (%)	0	1

* Miniexamen del estado mental

45 Los equipos de investigación recogieron los datos por medio de cuestionarios por correo, entrevistas, exámenes clínicos y pruebas clínicas (Luukinen *et al.*, J Am Geriatr Soc 1997;45:1302-9; Koski *et al.*, Age Aging 1996;25:29-38). Las enfermeras recogieron muestras de suero, que se almacenaron tras centrifugación a -72°C. Se midieron las muestras con los IFMA de OC n° 2, n° 4 y n° 9. El análisis de las muestras de suero era ciego en lo que se refiere al registro de caídas.

55 El registro de caídas se dispuso tal como se describió en informes anteriores, y duró desde el día de la recogida del suero hasta el 31 de diciembre de 1996. Se comprobó la aparición de fracturas a partir de los registros médicos al final de cada año de seguimiento (Luukinen *et al.*, J Am Geriatr Soc 1997;45:1302-9; Luukinen *et al.*, J Am Geriatr Soc 1995;43:871-6). Las fracturas de cadera se elevaron a un total de 26, las fracturas de muñeca a 21 y otras fracturas a 65.

Concentraciones de hOC en personas ancianas

60 En la tabla 5 se describen las distribuciones de hOC intacta, hOC total, COC y las razones de COC/IOC y COC/TOC por edad y sexo. Las concentraciones de IOC no aumentaban al avanzar la edad en los hombres (Chi-cuadrado de Kruskal-Wallis = 5,51 df = 3, p = 0,1383), pero aumentaban en las mujeres (Chi-cuadrado de Kruskal-Wallis = 30,99, df = 3, p = 0,0001), y eran superiores en las mujeres que en los hombres (Chi-cuadrado de Kruskal-Wallis = 25,1 df = 1, p = 0,0001). Las concentraciones de TOC aumentaban al aumentar la edad en los hombres (ANOVA p = 0,009) y en las mujeres (p < 0,001), y eran superiores en las mujeres que en los hombres (p de Kruskal-Wallis < 0,001). Las concentraciones de COC aumentaban asimismo al avanzar la edad tanto en los hombres (ANOVA p =

0,012) como en las mujeres ($p < 0,001$), y eran superiores en las mujeres que en los hombres (p de Kruskal-Wallis $< 0,001$). No había ninguna diferencia en los valores de COC/IOC entre los grupos de edades en los hombres (Chi-cuadrado de Kruskal-Wallis = 3,73 $df = 3$, $p = 0,2916$), pero las concentraciones disminuían con la edad en las mujeres (Chi-cuadrado de Kruskal-Wallis = 18,59 $df = 3$, $p = 0,0003$). Los valores de COC/IOC eran superiores en los hombres que en las mujeres (Chi-cuadrado de Kruskal-Wallis = 6,26 $df = 1$, $p = 0,0124$). No había ninguna diferencia en los valores de COC/TOC entre los grupos de edades, ni en los hombres (ANOVA $p = 0,587$) ni en las mujeres ($p = 0,250$), pero de nuevo los valores de COC/TOC eran superiores en los hombres que en las mujeres (p de Kruskal-Wallis $< 0,001$).

TABLA 5

Distribuciones (media, DE) de concentraciones ($\mu\text{g/l}$) de osteocalcina intacta (IOC), total (TOC) y carboxilada (COC) y la razón COC/TOC en personas mayores por edad y sexo

Edad y sexo (N)	Media de TOC/COC (DE)	Media de COC/TOC (DE)	Media (DE)
Total (792)	10,83 (6,20)	9,21 (4,59)	0,94 (0,40)
Hombres (301)	9,31 (4,62)	8,41 (4,06)	0,95 (0,31)
70-74 años (142)	8,99 (4,64)	8,43 (4,35)	0,97 (0,28)
75-79 años (85)	8,64 (4,27)	7,45 (3,49)	0,91 (0,34)
80-84 años (54)	10,20 (4,19)	9,14 (3,58)	0,95 (0,29)
más de 85 años (20)	12,04 (5,91)	10,30 (4,64)	0,98 (0,46)
Mujeres (491)	11,77 (6,84)	9,71 (4,83)	0,93 (0,45)
70-74 años (176)	10,17 (6,01)	8,93 (4,19)	0,98 (0,39)
75-79 años (160)	11,54 (6,30)	9,45 (4,64)	0,91 (0,48)
80-84 años (109)	12,74 (7,02)	10,34 (5,17)	0,89 (0,40)
más de 85 años (46)	16,36 (8,69)	12,19 (6,09)	0,88 (0,58)

