



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 365 813**

(51) Int. Cl.:

A01N 57/00 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

A61K 31/685 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06825270 .9**

(96) Fecha de presentación : **27.09.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1940231**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

(54) Título: **Detección de lisofosfatidilcolina para pronóstico o diagnóstico de un trastorno inflamatorio sistémico.**

(30) Prioridad: **28.09.2005 US 721833 P**
27.01.2006 US 762911 P
30.08.2006 US 841407 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2011

(73) Titular/es: **BECTON, DICKINSON & COMPANY**
1 Becton Drive
Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, US

(72) Inventor/es: **Shi, Song;**
Gentle, Thomas y
Moore, Richard

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 813 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

Detección de lisofosfatidilcolina para pronóstico o diagnóstico de un trastorno inflamatorio sistémico.

La presente invención se refiere a métodos para diagnóstico o pronóstico de sepsis en un paciente.

La detección temprana de una condición de enfermedad típicamente permite un tratamiento terapéutico más efectivo con el resultado clínico correspondientemente más favorable. En muchos casos, sin embargo, la detección temprana de los síntomas de la enfermedad es problemática debido a la complejidad de la enfermedad; por lo tanto, una enfermedad puede volverse relativamente avanzada antes de que el diagnóstico sea posible. Las afecciones inflamatorias sistémicas representan una de esta clase de enfermedades. Estas afecciones, particularmente sepsis, típicamente, pero no siempre, resultan de una interacción entre un microorganismo patógeno y el sistema de defensa del huésped que provoca una respuesta inflamatoria excesiva y desregulada en el huésped. La complejidad de la respuesta del huésped durante la respuesta inflamatoria sistémica ha complicado los esfuerzos por entender la patogénesis de la enfermedad (revisado en Healy, 2002, Ann. Pharmacother, 36:648-54). Un incompleto entendimiento de la patogénesis de la enfermedad, a su vez, contribuye con la dificultad para encontrar biomarcadores diagnósticos útiles. El diagnóstico temprano y confiable es imperativo, sin embargo, debido al avance marcadamente rápido de la sepsis convirtiéndose en una afección amenazante para la vida.

El desarrollo de sepsis en un sujeto sigue un curso bien descrito, que avanza de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica ("SIRS") negativo, a SIRS positivo, y después a sepsis, que después puede avanzar a sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos ("MOD"), y finalmente la muerte.

Documentar la presencia de los microorganismos patógenos que son clínicamente significativos para la sepsis ha probado ser difícil. Los microorganismos causantes típicamente son detectados mediante el cultivo de la sangre del sujeto, esputo, orina, secreción de herida, superficies de catéter de línea permanente, etc. Los microorganismos causantes, sin embargo, pueden residir solamente en ciertos medio ambientes del cuerpo de manera tal que el material particular que es cultivado puede no contener los microorganismos contaminantes. La detección puede ser complicada además por los bajos números de microorganismos en el sitio de infección. Los bajos números de patógenos en sangre presentan un problema particular para diagnosticar sepsis mediante el cultivo de sangre. En un estudio, por ejemplo, se obtuvieron resultados de cultivo positivos en solamente 17% de los sujetos que presentaban manifestaciones clínicas de sepsis (Rangel-Frausto et al., 1995, JAMA 273:117-123). El diagnóstico además puede ser complicado por la contaminación de las muestras por microorganismos no patógenos. Por ejemplo, solamente el 12,4% de los microorganismos detectados eran clínicamente significativos en un estudio de 707 sujetos con septicemia (Weinstein et al., 1997, Clinical Infectious Diseases 24:584-602).

La dificultad en el diagnóstico temprano de sepsis está reflejada por la alta morbilidad y mortalidad asociada con la enfermedad. La sepsis actualmente es la décima causa de muerte en los Estados Unidos y es especialmente prevalente entre los pacientes hospitalizados en unidades de cuidado intensivo no coronario (ICUs), donde es la causa de muerte más común. La tasa total de mortalidad es tan alta como el 35%, con 750.000 casos estimados por año que se producen en Estados Unidos solamente. El costo anual para tratar la sepsis en los Estados Unidos solamente está en el orden de los mil millones de dólares.

