



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 853**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06725094 .4**

96 Fecha de presentación : **16.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1863928**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **Uso de clasificadores de actividad génica para la clasificación *in vitro* de perfiles de expresión génica de pacientes con fallo multiorgánico infeccioso/no infeccioso.**

30 Prioridad: **21.03.2005 DE 10 2005 013 013**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2011

73 Titular/es: **SIRS-LAB GmbH**
Winzerlaer Strasse 2A
07745 Jena, DE

72 Inventor/es: **Russwurm, Stefan y**
Reinhart, Konrad

74 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

ES 2 357 853 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de clasificadores de actividad génica para la clasificación *in vitro* de perfiles de expresión génica de pacientes con fallo multiorgánico infeccioso/no infeccioso.

5 La presente invención se refiere al uso de marcadores de actividad génica para la clasificación de pacientes que están enfermos de un fallo multiorgánico infeccioso o no infeccioso.

La invención se refiere además al uso de estos clasificadores de actividad génica como valiosos parámetros guardados en dispositivos que se usan para el diagnóstico *in vitro* de pacientes con fallo multiorgánico infeccioso o no infeccioso. Además, la invención se refiere a un dispositivo para el diagnóstico *in vitro* de pacientes que están enfermos de un fallo multiorgánico infeccioso o no infeccioso.

1.0 Además, la invención se refiere al uso de los marcadores/clasificadores de actividad génica para la clasificación de perfiles de expresión génica de pacientes para evaluar el efecto terapéutico de principios activos contra fallo multiorgánico infeccioso o no infeccioso.

1.5 A pesar de los avances en el entendimiento patofisiológico y el tratamiento de apoyo, el síndrome del fallo multiorgánico (SFMO) o el fallo multiorgánico (FMO) representa en pacientes que requieren cuidados intensivos la causa más frecuente de muerte y mundialmente sigue aumentando. Las consecuencias de este desarrollo no sólo son considerables para los pacientes individuales, sino que tienen enormes repercusiones sobre los costes de la sanidad y el avance médico en muchos campos de la medicina.

2.0 Como fallo multiorgánico se designa el fallo que se produce al mismo tiempo o en un corto periodo de tiempo de dos o más sistemas de órganos vitales. El síndrome del fallo multiorgánico (SFMO) precede al FMO como fallo orgánico inicial [1]. Actualmente se habla de fallo multiorgánico cuando dos o más órganos presentan al mismo tiempo o sucesivamente fallos, descartándose un fallo orgánico crónicamente persistente [2]. El pronóstico del FMO depende estrechamente del número de sistemas orgánicos implicados. La mortalidad asciende en el fallo de un órgano dentro de las primeras 24 horas al 22%, después de 7 días al 41%. En el caso de fallo de tres sistemas de órganos la mortalidad asciende en el primer día al 80% y después de 4 días al 100% [3].

2.5 Para la puntuación clínica del grado de gravedad de SFMO e FMO se usa regularmente la puntuación de fallo multiorgánico (Multiple-Organ-Failure-Score) (puntuación de FMO, de MOF-Score) de GORIS y col. [4] o alternativamente también la puntuación de la evaluación de fallo multiorgánico relacionada con sepsis (EIMRS) (Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) Score) [5]. La puntuación de FMO permite una clasificación rápida y clínicamente sencilla de la función de los órganos en tres grados. Una puntuación de FMO > 4 designa regularmente en la bibliografía clínica FMO [6]. La puntuación de IMRS es un sistema de puntos que valora la rápida evaluación clínica de la función respectivamente en cuatro grados de gravedad, los siguientes sistemas de órganos: respiración (pulmones), coagulación, hígado, aparato circulatorio, sistema nervioso central y riñón.

3.0 El FMO transcurre clínicamente en tres fases [7]

3.5 1. Órgano de choque: El mecanismo patofisiológico desencadenante es un déficit de perfusión de distinta génesis. Este acontecimiento se produce en el plazo de horas y todavía no deja daños permanentes.

2. Disfunción orgánica: Un déficit de perfusión persistente en el plazo de los siguientes días conduce a la formación de un SRIS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, de Systemic Inflammatory Response Syndrome, clasificado según [8]) con edemas locales y lesiones celulares. Esta fase se designa síndrome de fallo multiorgánico (SFMO).

4.0 3. Fallo orgánico: El déficit de perfusión persistente conduce a estasis en el área visceral, por lo que se produce superinfección y translocación de las endotoxinas del intestino. Esto conduce a una potenciación de los síntomas clínicos y al cuadro completo de sepsis. De la disfunción orgánica resulta un fallo orgánico.

4.5 El SFMO y el FMO son cuadros clínicos con una complicada patofisiología. Hasta hoy en día sólo se han entendido insuficientemente las exactas causas moleculares de la aparición y la complejidad de la respuesta huésped inmunológica-inflamatoria en infección grave y traumatismo que puede conducir al desencadenamiento de un SRIS y a las correspondientes repercusiones cardiocirculatorias [9].

5.0 El SFMO y el FMO pueden ser de génesis tanto infecciosa como no infecciosa. El SFMO y el FMO aparecen regularmente como complicación clínicamente importante en pacientes con sepsis, después de choque traumático, en pacientes después de operaciones utilizando el sistema de circulación extracorporeal, después de trasplantes de órganos, y otros (Figura 1). Un importante patomecanismo para la aparición del SFMO y el FMO es el desarrollo de un síndrome inflamatorio sistémico (SRIS, [8]). Los procesos patofisiológicos iniciados en el marco de un SRIS no implican sólo todos los componentes del sistema inmunitario, sino que perjudican al aparato cardiocirculatorio en todos los niveles y no sólo se limitan a depresión miocárdica y vasodilatación. Los cambios cardiocirculatorios, sobre todo en el plano de la microcirculación, forman la distancia final común y producen una hipoxia de tejidos que se considera un cofactor importante en la patogénesis del fallo multiorgánico.

La Figura 1 describe a modo de ejemplo los mecanismos más importantes desde el punto de vista actual de la aparición del SFMO y el FMO [10]: un sistema inmunitario hiperactivo parece que desempeña una función central en la aparición del fallo multiorgánico. A este respecto, el endotelio asume una función clave central mediante la secreción de citocinas mediante la mediación de la adhesión de leucocitos. En las células endoteliales se activan cascadas de transducción de señales que por último lugar conducen a la expresión y a la activación de factores de transcripción.

El conocimiento todavía incompleto de los procesos en la fase temprana del SFMO y el FMO es el motivo por el que hasta hoy en día no existe ningún diagnóstico sensible/específico que pueda discriminar entre causas infecciosas y no infecciosas. Los novedosos biomarcadores y diagnósticos, a partir de ahora también en el plano de la expresión génica, pueden proporcionar informaciones diagnósticas esenciales para el reconocimiento temprano de fallo multiorgánico, así como para diferenciar entre causas infecciosas y no infecciosas, de un SFMO y un FMO, y además representan una contribución importante para la aclaración de los mecanismos patofisiológicos de inflamaciones sistémicas.

Los síntomas tempranos frecuentemente usados clínicamente como fiebre, leucocitosis, taquicardia y taquipnea son completamente inespecíficos en el diagnóstico de un SFMO o un FMO, así como en la diferenciación entre causas infecciosas y no infecciosas de un SFMO y un FMO. Los parámetros que registran precozmente los trastornos de la microcirculación como cambios de pH de la mucosa intestinal [11] y el nivel de lactato en el lecho capilar [12,13], la aparición de un fallo respiratorio cuya causa no se encuentra en los pulmones [2], la subida de leucocitos-elastasa [14,15], la altura del nivel de neopterin [16], la activación de leucocitos polimorfonucleares y la altura del nivel de IL-6 [17] son adecuados con limitaciones como parámetros tempranos para la aparición tardía de SFMO e FMO, pero pueden no contribuir a la diferenciación entre causas infecciosas y no infecciosas de un SFMO y un FMO. Por tanto, existe una necesidad urgente de un nuevo procedimiento diagnóstico que mejore la capacidad del experto para diferenciar precozmente SFMO o FMO no infeccioso de infeccioso y para obtener información de la respuesta a tratamientos específicos.