Edad y sexo (N)	Media de IOC (DE)	Media de COC (DE)	Media de COC/IOC (DE)
Total (775)	7,21 (4,39)	9,21 (4,59)	1,49 (0,93)
Hombres (294)	6,17 (3,23)	8,41 (4,06)	1,56 (1,09)
70-74 años (138)	6,13 (3,06)	8,43 (4,35)	1,54 (1,06)
75-79 años (83)	5,77 (3,29)	7,45 (3,49)	1,42 (0,63)
80-84 años (53)	6,47 (3,00)	9,14 (3,58)	1,69 (1,29)
más de 85 años (20)	7,27 (4,41)	10,30 (4,64)	1,98 (1,87)
Mujeres (481)	7,85 (4,85)	9,71 (4,83)	1,45 (0,82)
70-74 años (176)	6,68 (3,88)	8,93 (4,19)	1,58 (0,84)
75-79 años (157)	7,63 (4,62)	9,45 (4,64)	1,38 (0,69)
80-84 años (107)	8,72 (5,27)	10,34 (5,17)	1,36 (0,80)
más de 85 años (41)	11,18 (6,20)	12,19 (6,09)	1,42 (1,13)

En los hombres, los valores de COC, COC/IOC y COC/TOC eran inferiores en los casos de fractura que en los controles, pero no se encontró ninguna diferencia con respecto a la TOC o IOC. Las concentraciones de TOC y IOC eran superiores, y de nuevo los valores de COC/IOC y COC/TOC inferiores en la población femenina con fracturas que en sus controles, pero los valores de COC correspondientes no diferían (tabla 6).

TABLA 6

Distribuciones (media, DE) de osteocalcina intacta (IOC), osteocalcina total (TOC), osteocalcina carboxilada (COC) ($\mu\text{g/l}$) y las razones de IOC/COC y COC/TOC en los casos de fractura y los controles entre hombres y mujeres mayores que viven en su hogar

Sexo y forma de osteocalcina		<u>Casos de fractura</u>		<u>Controles</u>		
		N	Media (DE)	N	Media (DE)	p*
Hombres						
	IOC	21	6,54 (3,44)	274	6,14 (3,22)	0,587
	TOC	21	9,45 (4,76)	280	9,30 (4,69)	0,786
	COC	21	6,66 (4,22)	279	8,54 (4,03)	0,021
	COC/IOC	21	1,06 (0,48)	273	1,60 (1,11)	0,001
	COC/TOC	21	0,74 (0,36)	279	0,96 (0,30)	0,002
Mujeres						
	IOC	85	8,82 (5,30)	401	7,64 (4,73)	0,011
	TOC	85	13,45 (7,56)	406	11,42 (6,63)	0,006
	COC	84	9,17 (5,32)	403	9,82 (4,72)	0,073
	COC/IOC	83	1,18 (0,70)	398	1,51 (0,83)	<0,001
	COC/TOC	84	0,77 (0,46)	403	0,96 (0,44)	< 0,001

* Prueba de Kruskal-Wallis

En la tabla 7, se describen las tasas de incidencia y los riesgos relativos de fractura según IOC o TOC superiores ($\geq +1$ DE de la media), COC inferior (≤ -1 DE de la media) y COC/IOC y COC/TOC inferiores (≤ -1 DE de la media). Un valor de IOC o TOC superior no estaba asociado a la aparición de una fractura, pero valores inferiores de COC, COC/IOC y COC/TOC estaban asociados de manera positiva. Dicotomizado a -1 DE de la media de la población total del estudio, el riesgo de fractura relativo bruto en lo que se refiere a una razón COC/IOC y COC/TOC baja era de 2,31 (1,29-4,13) y 3,47 (2,23-5,42), respectivamente.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 7

Incidencia (/1000 personas-año) y riesgo relativo bruto (HRcr, CI del 95%) y ajustado (Hradj, CI del 95%) de fractura mediante osteocalcina intacta (IOC), osteocalcina total (TOC), osteocalcina carboxilada (COC) y osteocalcina carboxilada/intacta (COC/IOC) y osteocalcina carboxilada/total (COC/TOC) en personas mayores (N=792)