La mayoría de los sistemas de clasificación de sepsis existentes o modelos de predicción pronostican solamente el riesgo de las complicaciones de la etapa tardía, que incluye la muerte, en pacientes que ya son considerados sépticos y no pronostican el desarrollo de la misma sepsis. A menudo, el diagnóstico de sepsis se basa en la sospecha clínica con un sistema de clasificación empírico tal como APACHE II (Knaus et al., 1985, Crit. Care Med. 13:818-829), seguido por el cultivo de sangre. Puede tomar 48 horas o más confirmar cualquier infección sistémica. Por entonces, a menudo es demasiado tarde salvar algunos pacientes. Si el diagnóstico o pronóstico de sepsis puede realizarse en forma temprana, el tratamiento puede hacerse disponible para prevenir o disminuir la velocidad del avance de sepsis en sepsis severa o choque séptico.

Por ello existe una necesidad de métodos para diagnosticar afecciones inflamatorias sistémicas, que incluye sepsis, mediante la utilización de técnicas que tengan especificidad y sensibilidad satisfactorias, suficientemente tempranas para permitir la intervención y prevención efectivas. La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico o pronóstico de sepsis en un paciente que comprende la etapa de monitorear o evaluar la cantidad de lisofosfatidilcolina total en una muestra de fluido o tejido del paciente, donde el diagnóstico o pronóstico se realiza previo a la aparición de sepsis.

La presente invención además se refiere a un método para el diagnóstico o pronóstico de sepsis en un paciente que comprende la etapa de detectar la lisofosfatidilcolina en el paciente mediante el contacto de una muestra de fluido o tejido del paciente con: una enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la lisofosfatidilcolina para formar glicerofosfatidilcolina; una enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la glicerofosfatidilcolina para formar colina; una enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la colina, agua y oxígeno para formar peróxido; una peroxidasa; y un sustrato fluorogénico de dicha peroxidasa; en condiciones apropiadas para la formación de un producto fluorescente donde el producto fluorescente indica la lisofosfatidilcolina; donde el diagnóstico o pronóstico se realiza previo a la aparición de sepsis.

En un aspecto, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la cantidad de lisofosfatidilcolina total en una muestra de un paciente puede utilizarse para el diagnóstico o pronóstico rápido, sensible y exacto de una afección inflamatoria sistémica en un sujeto. En aspectos de la invención, la lisofosfatidilcolina total en una muestra de un paciente se utiliza para evaluar la presencia de o riesgo de la afección inflamatoria sistémica. Según lo que se muestra en los ejemplos más abajo, los métodos de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica. Si bien la afección inflamatoria sistémica en los métodos de la invención es sepsis, en la presente memoria se describe cualquier afección inflamatoria sistémica conocida para aquellos expertos en la técnica que incluye síndrome de respuesta inflamatoria sistémica ("SIRS"), sepsis, sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos ("MOD") y mortalidad.

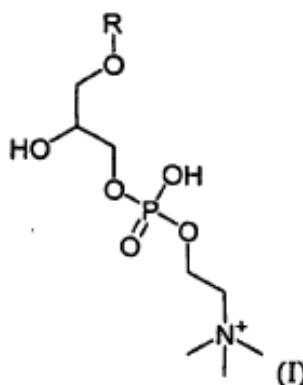
En ciertas realizaciones, se evalúa la lisofosfatidilcolina total en una muestra del sujeto para evaluar la presencia o riesgo de una afección inflamatoria sistémica. Según lo que se describe en la presente memoria, se ha descubierto que la cantidad de lisofosfatidilcolina total en una muestra de un paciente puede estar correlacionada con la aparición de una afección inflamatoria sistémica y aún puede indicar la afección en anticipación a su aparición. Como resultado, en ciertas realizaciones, la lisofosfatidilcolina total en una muestra del paciente puede utilizarse como un pronóstico para una afección inflamatoria sistémica. La evaluación puede proceder de acuerdo a cualquier técnica para evaluar la lisofosfatidilcolina total conocida para aquellos expertos en la técnica.

Las técnicas ejemplares se describen en la presente memoria. Sin embargo, la presente invención proporciona métodos basados en cualquier técnica para evaluar la lisofosfatidilcolina total evidente para aquellos expertos en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de una clase de biomarcadores de lisofosfatidilcolina que son útiles para el diagnóstico o pronóstico rápido, sensible y exacto de una afección inflamatoria sistémica en un sujeto. En aspectos de la invención, se utiliza la evaluación de un biomarcador de la invención en el sujeto para evaluar la presencia de o riesgo de la afección inflamatoria sistémica. Según lo que se muestra en los ejemplos más abajo, los métodos de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica con exactitud hasta el 80 % o más en un tiempo tan corto como, por ejemplo, ocho o aún seis horas.