Pero precisamente la diferenciación entre causas infecciosas y no infecciosas de un SFMO y una FMO es de suma importancia médica ya que mediante una diferenciación tal pueden utilizarse más específicamente, por ejemplo, antibióticos, lo que, además de evitar efectos secundarios debido a la utilización inespecífica de antibióticos, también contribuye a un considerable ahorro de costes. Igualmente, en el caso de presencia de un SFMO o un FMO no infeccioso pueden evitarse medidas diagnósticas muy estresantes para los pacientes, así como que requieren mucho tiempo y personal (por ejemplo, transporte al CT/MRI), para la identificación del sitio de infección respectivo, la realización de amplios procedimientos microbiológicos (por ejemplo, la investigación de cultivos de sangre que también está asociada a la extracción de grandes cantidades de sangre), pero también el intercambio muy arriesgado de todos los materiales de plástico conectados al paciente como catéter venoso, etc. Por el contrario, la rápida identificación de causas infecciosas de un SFMO o un FMO puede garantizar el comienzo inmediato de tales medidas y, por tanto, la reducción de la mortalidad.

Los avances tecnológicos, especialmente el desarrollo de la tecnología de micromatrices, ponen al experto ahora en situación de comparar al mismo tiempo 10000 o más genes y sus productos génicos. La aplicación de tales tecnologías de micromatrices puede facilitar información sobre el estado de la salud, los mecanismos de regulación, interacciones bioquímicas y redes de transmisión de señales. La mejora del conocimiento sobre cómo reacciona un organismo a infecciones facilitará el desarrollo de modalidades de reconocimiento, diagnóstico y tratamiento para enfermedades infecciosas.

Las micromatrices proceden de "transferencia Southern" [19] que representa la primera manera de proceder para inmovilizar moléculas de ADN de un modo y manera espacialmente accesible sobre una matriz fija. Las primeras micromatrices estaban constituidas por fragmentos de ADN, frecuentemente con secuencia desconocida, y se aplicaron en forma de puntos sobre una matriz porosa (normalmente nailon). Rutinariamente se usaron ADNc, ADN genómico o bibliotecas de plásmidos, y el material hibridado se marcó con un grupo radiactivo [20-22].

Hoy en día, el uso de vidrio como sustrato y la fluorescencia para la detección, junto con el desarrollo de nuevas tecnologías para la síntesis y para la aplicación de ácidos nucleicos en densidades muy altas, permite miniaturizar matrices de ácidos nucleicos con al mismo tiempo aumento del rendimiento experimental y del contenido de información [23-25].

Una razón para la aplicabilidad de la tecnología de micromatrices fue obtenida inicialmente por investigaciones clínicas en el campo de la investigación del cáncer. Aquí, los perfiles de expresión han mostrado su utilidad en la identificación de actividades de genes individuales o grupos de genes que guardan relación con determinados fenotipos clínicos [26]. Mediante el análisis de muchas muestras que procedían de individuos con o sin leucemia aguda o linfomas de linfocitos B difusos se encontraron marcadores de expresión génica (ARN) y a continuación se aplicaron para la clasificación clínicamente relevante de estos tipos de cáncer [26,27]. Golub y col. han descubierto que no pueden hacerse pronósticos fiables por un gen individual cualquiera, pero que los pronósticos que se basan en el cambio de la transcripción de 53 genes (seleccionados de más de 6000 genes que estaban presentes en las matrices) son muy exactos [26].

Por el documento WO 03/002763 se sabe que la medición de la expresión génica mediante micromatrices

puede usarse en principio para el diagnóstico de sepsis y estados similares a sepsis.

La aplicabilidad fundamental de perfiles de expresión génica que pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la técnica de micromatrices para el diagnóstico de SRIS, inflamaciones inflamatorias generalizadas, sepsis y sepsis más grave se describe en las solicitudes de patente alemanas de los solicitantes de la presente invención DE 103 40 395.7, DE 103 36 511.7, DE 103 150 31.5, así como DE 10 2004 009 952.9.

De Feezor y col. [28] se sabe que las actividades génicas de pacientes que desarrollaron un SRIS con síndrome de fallo multiorgánico (SFMO) ("Multiorgan Dysfunction Syndrome") debido a su tratamiento quirúrgico se diferencian en comparación con pacientes que bajo las mismas condiciones quirúrgicas desarrollaron un SRIS sin SFMO. Sin embargo, estas investigaciones no facilitan información sobre la diferenciación de FMO no infecciosa en comparación con FMO infeccioso, ya que en los pacientes no se detectó ninguna infección.

Para la clasificación de perfiles de expresión génica ya se han descrito varios procedimientos y su aplicación para datos de expresión génica como, por ejemplo, análisis de discriminación lineal y cuadrática, predictores de covariante compuesta ("Compound Covariant Predictor"), clasificación del vecino más cercano ("Nearest Neighbor Classification"), árboles de clasificación ("Classification trees") o máquinas de vectores de soporte ("Support Vector Machines") [26, 29, 30, 31, 32]. Una visión general sobre la aplicación de procedimientos de clasificación para el análisis de datos de expresión génica se muestra en [33].

El objetivo de los procedimientos de clasificación es el desarrollo de clasificadores multivariantes que hagan posible una predicción sobre la pertenencia de un nuevo conjunto de datos a una clase. Así pueden clasificarse pacientes en pacientes que responden o que no responden, por ejemplo, mediante clasificadores referentes a su reacción a un tratamiento especial.

El desarrollo de clasificadores transcurre fundamentalmente en tres etapas: 1. La selección de características estadísticamente relevantes de un gran conjunto de datos. Para análisis de la expresión génica se eligen inicialmente mediante pruebas monofactoriales entre varias clases los genes estadísticamente relevantes basándose en su patrón de expresión como características. 2. La determinación de los clasificadores con ayuda de distintos procedimientos para la clasificación pone a disposición en su final un conjunto de entrenamiento de clasificadores. 3. La validación de este conjunto de entrenamiento mediante nuevos conjuntos de pruebas no clasificados de perfiles de expresión génica y la optimización del conjunto de entrenamiento.

En el documento WO 2004/108957 se describen en general la clasificación de biomarcadores (ácidos nucleicos) y su uso para el diagnóstico de SRIS o sepsis. No se describe una clasificación y/o uso de los biomarcadores para el diagnóstico de fallo multiorgánico infeccioso o no infeccioso.

En la solicitud de patente alemana no publicada DE 102004 049897 se muestra por primera vez marcadores de actividad génica para la diferenciación entre fallo multiorgánico infeccioso y no infeccioso. Allí se describe el uso de 1297 genes distintos para el diagnóstico *in vitro* de pacientes que están enfermos de un fallo multiorgánico infeccioso o no infeccioso.

La presente invención parte del estado de la técnica mostrado en el documento DE 102004049897.041 en el que mediante investigaciones específicas se determinó el perfil de expresión génica de muestras de pacientes cuyas actividades génicas son adecuadas como clasificadores para el diagnóstico *in vitro* para la diferenciación de fallo multiorgánico infeccioso y no infeccioso.

El punto de partida para la invención dada a conocer en la presente solicitud de patente es el conocimiento de que mediante clasificadores de actividad génica pueden agruparse los perfiles de expresión génica de pacientes con FMO no infeccioso o con FMO infeccioso. El uso de estos clasificadores no es posible con los parámetros clínicos usados hasta la fecha para el diagnóstico, pero son muy importantes para el inicio de una terapia especializada que requiere cuidados intensivos.