Forma de osteocalcina (punto de corte)		<u>Fracturas</u>			
		N	Incidencia	HRcr (CI al 95%)	Hradj*(CI al 95%)
IOC	(≥1 DE)	14	39	1,23 (0,70-2,15)	1,00 (0,54-1,86)
IOC	(<1 DE)	91	32	1,0 (ref.)	1,0 (ref.)
TOC	(>1 DE)	13	39	1,22 (0,68-2,17)	1,09 (0,57-2,07)
TOC	(<1 DE)	93	32	1,0 (ref.)	1,0 (ref.)
COC	(≤-1 DE)	21	53	1,77 (1,10-2,86)	2,00 (1,20-3,36)
COC	(>-1 DE)	84	30	1,0 (ref.)	1,0 (ref.)
COC/IOC	(≤-1 DE)	13	70	2,31 (1,29-4,13)	2,47 (1,32-4,64)
COC/IOC	(>-1 DE)	91	31	1,0 (ref.)	1,0 (ref.)
COC/TOC	(>-1 DE)	26	93	3,47 (2,23-5,42)	5,32 (3,26-8,68)
COC/TOC	(>-1 DE)	79	27	1,0 (ref.)	1,0 (ref.)

La DE de la media se calculó dentro de cada grupo de edad de 5 años (70-74, 75-79, 80-84 y más de 85) por separado en hombres y en mujeres (tabla 2).

* ajustado por edad, sexo, costumbre de realizar trabajo pesado fuera de casa, capacidad para salir de casa sin ayuda, capacidad para llevar una peso de 5 kg 100 metros, índice de masa corporal, miedo de caerse, accidente cerebrovascular, fuerza de extensión de la rodilla, estado cognitivo, agudeza visual, flujo espiratorio pico, utilización de medicación psicotrópica, utilización de medicación contra el Parkinson.

Se asociaron las siguientes variables iniciales ($p < 0,05$) a la aparición de fractura durante el periodo de seguimiento de cinco años: mayor edad (para el aumento de 5 años) (HR 1,35), sexo femenino (2,44), realizar trabajo pesado fuera de casa (0,50), incapacidad para salir de casa sin ayuda (2,28), incapacidad para llevar un peso de 5 kg 100 metros (2,28), escasa agudeza visual a distancia (2,65), fuerza de extensión de la rodilla reducida (2,64), miedo frecuente de caerse (2,86), flujo espiratorio pico bajo (≤ -1 DE de la media) (1,81), estado cognitivo bajo (resultado de prueba del minexamen del estado mental ≤ 23 puntos) (1,58), accidente cerebrovascular pasado (4,35), utilización de medicación contra el Parkinson (3,78) y utilización de medicación psicotrópica (2,08). Tras introducir estas variables en los análisis de regresión de Cox, COC y COC/TOC bajas predecían la aparición de fractura, pero IOC y TOC no lo hacían (tabla 7). El alto riesgo de fractura asociado a bajas concentraciones de COC y bajas razones de COC/IOC o COC/TOC aumentaba tras el ajuste para otros factores de riesgo de fractura, indicando contribuciones independientes.

Dicotomizado a -1 DE de la media de la población total del estudio, el riesgo de fractura relativo ajustado en lo que se refiere a una baja razón de COC/TOC era de 3,26 (2,01-5,25). En la población más joven (70-79 años) los riesgos de fractura relativos ajustados de múltiples variables en lo que se refiere a IOC, TOC altas (≥ 1 DE), COC baja, COC/IOC baja y COC/TOC baja eran de 0,63 (0,27-1,46), 1,34 (0,60-3,00), 2,04 (1,12-3,73), y 2,31 (1,16-4,61) y 4,36 (2,46-7,75), respectivamente. Las cifras correspondientes en la población mayor (≥ 80 años) eran de 1,05 (0,39-2,82), 1,44 (0,51-4,11), 1,51 (0,50-4,59), 2,64 (0,58-12,13) y 7,02 (2,42-20,39).

El aumento del riesgo de fractura asociado a una COC/TOC baja encontrada en este estudio se asemeja en magnitud al riesgo de fractura de cadera relativo presentado anteriormente en lo que se refiere a una combinación de baja densidad mineral ósea y osteocalcina con disminución de carboxilación (Vergnaud P *et al.*, J Clin Endocrinol Metab 1997;82:719-24). Se encontró que el aumento del riesgo de fractura con una COC/TOC baja era especialmente elevado entre las personas de mayor edad, lo que está a la par con el hallazgo de que osteocalcina subcarboxilada elevada predice fracturas de cadera (Vergnaud P *et al.*). Según estos resultados, es probable que los inmunoensayos simples para determinar la osteocalcina intacta, total y carboxilada demuestren ser herramientas eficaces en la evaluación a corto plazo del riesgo de fractura entre los ancianos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la evaluación de la fragilidad ósea y el riesgo de fractura, o la osteoporosis, en una persona, que comprende las etapas siguientes