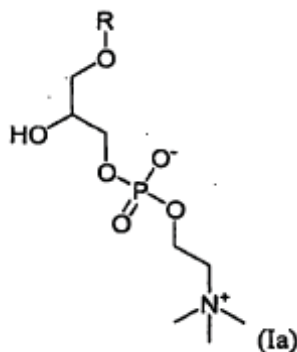
En ciertas realizaciones, el biomarcador es una 1-O-acil-2-liso-*sn*-glicerol-3-fosfolina. El grupo acilo puede ser cualquier grupo acilo conocido para aquellos expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el grupo acilo es acilo C₁₄-C₂₂. En otras realizaciones, el grupo acilo es acilo C₁₆-C₁₈. En realizaciones particulares, el grupo acilo es acilo C₁₆. En una realización preferible, el grupo acilo es palmitoilo. En otras realizaciones particulares, el grupo acilo es acilo C₁₈. En una realización preferible, el grupo acilo es estearoilo. El biomarcador puede ser cualquier forma del biomarcador del sujeto, por ejemplo cualquier sal o solvato del biomarcador que puede ser identificado por aquellos expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, el biomarcador es un compuesto en conformidad con la fórmula (I):



o una sal o solvato del mismo. En la fórmula (I), R puede ser cualquier grupo acilo conocido para aquellos expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, R es acilo C₁₄-C₂₂. En otras realizaciones, R es acilo C₁₆-C₁₈. En realizaciones particulares, R es acilo C₁₆. En una realización preferible, R es palmitoilo. En otras realizaciones particulares, R es acilo C₁₈. En una realización preferible, R es estearoilo.

Las sales ejemplares de fórmula (I) son proporcionadas por la fórmula (Ia):



donde dicha sal puede estar coordinada con cualquier anión inorgánico u orgánico fisiológico, o cualquier catión inorgánico u orgánico fisiológico, o ambos, conocido para aquellos expertos en la técnica. Los aniones fisiológicos ejemplares incluyen cloruro, bromuro, fosfato, acetato, carbonato, bicarbonato y sulfato. Los cationes fisiológicos ejemplares incluyen sodio, potasio, calcio, magnesio y amonio.

En ciertos aspectos, el biomarcador en el sujeto se evalúa para evaluar la presencia o riesgo de la afección inflamatoria sistémica. La evaluación puede proceder de acuerdo a cualquier método para evaluar un biomarcador conocido para aquellos expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la cantidad del biomarcador se mide en un fluido de un sujeto. Sin embargo, la presente invención proporciona métodos basados en cualquier técnica para evaluar un biomarcador de la invención evidente para aquellos expertos en la técnica.

En la siguiente descripción, el término lisofosfatidilcolina puede referirse a lisofosfatidilcolina total o a un biomarcador de lisofosfatidilcolina, a menos que se especifique lo contrario. Por supuesto, la presente invención proporciona pronóstico o diagnóstico en base a la lisofosfatidilcolina total, pronóstico o diagnóstico en base a uno o más biomarcadores de lisofosfatidilcolina de la invención, y pronóstico o diagnóstico en base a la lisofosfatidilcolina total junto con uno o más biomarcadores de lisofosfatidilcolina de la invención.

En algunas realizaciones, se realizan una pluralidad de mediciones de lisofosfatidilcolina en el sujeto con el tiempo. Los intervalos de tiempo pueden ser, por ejemplo, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas u otro intervalos de acuerdo al criterio del practicante en la técnica. En estas realizaciones, las cantidades relativas de lisofosfatidilcolina son evaluadas para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica por un practicante con experiencia en la técnica. En realizaciones particulares, las cantidades decrecientes de lisofosfatidilcolina indican el riesgo creciente de la afección inflamatoria sistémica, las cantidades crecientes de lisofosfatidilcolina total indican el riesgo decreciente de la afección inflamatoria sistémica.

En realizaciones ventajosas, una única muestra del sujeto puede ser suficiente para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica. La cantidad de lisofosfatidilcolina puede compararse a uno o más biomarcadores presentes en la muestra que son conocidos para aquellos expertos en la técnica por mantenerse en una cantidad relativamente constante en la muestra en individuos similares al sujeto. La cantidad de lisofosfatidilcolina de la invención puede ser evaluada contra este estándar interno para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica por el practicante con experiencia. En realizaciones particulares, bajas cantidades de lisofosfatidilcolina indican riesgo incrementado de la afección inflamatoria sistémica, y altas cantidades de lisofosfatidilcolina indican riesgo reducido de la afección inflamatoria sistémica.