Por tanto, el objetivo de la presente invención se basa en diferenciar entre pacientes no infectados sin fallo multiorgánico, un fallo multiorgánico no infeccioso y un fallo multiorgánico infeccioso mediante el uso de clasificadores de actividad génica.

El objetivo de la invención se alcanza mediante marcadores de actividad génica según la reivindicación 1, un procedimiento para la clasificación de pacientes según la reivindicación 6, una micromatriz según la reivindicación 9 y un dispositivo según la reivindicación 10.

A continuación, el término "control por ITS" se usa para los pacientes que se trataron con cuidados intensivos en los que sin embargo no pudo detectarse infección y no se diagnosticó fallo multiorgánico.

La presente invención se refiere especialmente al uso de clasificadores de actividad génica mediante los cuales los perfiles de expresión génica obtenidos *in vitro* de una muestra de paciente se clasifican en fallo multiorgánico no infeccioso e infeccioso.

Además, usando los clasificadores, la presente invención sirve para la evaluación del curso durante la terapia de pacientes que están enfermos de causas no infecciosas e infecciosas de un fallo multiorgánico.

Los clasificadores de actividad génica según la invención son además útiles como criterios de inclusión o exclusión de pacientes que están enfermos de causas no infecciosas o infecciosas de un fallo multiorgánico en estudios clínicos de las fases 2-4.

Una forma de realización preferida de la invención se refiere a poner a disposición clasificadores de actividad génica para el procesamiento electrónico, así como para la preparación de software para la descripción del pronóstico individual de un paciente, para fines de diagnóstico y/o sistemas de gestión de datos de pacientes. Los clasificadores de actividad génica se usan *in vitro* para esto como base para la evaluación automática de los perfiles de expresión génica que van a investigarse en dispositivos diagnósticos. Los clasificadores de expresión génica se guardan a este respecto como valiosos parámetros en un software, en un circuito de conmutación integrado, una EPROM u otras posibilidades técnicas conocidas para el experto para el almacenamiento de parámetros valiosos.

Otra forma de realización preferida de la invención consiste en un dispositivo que usa los clasificadores de actividad génica guardados como parámetros valiosos para hacer posible un diagnóstico *in vitro* de pacientes con fallo multiorgánico no infeccioso e infeccioso. Además de los clasificadores de actividad génica guardados como parámetros valiosos, un dispositivo tal contiene la posibilidad de comparar perfiles de expresión génica no clasificados de muestras de pacientes con los clasificadores de actividad génica guardados y especificar el resultado resultante como visualización técnica. La comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el procesamiento electrónico de los parámetros valiosos de los clasificadores de actividad génica transformados en señales electrónicas con las señales electrónicas que se obtuvieron de los perfiles de expresión génica que iban a investigarse. El resultado resultante de esta comparación consiste en la clasificación del perfil de expresión génica que va a investigarse en una de las clases fallo multiorgánico no infeccioso o fallo multiorgánico infeccioso. Como visualización técnica se utilizan visualizaciones analógicas y/o digitales como, por ejemplo, sistemas de puntuación (similares a la puntuación APACHE o EIMRS ya usada en el diagnóstico *in vitro*) o en geles de sílice, señales acústicas u otros procedimientos conocidos para el experto.

En una forma de realización preferida este dispositivo también hace posible además la creación de perfiles de expresión génica para la comparación con los clasificadores de actividad génica guardados. Para esto, estos dispositivos están constituidos por un módulo para la preparación de muestras de la muestra de paciente obtenida *in vitro*, un módulo para la hibridación de la muestra de paciente con sondas de actividad génica que se derivan de los clasificadores de actividad génica, un módulo para la lectura de las señales de hibridación, otro módulo para el análisis de imágenes de las señales de hibridación leídas, un módulo que hace posible la comparación automática con el clasificador de actividad génica guardado, así como un módulo que hace posible la visualización de la comparación resultante. Para el experto es evidente que dependiendo del grado de automatización del dispositivo no todos los módulos deben combinarse en el dispositivo. Ejemplos de dispositivos que hoy en día ya hacen posible una creación automática/semiautomática de perfiles de expresión génica son el Light Cycler de la empresa Roche, el Smart Cycler de la empresa Cepheid o el AP-System de la empresa Clondiag Chip Technologies.

Además, para el experto es evidente que, además del procedimiento descrito en esta solicitud de patente para la creación de perfiles de expresión génica mediante tecnología de micromatrices, también pueden usarse todos los otros procedimientos para análisis de expresión génica diferencial.

Los clasificadores de actividad génica según la invención también pueden usarse para la preparación de sistemas expertos informáticos y/o para la modelización informática de rutas celulares de transmisión de señales.

Como clasificadores de actividad génica según la presente invención se usan genes y/o fragmentos génicos que se seleccionan del grupo constituido por SEQ ID 1.1 a SEQ ID 1.9, así como fragmentos génicos de los mismos con por lo menos 5-2000, preferiblemente 20-200, más preferiblemente 20-80 nucleótidos.

Estas secuencias con SEQ ID 1.1 a SEQ ID 1.9 están comprendidas por el alcance de la presente invención y se dan a conocer en particular en el protocolo de secuencias que comprende 9 secuencias que, por tanto, es constituyente de la descripción de la presente invención. Por tanto, el protocolo de secuencias también es constituyente de la revelación de la invención. Este protocolo de secuencias contiene además una asignación de las secuencias individuales con SEQ ID 1.1 a SEQ ID 1.9 a su n° de registro de GenBank (acceso a Internet por <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para esto también pueden usarse análogos sintéticos hibridables de las sondas enumeradas.

También es posible el uso de mutantes de inserción, delección o de intercambio de nucleótidos de las secuencias con SEQ ID 1.1 a SEQ ID 1.9 para los fines de la presente invención, siempre y cuando estos mutantes no modifiquen esencialmente el comportamiento de hibridación de las secuencias para los fines de la presente invención. Si en la presente invención se hace referencia a marcadores de actividad génica, entonces están comprendidas tales mutaciones.

En otra forma de realización, los clasificadores de actividad génica con SEQ ID 1.1 a SEQ ID 1.9 para la

clasificación de perfiles de expresión génica de muestras de paciente con fallo multiorgánico no infeccioso o infeccioso según la Tabla 1 se asocian a reglas de selección lógicas.

Tabla 1: Reglas de selección para la clasificación de control de ITS, FMO no infeccioso o infeccioso

Clase	Control de ITS	Fallo multiorgánico no infeccioso	Fallo multiorgánico infeccioso
Clasificadores	(SEQ ID I.1) ↑	(SEQ ID I.3) ↑	(SEQ ID I.5) ↑
	y	y	y
	(SEQ ID I.3) ↓	(SEQ ID I.6) ↓	(SEQ ID I.7) ↓
	o	o	o
	(SEQ ID I.2) ↑	(SEQ ID I.4) ↑	(SEQ ID I.8) ↑
	y	y	y
	(SEQ ID I.4) ↓	(SEQ ID I.5) ↓	(SEQ ID I.9) ↓

5 ↑ actividad génica expresada en exceso, ↓ actividad génica expresada en defecto

Otra forma de realización de la invención se caracteriza porque los genes o fragmentos génicos enumerados en la reivindicación 1 y/o de sus secuencias derivadas de ARN se sustituyen por análogos sintéticos, aptámeros, así como ácidos nucleicos de péptidos.

10 Otra forma de realización de la invención se caracteriza porque la muestra se selecciona de: fluidos corporales, especialmente sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, líquido ascítico, líquido seminal, saliva, líquido de punción; contenido celular o una mezcla de los mismos.

Otra forma de realización de la invención se caracteriza porque las muestras celulares se someten dado el caso a un tratamiento lítico para liberar sus contenidos celulares.

15 Para el experto es evidente que las características individuales de la invención expuestas en las reivindicaciones pueden combinarse discrecionalmente entre sí sin limitación.