- a) medir la concentración de osteocalcina gamma-carboxilada (COC) por medio de por lo menos un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmento del mismo que es específico para la osteocalcina gamma-carboxilada y siendo un anticuerpo o fragmento cuya especificidad para la osteocalcina gamma-carboxilada depende de la presencia de iones Ca^{2+} , disminuyendo dicha especificidad en presencia de dichos iones Ca^{2+} ; y también la concentración de osteocalcina intacta (IOC) u osteocalcina total (TOC) en una muestra de suero o de plasma de dicha persona,
- b) comparar la razón determinada COC/IOC o COC/TOC, para dicha persona con la razón media COC/IOC o la razón media COC/TOC, determinadas a partir de mediciones en unas muestras de fluidos corporales similares de la población del mismo sexo y edad, y
- c) utilizar la razón determinada COC/IOC o COC/TOC que es inferior a la razón media COC/IOC o la razón media COC/TOC como indicación de osteoporosis, fragilidad ósea o aumento del riesgo de fractura ósea en dicha persona.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que COC se mide por medio de un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, o una mezcla de varios anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos que reconocen cualquiera de los epítomos específicos para la osteocalcina gamma-carboxilada.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento de anticuerpo producido de manera recombinante o proteolítica.

4. Kit para la evaluación de la fragilidad ósea y el riesgo de fractura ósea, o la osteoporosis en una persona, que comprende un reactivo de captura constituido por lo menos un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmento del mismo que es específico para la osteocalcina gamma-carboxilada en una muestra de suero o de plasma de dicha persona y siendo un anticuerpo o fragmento cuya especificidad para la osteocalcina gamma-carboxilada depende de la presencia de iones Ca^{2+} , disminuyendo dicha especificidad en presencia de dichos iones Ca^{2+} , y un reactivo de detección, capaz de detectar el complejo formado entre el reactivo de captura y el antígeno; y que comprende asimismo otro reactivo de captura constituido por lo menos un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmento del mismo, pudiendo capturar dicho anticuerpo o fragmento la OC intacta o la OC total en una muestra de suero o de plasma de una persona, y un reactivo de detección, capaz de detectar el complejo formado entre el reactivo de captura y el antígeno.

5. Kit según la reivindicación 4, en el que el reactivo de captura es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, o una mezcla de varios anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos que reconocen cualquiera de los epítomos específicos para la osteocalcina gamma-carboxilada.

6. Kit según la reivindicación 4 ó 5, en el que el fragmento de anticuerpo de captura es un fragmento de anticuerpo producido de manera recombinante o proteolítica.