En otras realizaciones, la evaluación se basa en una comparación de la cantidad de lisofosfatidilcolina respecto de una cantidad de referencia de lisofosfatidilcolina. La cantidad de referencia puede ser, por ejemplo, la cantidad de lisofosfatidilcolina en un individuo de referencia que se manifiesta, o se manifestara dentro de un período definido de tiempo, uno o más síntomas de la afección inflamatoria sistémica conocida. La cantidad puede ser, por ejemplo, un valor absoluto o un valor absoluto con un margen de error o un intervalo de valores, según lo determinado por aquellos expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el individuo de referencia exhibe, o exhibirá, síntomas de SIRS, sepsis, sepsis severa, choque séptico o MOD o ningún síntoma de una afección inflamatoria sistémica. En realizaciones particulares, bajas cantidades de lisofosfatidilcolina (por ejemplo respecto de una cantidad de referencia) indican riesgo incrementado de la afección inflamatoria sistémica, y altas cantidades de lisofosfatidilcolina indican riesgo reducido de la afección inflamatoria sistémica.

En forma ventajosa, la cantidad de referencia no necesita ser determinada por no que lleve a cabo un método de la invención. En vez, la cantidad de referencia de lisofosfatidilcolina puede ser identificada por datos de consulta disponibles para aquellos expertos en la técnica. Dichos datos pueden ser obtenidos de cualquier fuente disponible para aquellos expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, las fuentes pueden ser desarrolladas con cantidades de referencia de lisofosfatidilcolina recolectados por aquellos expertos en la técnica en conformidad con métodos descritos en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, la cantidad de referencia es de un individuo de referencia que presenta síntomas de la afección inflamatoria sistémica. El individuo de referencia puede presentar síntomas de SIRS, sepsis, sepsis severa, choque séptico, MOD o mortalidad o ningún síntoma de una afección inflamatoria sistémica. En ciertas realizaciones, la cantidad de referencia puede ser evaluada en un tiempo previo a o después de la presentación de síntomas. Por ejemplo, en una realización ventajosa, una cantidad de referencia puede ser la cantidad medida en un individuo con SIRS positivo 12, 24, 36 o 48 horas previo a la aparición de sepsis. La medición de dichas cantidades de referencia está dentro de la experiencia de aquellos de la técnica.

En otras realizaciones, las cantidades de referencia son de una pluralidad de individuos que presentan síntomas de una o más afecciones inflamatorias sistémicas. Las cantidades de referencia pueden ser calculadas de acuerdo a cualquier método estadístico apropiado conocido para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las cantidades de referencia pueden ser en base a la media estadística de las cantidades de referencia de los individuos de referencia que presentan una afección inflamatoria sistémica. En realizaciones ventajosas, se realiza la comparación con un valor o intervalo de valores en cuanto a la cantidad de lisofosfatidilcolina. El valor o intervalo de valores puede obtenerse según lo que se describe en la presente memoria y puede estar disponible para un practicante de los métodos de la invención. En realizaciones particulares, bajas cantidades de lisofosfatidilcolina (por ejemplo respecto de una cantidad de referencia) indican riesgo incrementado de la afección inflamatoria sistémica, y altas cantidades de lisofosfatidilcolina indican riesgo reducido de la afección inflamatoria sistémica.

La comparación puede ser de acuerdo a cualquier técnica para comparar las cantidades de biomarcadores conocidos para aquellos expertos en la técnica. En una realización, el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica se basa en la diferencia entre la cantidad de lisofosfatidilcolina en el sujeto y la cantidad de referencia. En ciertas realizaciones la diferencia entre la cantidad de lisofosfatidilcolina en el sujeto y la cantidad de referencia se correlaciona inversamente con el riesgo de la afección inflamatoria sistémica. En otras realizaciones, la cantidad de referencia es un límite - en otras palabras, el sujeto puede evaluarse en cuanto a tener o tener riesgo de la afección inflamatoria sistémica si la cantidad de lisofosfatidilcolina en el sujeto es menor que una cantidad límite de referencia. Dichas cantidades límites de referencia pueden calcularse de acuerdo a métodos descritos en la presente memoria.