Como clasificadores de actividad génica en el sentido de la invención se entiende todas las secuencias de ADN derivadas, secuencias parciales y análogos sintéticos (por ejemplo, ácidos nucleicos de péptidos, PNA). La descripción de la invención referente a la determinación de la expresión génica en el nivel del ARN no representa ninguna limitación, sino sólo una aplicación a modo de ejemplo.

20 La descripción de la invención referente a sangre sólo representa una aplicación a modo de ejemplo de la invención. Como líquidos biológicos en el sentido de la invención se entiende todos los fluidos corporales del ser humano.

Otras ventajas y características de la presente invención resultan de la descripción de un ejemplo de realización, así como mediante el dibujo.

25 La Figura 1 muestra el desarrollo patológico de fallo multiorgánico a partir de diferentes estados médicos.

Ejemplo de realización

Investigación para la creación y la validación de clasificadores de actividad génica para la clasificación de perfiles de expresión génica de muestras de pacientes en una de las clases: control de ITS, fallo multiorgánico no infeccioso o fallo multiorgánico infeccioso.

30 Medición de la expresión génica diferencial como base para el conjunto de entrenamiento:

Para la medición de la expresión génica diferencial para la diferenciación entre causas no infecciosas e infecciosas de un fallo multiorgánico se realizaron investigaciones de muestras de sangre completa de 57 pacientes en total que se trataron en unidades de cuidados intensivos. Los datos de expresión génica totales formaron la base para la creación del conjunto de entrenamiento de los clasificadores de actividad génica.

35 Se extrajeron muestras de sangre completa de 31 pacientes que en el marco de su cuidado intensivo desarrollaron un FMO infeccioso [clasificada según 8].

Además, se extrajeron muestras de sangre completa de 26 pacientes que en el marco de su cuidado intensivo desarrollaron un FMO no infeccioso [clasificada según 8].

Además, se extrajeron muestras de sangre completa de 18 pacientes que en el transcurso se trataron con cuidados intensivos (a continuación controles de ITS).

5 Como muestras de referencia sirvieron los ARN totales de líneas celulares SIG-M5.

En la Tabla 2 se representan características seleccionadas de tres grupos de pacientes. A este respecto se facilitan datos sobre la edad, el sexo y la puntuación de EIMRS como medida de la función del sistema orgánico. Igualmente se especifican los niveles de proteína en plasma de procalcitonina (PCT) y CRP, así como el número de leucocitos de los pacientes.

1.0 Todas las muestras de pacientes se cohibridaron en una micromatriz con la muestra de referencia, respectivamente.

Tabla 2: Datos de los grupos de pacientes

	Controles de ITS	FMO no infeccioso	FMO infeccioso
Número de pacientes	18	26	31
Sexo M/F	16/2	15/11	17/14
Edad [años]	65 (15)	69 (10)	60 (17)
Puntuación APACHE II [puntos]	10* (2,8)	14,9 (3,4)	14 (10)
Puntuación de EIMRS [puntos]	3,4* (1,7)	8* (3)	10* (3)
Número de disfunciones orgánicas	-	3 (1)	3 (1)
PCT [ng/ml]	0,56* (0,8)	3,8 (6,7)	3,1 (7,7)
CRP [µg/l]	68,5* (27,5)	80,2* (90,2)	188* (168)
WBC [no/l]	8.088* (3.554,2)	12.300 (6.925)	13.200 (8.150)

*p < 0,05

1.5 Descripción experimental:

Después de extraer la sangre completa, el ARN total de las muestras se aisló aplicando el kit PAXGene Blood RNA según las especificaciones del fabricante (Qiagen).

Cultivo de células.

2.0 Para el cultivo de células (muestras de control) se utilizaron 19 criocultivos celulares (SIGM5) (congelados en nitrógeno líquido). Las células se inocularon respectivamente con 2 ml de medio Iscove (Biochrom AG) complementado con suero bovino fetal al 20% (SBF). Los cultivos celulares se incubaron a continuación durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ en placas de 12 pocillos. Después se dividió el contenido de 18 pocillos en 2 partes con respectivamente el mismo volumen de manera que finalmente estuvieran a disposición 3 placas de la misma forma (en total 36 pocillos). El cultivo continuó a continuación durante 24 horas bajo las mismas condiciones. A continuación se reunieron los cultivos resultantes de 11 pocillos de cada placa y se centrifugaron (1000 x g, 5 min, temperatura ambiente). El sobrenadante se desechó y el sedimento celular se disolvió en 40 ml del medio anteriormente mencionado. Estas células disueltas en 40 ml se repartieron a partes iguales en dos matraces de 250 ml y se incubaron de nuevo después de 48 horas de incubación y adición de 5 ml del medio anteriormente mencionado. 80 µl de los 2 ml restantes de las dos placas restantes se añadieron a pocillos vacíos de las mismas placas que ya se habían preparado previamente con 1 ml del medio anteriormente mencionado. Después de 48 horas de incubación sólo se procesó una de las placas de 12 pocillos del siguiente modo: de cada pocillo se extrajeron 500 µl y se reunieron. Los 6 ml resultantes de esto se añadieron a un matraz de 250 ml que contenía aproximadamente 10 ml de medio fresco. Esta mezcla se centrifugó 5 minutos a 1000 x g a temperatura ambiente y se disolvió en 10 ml del medio anteriormente mencionado. El posterior recuento de células produjo el siguiente resultado: 1,5 x 10⁷ células por ml, 10 ml de volumen total, número total de células: 1,5 x 10⁸. Como el número de células no era todavía suficiente se añadieron 2,5 ml de la suspensión de células anteriormente mencionada en 30 ml del medio anteriormente mencionado en un matraz de 250 ml (75 cm²) (en total 4 matraces). Después de 72 horas de tiempo de incubación, a los matraces se les añadieron respectivamente 20 ml de medio fresco. Después de la siguiente incubación de 24 horas se realizó el recuento de células como se ha descrito anteriormente,

que dio un número de células total de $3,8 \times 10^8$ células. Para alcanzar el número de células deseado de 2×10^6 células, las células se resuspendieron en 47,5 ml del medio anteriormente mencionado en 4 matraces. Después de un tiempo de incubación de 24 horas, las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con tampón fosfato sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Biochrom AG).

- 5 El aislamiento del ARN total se realiza mediante el kit NucleoSpin RNA L (Machery&Nagel) correspondientemente a las indicaciones del fabricante. El procedimiento anteriormente descrito se repitió hasta que se alcanzó el número de células necesario. Esto fue necesario para alcanzar la cantidad necesaria de 6 mg de ARN total, lo que se corresponde con aproximadamente una eficiencia de 600 μg de ARN por 10^8 células.

Transcripción inversa/marcado/hibridación

- 10 Después de extraer la sangre completa, el ARN total de las muestras se aisló usando el kit PAXGene Blood RNA (PreAnalytiX) según las especificaciones del fabricante y se comprobó para su calidad. De cada muestra se tomaron alícuotas de 10 μg de ARN total y junto con 10 μg de ARN total de células SIGM5 como ARN de referencia se transcribieron en ADN complementario (ADNc) con la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) y el ARN se eliminó a continuación de la mezcla mediante hidrólisis alcalina. En la mezcla de reacción se substituyó una parte del dTTP por aminoalil-dUTP (AA-dUTP) para hacer posible posteriormente el acoplamiento del colorante de fluorescencia al ADNc.
- 15

- Después de la purificación de la mezcla de reacción, los ADNc de las muestras y los controles se marcaron covalentemente con el colorante de fluorescencia Alexa 647 y Alexa 555 y se hibridaron sobre una micromatriz de la empresa SRIS-Lab. Sobre la micromatriz usada se encuentran 5308 polinucleótidos inmovilizados con una longitud de 55 - 70 pares de bases que representan respectivamente un gen humano y puntos de control para el aseguramiento de la calidad. Una micromatriz está dividida en 28 submatrices con una rejilla de 15x15 puntos.
- 20