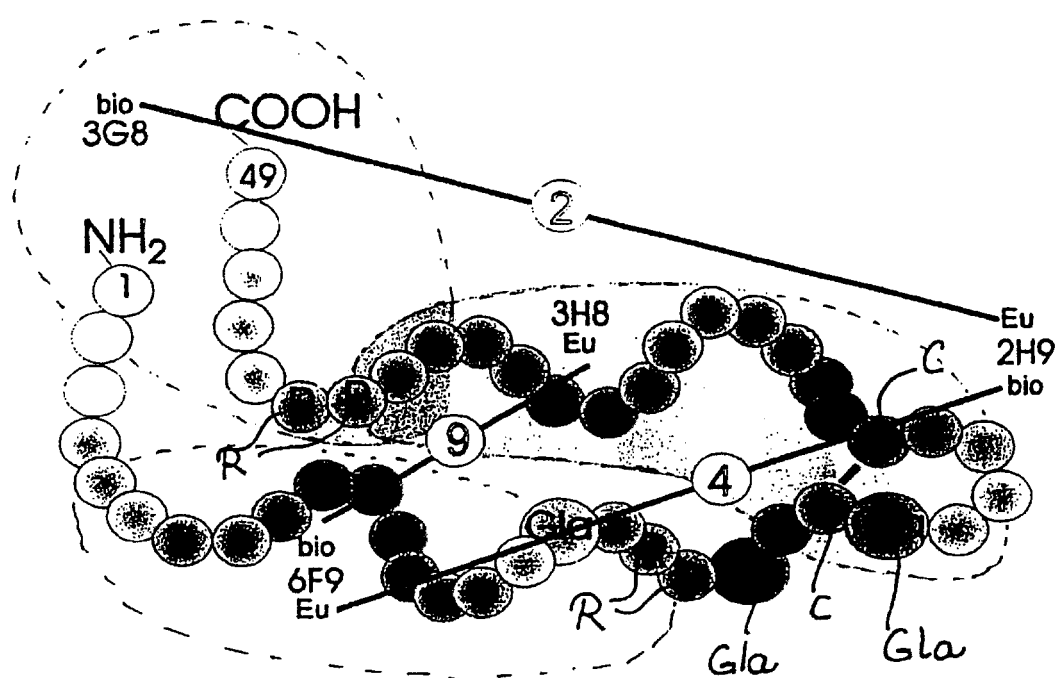


FIG. 1

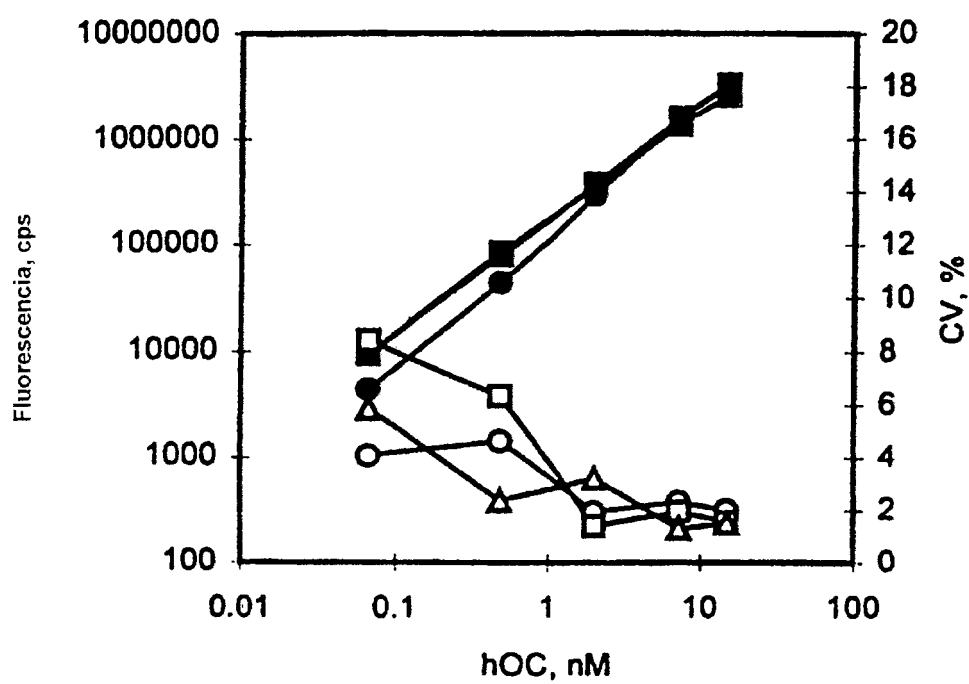


FIG. 2

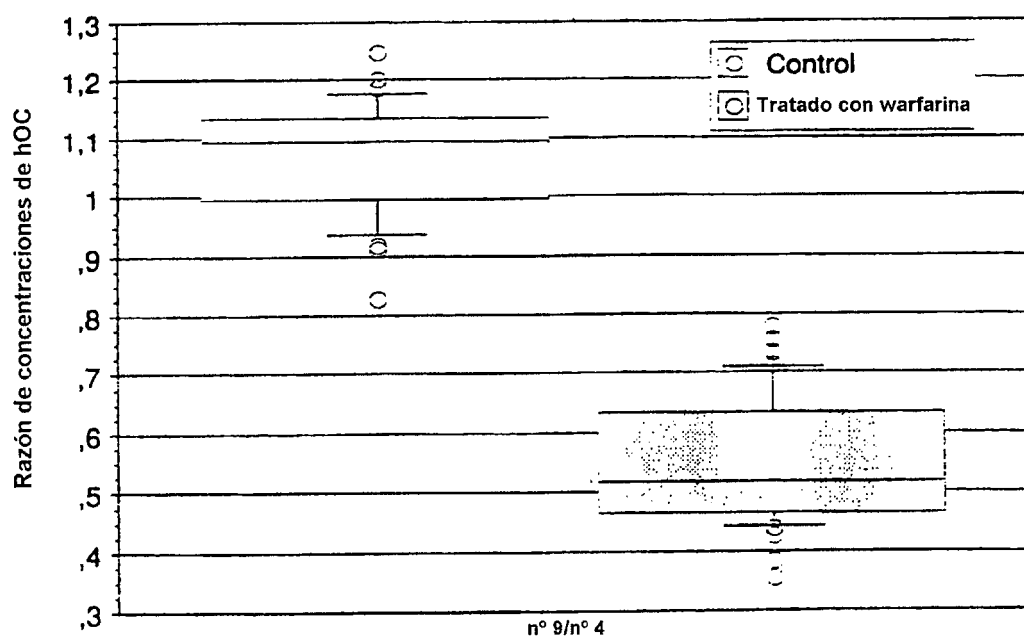


FIG. 3