La cantidad de lisofosfatidilcolina total en el sujeto puede determinarse de acuerdo a cualquier técnica conocida para aquellos expertos en la técnica sin límite. En ciertas realizaciones, uno con experiencia puede medir una cantidad que se correlaciona con la cantidad de lisofosfatidilcolina total en una muestra. Por ejemplo, en realizaciones particulares, uno con experiencia puede medir la lisofosfatidilcolina libre total, la lisofosfatidilcolina unida total o la lisofosfatidilcolina unida y libre total en la muestra para indicar la cantidad de lisofosfatidilcolina total en la muestra. En otras palabras, en ciertas realizaciones, medición de la lisofosfatidilcolina libre o unida, o ambas libre y unida, puede correlacionarse con la cantidad de lisofosfatidilcolina total. En ciertas realizaciones, la técnica para evaluar la lisofosfatidilcolina total no es crítica para la invención y necesita ser llevada a cabo por uno que practique los métodos en la presente memoria. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los métodos de la invención pueden comprender la única etapa de comparar la cantidad de lisofosfatidilcolina total en un sujeto con una cantidad de lisofosfatidilcolina total de referencia para evaluar el riesgo de la afección inflamatoria sistémica sin importar cómo se mide cualquier cantidad. En otras realizaciones, la lisofosfatidilcolina total del sujeto se evalúa mediante una técnica descrita en la presente memoria seguido por la comparación con una lisofosfatidilcolina total de referencia para evaluar el riesgo de la afección inflamatoria sistémica. En ciertas realizaciones, la lisofosfatidilcolina total se evalúa por espectrometría, cromatografía, inmunoensayo, electroforesis o ensayo enzimático según lo que se describe en detalle más abajo.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos fluorescentes para ensayar la lisofosfatidilcolina total en una muestra de un sujeto. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto la muestra del sujeto con uno o más reactivos capaces de generar un producto fluorescente indicativo de lisofosfatidilcolina total en la muestra. Los métodos pueden utilizarse para detectar la presencia de lisofosfatidilcolina total o para detectar la cantidad de lisofosfatidilcolina total, o ambos, en la muestra. En realizaciones particulares, la muestra se pone en contacto con un sustrato fluorogénico de uno o más de los reactivos. Este sustrato fluorogénico puede ser convertido en el producto fluorescente que indica la lisofosfatidilcolina total. En realizaciones ventajosas, los reactivos comprenden peroxidasa, colina oxidasa, glicerofosfatidilcolina diesterasa y lisofosfolipasa. Un sustrato fluorogénico útil es 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina, un compuesto que puede convertirse en el producto fluorescente 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona. En forma ventajosa, dichos métodos pueden proporcionar la sensibilidad necesaria para detectar las bajas cantidades de lisofosfatidilcolina total en sujetos que tienen, o están en riesgo de, una afección inflamatoria sistémica.

La cantidad del biomarcador en el sujeto puede determinarse de acuerdo a cualquier técnica conocida para aquellos expertos en la técnica sin límite. En ciertas realizaciones, la técnica para evaluar el biomarcador no es crítica para la invención y no necesita ser llevada a cabo por uno que practique los métodos en la presente memoria. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los métodos de la invención pueden comprender la única etapa de comparar el biomarcador en un sujeto con un biomarcador de referencia para evaluar el riesgo de la afección inflamatoria sistémica sin importar cómo se mide cualquier biomarcador. En otras realizaciones, el biomarcador del sujeto se evalúa mediante una técnica descrita en la presente memoria seguida por la comparación del biomarcador en un sujeto con un biomarcador de referencia para evaluar el riesgo de la afección inflamatoria sistémica. En ciertas

realizaciones, el biomarcador se evalúa por espectrometría, cromatografía, inmunoensayo o electroforesis según lo que se describe en detalle más abajo.