- La hibridación y el posterior lavado o secado se realizó en la estación de hibridación HS 400 (Tecan) según las indicaciones del fabricante durante 10,5 horas a 42°C. La disolución de hibridación usada está constituida por las muestras de ADNc marcadas respectivas, 3,5x SSC (1x SSC contiene cloruro sódico 150 mM y citrato sódico 15 mM), dodecilsulfato de sodio al 0,3% (v/v), formamida al 25% (v/v) y 0,8 $\mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ de cada uno de cot-1 DNA, ARNt de levadura y ARN de poli-A. El posterior lavado de las micromatrices se realizó con el siguiente programa a temperatura ambiente: cada 90 segundos lavado con tampón de lavado 1 (2x SSC, dodecilsulfato de sodio al 0,03%), con tampón de lavado 2 (1x SSC) y por último con tampón de lavado 3 (0,2x SSC). Después, las micromatrices se secaron bajo una corriente de nitrógeno con una presión de 2,5 bar (0,25 MPa) a 30°C durante 150 segundos.
- 25

- Después de la hibridación, las señales de hibridación de las micromatrices se leyeron con un escáner GenePix 4000B (Axon) y las relaciones de expresión de los genes diferencialmente expresados se determinaron con el software GenePix Pro 4.0 (Axon).
- 30

Evaluación:

- Para la evaluación, la intensidad media de un punto se determinó como la mediana del valor de los píxeles de puntos correspondientes.
- 35

Corrección de fallos sistemáticos:

La corrección de fallos sistemáticos se realizó según el planteamiento de Huber y col. [34]. A este respecto, el sesgo aditivo y multiplicativo dentro de una micromatriz se estimó a partir del 70% de las muestras de genes presentes. Para todos los otros cálculos las señales se transformaron mediante arco seno hiperbólico.

- 40 Para los análisis se calcularon las relaciones relativas normalizadas y transformadas de las señales de las muestras de pacientes frente a los controles generales. Es decir, para el gen j del paciente n el cálculo dio el valor $G_{j,n} = \text{arcsenh}(\text{Scy5}(j,n)) - \text{arcsenh}(\text{Scy3}(j,n))$ en la que $[\text{Scy3}(j,n), \text{Scy5}(j,n)]$ designa el par de señales correspondiente. Si para un paciente no pudo valorarse un punto (por ejemplo, mancha sobre la imagen escaneada), entonces el valor correspondiente se designó como inexistente ('missing value').

- 45 Comparación estadística:

Para la comparación se usó la prueba de Student de muestras al azar para datos emparejados por gen. Ambas muestras al azar contuvieron los valores de los grupos de pacientes FMO no infeccioso o FMO infeccioso. Para la selección de genes diferencialmente expresados se valoró el valor de p correspondiente. Para el grupo de los genes seleccionados el valor de p correspondiente fue inferior a 0,05.

Tabla 3: Actividades génicas significativamente aumentadas en muestras de pacientes con FMO infeccioso en comparación con las actividades génicas de pacientes con FMO no infeccioso

Número de registro de GenBank	Valor de p	Valor de expresión medio normalizado y transformado		Desviación estándar		ID de secuencia
		Grupo de pacientes con FMO no infeccioso	Grupo de pacientes con FMO infeccioso	Grupo de pacientes con FMO no infeccioso	Grupo de pacientes con FMO infeccioso	
N32857	0,00	-2,99	0,20	1,42	2,78	1
N32853	0,00	-0,85	1,60	2,15	2,89	2
N32495	0,00	-2,38	-0,56	1,37	0,40	3
AI701077	0,01	-0,33	1,46	0,17	3,08	4
M87790	0,00	1,18	2,93	1,13	1,24	5
AI559317	0,01	0,20	1,83	0,54	2,60	6
N34897	0,00	-2,60	-1,05	1,61	0,54	7
AA907084	0,02	0,53	1,94	0,49	2,58	8
N45223	0,00	-2,88	-1,54	1,24	0,57	9

Los números de registro de GenBank citados en la Tabla 3 (acceso a Internet por <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de las secuencias individuales están asignados en el protocolo de secuencias adjunto a esta solicitud en particular respectivamente a una ID de secuencia (SEQ ID 1 a SEQ ID 91).

5 Además, las secuencias se dan a conocer en su interior en particular.

Este protocolo de secuencias es constituyente de la descripción de la presente invención.

Adicionalmente, estas secuencias se dan a conocer en la solicitud de patente alemana nº DE 102004049897.0.

Creación de clasificadores de actividad génica (conjunto de entrenamiento)

1.0 A partir de todas las actividades génicas medidas se crearon mediante el software MediPred (empresa Biocontrol Jena GmbH) clasificadores de actividad génica y reguladores de selección que hacían posible una clasificación del patrón de expresión génica en las clases FMO infeccioso e FMO no infeccioso (Figura 2). A este respecto se determinaron gen por gen valores umbral para expresión alta y baja (en la Figura 3 se designa C_{\min} y C_{\max}) y se extrajeron genes con comportamiento de expresión génica típico y robusto por clase de pacientes.

1.5 Prueba de clasificadores de actividad génica en perfiles de expresión génica todavía no clasificados (conjunto de prueba)

Los clasificadores de actividad génica fijados se probaron mediante las reglas de selección definidas en un conjunto de prueba de en total 190 patrones de expresión génica todavía no clasificados de controles de ITS (56), pacientes con FMO no infeccioso (75) o pacientes con FMO infeccioso (59) y se validaron mediante datos clínicos.

2.0 Para esto se seleccionaron perfiles de expresión génica de pacientes que fueron clínicamente diagnosticados como controles de ITS o FMO no infeccioso o FMO infeccioso. Si en la posterior comparación con el conjunto de entrenamiento pudo establecerse que los patrones de expresión que iban a clasificarse eran el conjunto de entrenamiento dentro de los límites de expresión fijados mediante las reglas de selección de los clasificadores de actividad génica correspondientes (habiéndose aplicado al mismo tiempo las reglas de selección), entonces el patrón de expresión que iba a clasificarse se asignó a la clase correspondiente.

2.5 De la Tabla 4 es evidente la pertenencia del conjunto de prueba a las clases correspondientes. Por lo tanto, el 86% de los controles de ITS, el 80% de los pacientes con fallo multiorgánico no infeccioso, así como el 63% de los pacientes con fallo multiorgánico infeccioso pudieron clasificarse correctamente en la clase correspondiente.

Tabla 4: Proporción en porcentaje de 190 perfiles de expresión génica a clasificar en las clases control de ITS, FMO no infeccioso e FMO infeccioso

Grupos de pacientes		Controles de ITS	Fallo multiorgánico no infeccioso	Fallo multiorgánico infeccioso
Número de perfiles de expresión génica a clasificar		56	75 (varios días de 16 pacientes)	59 (varios días de 35 pacientes)
Pertenenencia a las clases [%]	Controles de ITS	86	4	14
	Fallo multiorgánico no infeccioso	13	80	16
	Fallo multiorgánico infeccioso	2	16	63

5 Por tanto, los clasificadores de actividad génica pueden aplicarse junto con las reglas de selección para la invención.