La cantidad de lisofosfatidilcolina puede medirse en fluidos o tejidos del sujeto según lo que se proporciona en la presente memoria. En la presente se describen memoria los procesos para preparar el fluido o tejido, por ejemplo, procesos para extraer o purificar la lisofosfatidilcolina. Además, en la presente memoria se proporcionan técnicas para medir la lisofosfatidilcolina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para monitorear una afección inflamatoria sistémica en un sujeto. En dichos métodos, la evaluación de lisofosfatidilcolina se utiliza para monitorear una afección inflamatoria sistémica en el sujeto. En dichos métodos, los cambios en la cantidad de lisofosfatidilcolina indican cambios en la afección inflamatoria sistémica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las crecientes cantidades de lisofosfatidilcolina indican severidad disminuida o menos riesgo de la afección inflamatoria sistémica, y cantidades decrecientes de lisofosfatidilcolina indican severidad incrementada o riesgo incrementado de la afección inflamatoria sistémica. En algunas realizaciones, la evaluación de lisofosfatidilcolina puede indicar la conversión de una afección inflamatoria sistémica a otra tal como SIRS, sepsis, sepsis severa, choque séptico, MOD o mortalidad o ninguna afección inflamatoria sistémica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para monitorear el tratamiento de una afección inflamatoria sistémica en un sujeto. En dichos métodos, la evaluación de lisofosfatidilcolina se utiliza para monitorear la afección inflamatoria sistémica en el sujeto. En dichos métodos, los cambios en la cantidad de lisofosfatidilcolina indican cambios en la afección inflamatoria sistémica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, cantidades crecientes de lisofosfatidilcolina indican severidad disminuida o menos riesgo de la afección inflamatoria sistémica, y cantidades decrecientes de lisofosfatidilcolina total indican severidad incrementada o riesgo incrementado de la afección inflamatoria sistémica. En forma ventajosa, el tratamiento de la afección inflamatoria sistémica puede ajustarse en base al monitoreo. En algunas realizaciones, la evaluación de lisofosfatidilcolina puede indicar la conversión de una afección inflamatoria sistémica a otra tal como SIRS, sepsis, sepsis severa, choque séptico, MOD o mortalidad o ninguna afección inflamatoria sistémica. En realizaciones preferibles, un sujeto que es SIRS negativo puede monitorearse en cuanto a la conversión a SIRS o sepsis u otra afección inflamatoria. En otras realizaciones preferibles, un sujeto que es SIRS positivo puede monitorearse en cuanto a la conversión a sepsis u otra afección inflamatoria sistémica, o en cuanto a la conversión a SIRS negativo.

También se describen en la presente memoria kits para el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica. En algunas realizaciones, los kits comprenden una composición apropiada para la evaluación de lisofosfatidilcolina. Los kits además pueden comprender una etiqueta o etiquetado con instrucciones para utilizar la evaluación de lisofosfatidilcolina total para el diagnóstico o pronóstico de una o más afecciones inflamatorias sistémicas. En ciertas realizaciones, el kit puede comprender una etiqueta o etiquetado con cantidades de referencia, o citaciones de dichas cantidades de referencia, de lisofosfatidilcolina para facilitar el pronóstico o diagnóstico de una afección inflamatoria sistémica con la composición del kit.

La FIG. 1 proporciona un sistema ejemplar de la invención;

La FIG. 2 proporciona análisis del transcurso de tiempo del biomarcador 496.3;

La FIG. 3 proporciona análisis del transcurso de tiempo del biomarcador 518.3;

La FIG. 4-1 ilustra la sensibilidad y especificidad versus umbral en un modelo de desempeño de acuerdo a la invención;

La FIG. 4-2 ilustra la evolución de parámetros de inclusión de características durante la optimización de los métodos de la invención;

La FIG. 4-3 ilustra la sensibilidad y especificidad versus umbral en un modelo de desempeño de acuerdo a la invención;

Las FIGS. 4-4 y 4-5 ilustran la evolución de parámetros de inclusión de características durante la optimización de métodos de la invención;

La FIG. 4-6 ilustra la sensibilidad y especificidad versus umbral en un modelo de desempeño de acuerdo a la invención;

La FIG. 4-7 a la 4-9 ilustran la evolución de parámetros de inclusión de características durante la optimización de métodos de la invención;

La FIG. 5-1 ilustra la sensibilidad y especificidad versus umbral en un modelo de desempeño de acuerdo a la invención;

La FIG. 5-2 ilustra la evolución de parámetros de inclusión de características durante la optimización de métodos de la invención;

La FIG. 5-3 ilustra la sensibilidad y especificidad versus umbral en un modelo de desempeño de acuerdo a la invención;

Las FIGS. 5-4 y 5-5 ilustran la evolución de parámetros de inclusión de características durante la optimización de métodos de la invención;

- 5 La FIG. 5-6 ilustra la sensibilidad y especificidad versus umbral en un modelo de desempeño de acuerdo a la invención;