Referencias

1. Natanson C (1997) Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: A reassessment. Crit Care Med 25: 1095-1099
- 10 2. Geiger K (1995) Frühparameter für Multiorgandysfunktionssyndrom en Hartenauer U (ed.) Sepsis in der Frühphase München MMV Medizin Verlag 19-25
3. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmermann JE (1985) Prognosis in acute organ-system failure. Ann Surg 202: 658-693
4. Goris RI, Bockhorst TP, Nuytinck JKS (1995) Multiple organ failure. Arch Surg 120:1109-1115
- 15 5. Vincent JL, Moreno R, Takala J y col. (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine, Intensive Care Med. July 22(7):707-10.
6. Pfeiffer L, Ehrhardt N, Kretschmar R y col. (1996) Endotoxinämie und Multiorganversagen nach Polytrauma. Anaesthesiol Reanimat 21: 91-96
- 20 7. Schlag G, Redl H (1993) Organ in shock, early organ failure, late organ failure, in Schlag G and Redl H (eds.) Pathophysiology of shock, sepsis, and organ failure Berlin Heidelberg Springer-Verlag, 1-4
8. Bone RC, Balk RA, Cerra FB y col. (1992) The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee (1992) Definitions for Sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in Sepsis. Chest 101:1656-1662; y Crit Care Med 1992; 20: 864-874.
- 25 9. Levy MM, Fink M, Marshall JC y col. (2003) For the International Sepsis Definitions Conference: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. April; 31(4):1250-6
10. <http://chirinn.klinikum.uni-muenchen.de/forschung/for-01-14-04.html>, estado de octubre de 2004, modificado
11. Marik PE. (1993) Gastric intramucosal pH. A better predictor of multiorgan dysfunction syndrome and death than oxygen derived variables in patients with sepsis. CHEST 104: 225-229
- 30 12. Bernardin G, Pradier C, Tiger F y col. (1996) Blood pressure and arterial lactate level are early indicators of short-term survival in human septic shock. Intensive Care Med 22: 17-25;
13. Marecaux G, Pinsky MR, Dupont E y col. (1996) Blood lactate levels are better prognostic indicators than TNF and IL-6 levels in patients with septic shock. Intensive Care Med 22: 404-408
14. Duswald KH, Jochum M, Schramm W, Fritz H (1985) Released granulocytic elastase: an indicator of pathobiochemical alterations in septicemia after abdominal surgery. Surgery 98: 892-899
- 35 15. Nuytinck JKS, Goris RI, Redl H y col. (1986) Posttraumatic complications and inflammatory mediators. Arch Surg 121: 886-890

16. Nast-Kolb D, Jochum M, Waydla C y col. (1991) Die Wertigkeit biochemischer Faktoren beim Polytrauma. Hefte Unfallheilkunde 215: 215
17. Hack CE, de Groot ER, Felt-Bersma RJ y col. (1989): Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis" Blood 74: 1704-1710
- 5 18. Patel RT, Deen KI, Youngs D y col. (1994) Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. Br J Surg 81:1306-1308
19. Southern EM (1974) An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. Anal Biochem 62:317-318
- 1.0 20. Gillespie D, Spiegelman S (1965) A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. J Mol Biol 12:829-842
21. Lennon GG, Lehrach H (1991) Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. Trends Genet 7: 314-317
22. Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A (1979) Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. Nucl Acid Res 7:1541-1552
- 1.5 23. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 251:767-773
24. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP (1994) Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proc Natl Acad Sci USA 91:5022-5026
25. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 270:467-470
- 2.0 26. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P y col. (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 286:531-537
27. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE y col. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 403:503-51
- 2.5 28. Feezor RJ, Baker HV, Xiao W y col. (2004) Genomic and Proteomic Determinants of outcome in patients undergoing thoracoabdominal aortic aneurysm repair. Journal of Immunology 172 (11): 7103-7109
29. Rademacher md; mCsHANE Im; Simon R (2002) A paradigm for class prediction using gene expression profiles. J. Comput. Biol. 9:505-511
- 3.0 30. Li L, Darden TA, Weinberg CR, Levine AJ y col. (2001) Gene assesment and sample classification for gene expression data using a genetic algorithm/k-nearest neighbor method. Comb. Chem. High Throuput Screen. 4:727 7-39
31. Zhang H, Yu C-Y, Singer B y col. (2001) Recursive partitioning for tumor classification with gene expression microarray data. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 2001, 98:6730-6735
32. Furey TS, Cristianni N, Duffy N (2000) Support vector machine classification and validation of cancer tissue samples using microarray expression data. Bioinf. 16:906-914
- 3.5 33. Simon RM, Korn EL, McShane L y col. (2004) Design and analysis of DNA microarray investigations. Springer-Verlag, New York, ISBN 0-387-00135-2
34. Huber W, Heydebreck A, Suetmann H y col. (2003) Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data. Stat. Appl. In Gen. and Mol. Biol. vol. 2, tema 1, artículo 3.

Protocolo de secuencias

- 4.0 <110> SRIS-Lab GmbH
- <120> Procedimiento para la diferenciación entre causas no infecciosas e infecciosas de un fallo multiorgánico
- <130> 85/SL0528/PC
- <140> Número de la presente solicitud
- <141> 16 de marzo de 2006.
- 4.5 <160> 1297

<170> Patent Prepare 0.3.5
<210> 1
<211> 670
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (503)..(503)
<223> n es a, c, g o t.
10 <220>
<221> misc_feature
<222> (530)..(530)
<223> n es a, c, g o t.
<220>
15 <221> misc_feature
<222> (564)..(564)
<223> n es a, c, g o t.
<220>
<221> misc_feature
20 <222> (669)..(669)
<223> n es a, c, g o t.
<400> 1

ES 2 357 853 T3

gttattggac gaggtgtatt aaaataaaat caaaaataga aatattaggt atatacacia 60
 cagcataagt gaaacacatc atgtgataca gaagtttcca ttcaaagctt acaggagaaa 120
 aatttagtga acagaaccgc ttgaacctcc tgccaccgtg gcttattaga gccttgtagt 180
 cacttatggt ccttcataatc cttgggtata aatagtctca tacacatgct acacaattta 240
 gaaaagattg ctgaatcata aaaatagccc cgaatgtggc actttagctt tctagagtac 300
 aactaaaatt aatacttgat cttaacata atgttcaaat atttgaagca acaaaggaaa 360
 ctcttatggt ttagaaggcc ctataagggt cttcagagat tagaatccta gttcttccaa 420
 actacattgt caaaacaaat ctggatatag gaaattgtgg aaatggaaaa gctggactcc 480
 taaaaatatt coctctaaca cngagcagt ttctggaggc tcttctcccn ttctgggag 540
 gtccaggtga gcccggtgcc ttcngggtga gcagacaggg cagctgtggt gctcacgggc 600
 tcccctgctg gaagagagag agtgtgccgc cactcctatg ggatgtctag caggttgagc 660
 agggccaana 670
 <210> 2
 <211> 609
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (490)..(490)
 10 <223> n es a, c, g o t.
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (495)..(495)

<223> n es a, c, g o t.
<220>
<221> misc_feature
<222> (516)..(516)
5 <223> n es a, c, g o t.
<220>
<221> misc_feature
<222> (552) .. (552)
<223> n es a, c, g o t.
10 <220>
<221> misc_feature
<222> (564)..(564)
<223> n es a, c, g o t.
<220>
15 <221> misc_feature
<222> (589)..(589)
<223> n es a, c, g o t.
<400> 2

ES 2 357 853 T3

ggcaaggaat aacaaaataa tagaaactcc atatatatta gaaaaagatc tgtaagtttg 60

agccttatat attattacaa tgtggcaatc aagaggaaaa ctcaagacaa ctgtgcgctg 120

tgcttgcct gttttgttca aaccacgata attttaata aatagtaatg ttcaacattc 180

actgatgaca ttatctatca accacatcac acctggaaca cagtagataa taaatggcag 240

ctgttatacc ttcccttctg aaacaaaatc ctgtcatttc attctcattt taactttgtg 300

ttaagcttct acaatccata aaaatgataa aacaataaaa tggccaaca ttatctagtc 360

cagtcttatt ttacaaaac attgacttta aaagtcctg gagattttaa ttttactggt 420

ttaatctgtc ttccctacc ttgtttaaaa aaaaatagaa tcatgtgtca ttattgggtt 480

gagtaccgn tatcnggaat ccttgggaca gtggtnttgg attccaatat ggaatattgg 540

cttatattac cngtgagtat ccnatctgg acacgggaat cctaatagcnc gtggacatcc 600

cttgagtgt 609

<210> 3

<211> 599

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (495)..(495)

10 <223> n es a, c, g o t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (527)..(527)

<223> n es a, c, g o t.

15 <220>

<221> misc_feature
 <222> (539)..(539)
 <223> n e s a , c , g o t .
 <220>

5 <221> misc_feature
 <222> (598)..(598)
 <400> 3

tgcttattga tttttttaag tctgagggaa attacccaaa atgtgtcatt ccttaacatt 60
 taaaaatatg ttacataaaa atgagcaact gtgataacaa ataaaacttg gagagaaaaa 120
 agttggctat ttccttattc aaggagacag agctaccaga atacatcaag atagcgcaça 180
 aatTTTTTaa atccactgcc acttctgctg aaacaaaagt caactgataa gaaaattccc 240
 attcaaaaca atTTTaatTg tactgttaac tcttctcca tTTTtaatt tcatgaagtc 300
 ataatccaat ctgagttggt ctgttgggca ttagcagaca tagtcaactgg agaggagtga 360
 gatgatgtca gagcatgggg cacagtattt ataaatgtct cctttaagaa agtgtaagta 420
 gtatcaagtt cagctttcaa tgggtaagaa atccccata ccagttgtgt cagcaggaag 480
 gaggagctct tgaanggatg gagagatttg gatgggcccg tgatccnatt ggattggtna 540
 acctgcattt tccccgtaa caagccggtg tggaagtccg gttccaagg ctgccaatnt 599

<210> 4

10 <211> 436
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

ttttgagata gagtcttact gtgtcaccaa ggctgcaggg caatggcctg atcttgactc 60
 actgcaacct cagcctcccg agtagctggg actacaggca tgcgccacca caccagcta 120

ES 2 357 853 T3

cctttttttg atggttgttg atttctagta gagacagggg ttcgcatat tggccaggat 180
 ggactctaac tcttgacctc cagtgatcca cctgcctcgg cctcccaaag tgttgggatt 240
 acaggcatga gccaccacgc cccacctgac tcccagtctc ttattacca acctgcaatt 300
 ttcaaaacc cagtcggact gctaaccttt gacctcttgg atttccctcc ccgcactccc 360
 ctatctggat gaaggacca cctcaggttc ttgttgaagc tcagatcttg taccgctgtc 420
 ttcttgatct ctaccc 436

<210> 5

<211> 877

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

caagaggcag cgctctcggg acgtctccac catggcctgg gctctgctgc tcctcacctt 60
 cctcactcag gacacagggg cctgggcccga gtctgccttg actcagcctg cctccgtgtc 120
 tgggtctcct ggacagtcga tcaccatctc ctgcactgga accaacaatg atgttgggag 180
 ttataacctt gtctcctggt accagcagca cccaggcaaa gcccccaaaa tcatgattta 240
 tgaggtcagt aagcggccct caggggttcc taatcgcttc tctggctcca agtctggcaa 300
 cacggcctcc ctgacaatct ctgggctcca ggctgaggac gaggctgatt attactgctg 360

ES 2 357 853 T3

ctcatatgca ggtagttaca ctgtggtttt cggcggaggg accaaaactga ccgtcctagg 420

tcagcccaag gctgccccct cggtcactct gttccccgcc tcctctgagg agcttcaagc 480

caacaaggcc aactgggtgt gtctcataag tgacttctac ccgggagccg tgacagtggc 540

ctggaaggca gatagcagcc ccgtcaaggc gggagtggag accaccacac cctccaaaca 600

aagcaacaac aagtacgcg ccagcagcta tctgagcctg acgctgagc agtggaaagtc 660

ccacagaagc tacagctgcc aggtcacgca tgaagggagc accgtggaga agacagtggc 720

ccctacagaa tgttcatagg ttctaaacct tcaccccccc cacgggagac tagagctgca 780

ggatcccagg ggaggggtct ctctcccac cccaaggcat caagcccttc tccctgcact 840

caataaaccc tcaataaata ttctcattgt caatcac 877

<210> 6

<211> 371

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60

tcacccccca aaaaaaatta aaaattaata aaaaaagaa acacaccggc ctcccttttg 120

gggaaaaaaaa ggggccccca aaacccccaa agggggggga cctttgggaa aggcccccaa 180

ES 2 357 853 T3

agggtttgga aaaaagtttt gggtttgggc ccaatttggg tttaaaaaaa aaaccccctt 240

tcaaaaacca ataaaatttt aaccaggaa aacggggggg ggggccccg ggaaaaaacc 300

cttttttggg gggccctttt tttttttttt acccaggggc cccccaaaa aggggggggg 360

gggggggggg g 371

<210> 7

<211> 301

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (165)..(165)

<223> n es a, c, g o t.

10 <400> 7

taacatgtgg tgaagtttaa ttattcaata atggttccaa ttattaaaca tgactattgc 60

ataatgacat aattggctgt ggatgtgctt ttgtgtggcc acataaactc caggaaactt 120

tgtcttcatt agtttcatta gtcttcatga ggtcaggcct ggggnagctc gtttgactct 180

tcccaagtgt ggggtaggtg ttgatgcctt gagagtgcc gagtgacaca ggtcatgacc 240

cacgccaggg tgaagtgaga actctcaggg gtcacctctc cttgttccac atctgtcttt 300

t 301

<210> 8

<211> 587

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 357 853 T3

ttatgcttgc tttttattta gagatttttc ataggctgca gtttcacact gaataaattt 60

gtttctgtat ctacaccatg aacatacacg atgacagcaa gtatttattg aacaccacct 120

cataatatgt gctcgacca gctctcagtg ctctctgcaa gcctcagtcc ttgaagtcac 180

ccctgagagg cagaagctgt cactgttccc ctggcactgg ggagaaaagg gacatgtagg 240

ggctgttctg ttgcaagttt agagatccac gtggtcagcg cctcaacgct ggttccatca 300

gacagagata ccggaccctg ctaggattcc gttgttggcc gcaagtgcag aggcgttcgc 360

catacttggt ggagatgtcc aaattgcagt ttgcttcaca gagggccacc acgataggca 420

tgttgcaatc tttacattgc ccatggaggg gagtattgcc gtgcctgtct tgataatcga 480

cgaaacaccc tgggtgagga gagtcttgat tacctccatc tgacaccgtc taaagccaga 540

tgaagggcaa tgtgtccgtc cttgtcgcaa gcattaaggt cggctcc 587

<210> 9

<211> 532

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (477)..(477)

<223> n es a, c, g o t.

10 <400> 9

ES 2 357 853 T3

caacttctat ggtggtttta ttatgaaaca aaataaacct ttcaatatca tattcaaatt 60
 atcaaaaata tagctcaaac cttcctacac tgataaaaat aatatatatc attcacatca 120
 acatcatgac agctcaaagt tagctatttg aaataaatca tcatactttt gaaagctact 180
 cttattacat ttctaaacag agtgctattt ttcctttttc taagagaaac tataaagcat 240
 accccaaagt actcacattc tggctacatt tggaaaacta tttgaaagat taaaccttca 300
 tgtttatctc atctcacaat ttacatttat gtattaattht aaatggctac agaactattht 360
 aaaaattht ttataaaca tggactaca aatthtaaaa cttcctgttc taaaagtaac 420
 tathtaaaaa gatttctgga acacaccatc aaaaagatac tgtagaaaa tttcccnaga 480
 gtggacacac accaggcaaa tccaggccgg aggaatthag acgggtthtag ca 532

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de polinucleótidos que se seleccionan del grupo constituido por: SEQ ID I.1, SEQ ID I.2, SEQ ID I.3, SEQ ID I.4, SEQ ID I.5, SEQ ID I.6, SEQ ID I.7, SEQ ID I.8 y SEQ ID I.9 o secuencias parciales de los mismos con una longitud de 20 a 200 nucleótidos como marcadores de actividad génica para la clasificación de pacientes como “no infectados sin fallo multiorgánico” o como “no enfermos de fallo multiorgánico infeccioso” o como “enfermos de fallo multiorgánico infeccioso”.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que las secuencias parciales de los polinucleótidos tienen una longitud de 20-80 nucleótidos.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1-2, caracterizado porque una expresión en exceso de SEQ ID I.1 y una expresión en defecto de SEQ ID I.3 o una expresión en exceso de SEQ ID I.2 y una expresión en defecto de SEQ ID I.4 indica la clasificación “ninguna infección y sin fallo multiorgánico”;
- una expresión en exceso de SEQ ID I.3 y una expresión en defecto de SEQ ID I.6 o una expresión en exceso de SEQ ID I.4 y una expresión en defecto de SEQ ID I.5 indica la clasificación “fallo multiorgánico no infeccioso”;
- 15 una expresión en exceso de SEQ ID I.5 y una expresión en defecto de SEQ ID I.7 o una expresión en exceso de SEQ ID I.8 y una expresión en defecto de SEQ ID I.9 indica la clasificación “fallo multiorgánico infeccioso”.
4. Uso según la reivindicación 1-3, caracterizado porque las secuencias o las secuencias parciales de polinucleótidos se sustituyen al menos parcialmente por análogos sintéticos, aptámeros y/o ácidos nucleicos de péptidos.
5. Uso según la reivindicación 1-4 en una micromatriz.
- 20 6. Procedimiento para la clasificación de pacientes que están enfermos de un fallo multiorgánico infeccioso o no infeccioso que comprende las etapas:
- aislar ARNm de una muestra de paciente;
- marcar el ARNm con una unidad detectable;
- 25 poner en contacto el ARNm marcado con los marcadores de actividad génica según la reivindicación 1 de manera que los marcadores de actividad génica individuales también estén presentes separados entre sí después de la puesta en contacto;
- lavar los marcadores de actividad génica hibridados;
- estimular la unidad detectable de manera que ésta emita una señal;
- 30 leer las señales de hibridación para cada marcador de actividad génica individual y comparar con una muestra de referencia de un paciente sano,
- indicando una expresión en exceso de SEQ ID I.1 y una expresión en defecto de SEQ ID I.3 o una expresión en exceso de SEQ ID I.2 y una expresión en defecto de SEQ ID I.4 la clasificación “ninguna infección y sin fallo multiorgánico”;
- 35 indicando una expresión en exceso de SEQ ID I.3 y una expresión en defecto de SEQ ID I.6 o una expresión en exceso de SEQ ID I.4 y una expresión en defecto de SEQ ID I.5 la clasificación “fallo orgánico no infeccioso”; y
- indicando una expresión en exceso de SEQ ID I.5 y una expresión en defecto de SEQ ID I.7 o una expresión en exceso de SEQ ID I.8 y una expresión en defecto de SEQ ID I.9 la clasificación “fallo multiorgánico infeccioso”.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la muestra de paciente comprende fluidos corporales, especialmente sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, líquido ascítico, líquido seminal, saliva, líquido de punción, contenido celular o una mezcla de los mismos.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 6 ó 7, en el que el procedimiento se realiza con una micromatriz.
9. Micromatriz para la clasificación de pacientes con fallo multiorgánico infeccioso o no infeccioso constituida por polinucleótidos con las secuencias SEQ ID I.1, SEQ ID I.2, SEQ ID I.3, SEQ ID I.4, SEQ ID I.5, SEQ ID I.6, SEQ ID I.7, SEQ ID I.8 y SEQ ID I.9 o secuencias parciales de los mismos con una longitud de 20 a 200 nucleótidos.
- 45 10. Dispositivo para la clasificación de pacientes con fallo multiorgánico infeccioso o no infeccioso que comprende;
- un módulo para la preparación de muestras de la muestra de paciente obtenida *in vitro*, un módulo para la hibridación de la muestra de paciente con sondas de actividad génica que se derivan de los clasificadores de actividad génica constituido por clasificadores de actividad génica con las secuencias SEQ ID I.1, SEQ ID I.2, SEQ ID I.3, SEQ ID

I.4, SEQ ID I.5, SEQ ID I.6, SEQ ID I.7, SEQ ID I.8 y SEQ ID I.9 o secuencias parciales de las mismas con una longitud de 20 a 200 nucleótidos,

un módulo para la lectura de las señales de hibridación,

un módulo para el análisis de imágenes de las señales de hibridación leídas,

5 un módulo que hace posible la comparación automática con clasificadores de actividad génica guardados de pacientes sanos y

un módulo que hace posible la visualización de la comparación resultante.

Figura 1

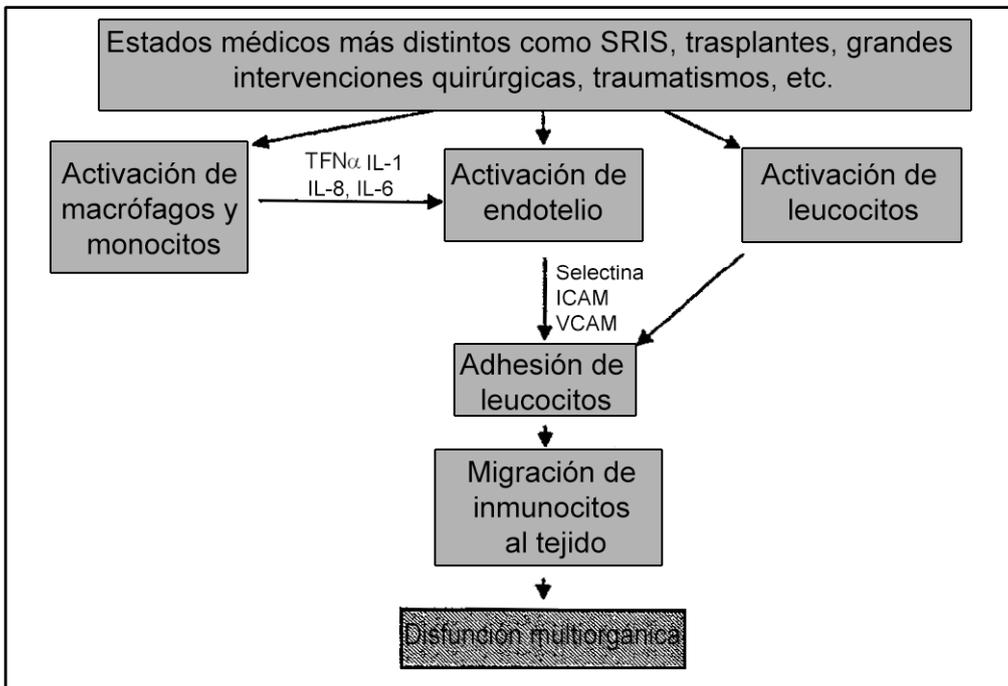


Figura 2

		Reglas de predicción		
		Seq-ID 1,1 ↑ Y Seq-ID 1,3 ↓ O Seq-ID 1,2 ↑ Y Seq-ID 1,4 ↓	Seq-ID 1,3 ↑ Y Seq-ID 1,6 ↓ O Seq-ID 1,4 ↑ Y Seq-ID 1,5 ↓	Seq-ID 1,5 ↑ Y Seq-ID 1,7 ↓ O Seq-ID 1,8 ↑ Y Seq-ID 1,9 ↑
Pacientes con diagnóstico clínico correspondiente [número]				
Controles de ITS [18]				
FMO no infeccioso [26]				
FMO infeccioso [31]				
	Definición	Control de ITS	FMO no infeccioso	FMO infeccioso
Proporción en porcentaje de patrones correctamente clasificados	P(T+/K+)	88,9	90,9	71,0
Proporción en porcentaje de patrones erróneamente clasificados	P(T-/K-)	98,1	81,6	92,5

Figura 3