La FIG. 5-7 a 5-9 ilustran la evolución de parámetros de inclusión de características durante la optimización de métodos de la invención;

- 10 La FIG. 6 proporciona un esquema para la detección de lisofosfatidilcolina de acuerdo a las realizaciones de la invención; y

La FIG. 7 proporciona lisofosfatidilcolina detectada en forma fluorescente en muestras de pacientes que mostraron síntomas de SIRS o sepsis;

Definiciones

Según lo utilizado en la presente memoria, los siguientes términos tendrán los siguientes significados:

- 15 El término "sujeto" se refiere a animales tales como mamíferos, que incluyen, pero sin limitarse a, primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, oveja, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. En realizaciones preferibles, el sujeto es un ser humano. El término "paciente" es intercambiable con un sujeto humano, a menos que se indique lo contrario.

- 20 "Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica," o "SIRS," se refiere a una respuesta clínica a una variedad de ataques clínicos severos, según lo manifestado por dos o más de las siguientes afecciones dentro de un período de 24 horas:

- temperatura corporal mayor que 38°C (100,4°F) o menor que 36°C (96,8°F);

- ritmo cardíaco (HR) mayor que 90 latidos/minuto;

- 25 - ritmo respiratorio (RR) mayor que 20 respiraciones/minuto, o P_{CO_2} menor que 32 mmHg, o que requiere ventilación mecánica; y

- recuento de glóbulos blancos sanguíneos (WBC) mayor que $12,0 \times 10^9/L$ o menor que $4,0 \times 10^9/L$ o que poseen más que 10% de formas de bandas inmaduras.

- 30 Estos síntomas de SIRS representan definiciones de consenso de SIRS que pueden ser modificadas o suplantadas por otras definiciones en el futuro. La presente definición se utiliza clarificar la práctica clínica actual y no representa un aspecto crítico de la invención (véase, por ejemplo, American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for Sepsis and Organ Failure y Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis, 1992, Crit. Care. Med 20, 864-874).

- 35 Un sujeto con SIRS posee una presentación clínica que es clasificada como SIRS, según lo que se define más arriba, pero no se considera clínicamente que es séptico. Los métodos para determinar que sujetos están en riesgo de desarrollar sepsis son bien conocidos por aquellos de la técnica. Dichos sujetos incluyen, por ejemplo, aquellos en una unidad de cuidado intensivo ("ICU") y aquellos que de otra manera han sufrido un trauma fisiológico, tal como una quemadura, cirugía u otro ataque. Una característica distintiva de SIRS es la creación de un estado proinflamatorio que puede estar marcado por taquicardia, taquipnea o hiperpnea, hipotensión, hipoperfusión, oliguria, leucocitosis o leucopenia, pirexia o hipotermia y la necesidad de infusión volumétrica. SIRS característicamente no incluye una fuente documentada de infección (por ejemplo, bacteremia).

- 40 "Sepsis" se refiere a una respuesta sistémica del huésped a la infección con SIRS más una infección documentada (por ejemplo, una confirmación de laboratorio posterior de una infección clínicamente significativa tal como un cultivo positivo de un organismo). De ese modo, sepsis se refiere a la respuesta inflamatoria sistémica a una infección documentada (véase, por ejemplo, American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine, Chest, 1997, 101:1644-1655). Según lo utilizado en la presente memoria, "sepsis" incluye todas las etapas de sepsis que incluyen, pero sin limitarse a, la aparición de sepsis, sepsis severa, choque séptico y disfunción múltiple de órganos ("MOD") asociada con las etapas finales de sepsis.

- 50 La "aparición de sepsis" se refiere a una etapa temprana de sepsis, por ejemplo, previo a una etapa cuando las manifestaciones clínicas convencionales son suficientes para soportar una sospecha clínica de sepsis. Debido a que los métodos de la presente invención pueden utilizarse para detectar sepsis previo a un tiempo en que la sepsis sería sospechada mediante la utilización de técnicas convencionales, en ciertas realizaciones, el estado de enfermedad del sujeto en la sepsis temprana es confirmado retrospectivamente, cuando la manifestación de sepsis

es más obvia clínicamente. El mecanismo exacto por el que un sujeto se vuelve séptico no es un aspecto crítico de la invención. Los métodos de la presente invención pueden detectar la aparición de sepsis independientemente del origen del proceso infeccioso.

5 "Sepsis severa" se refiere a sepsis asociada con disfunción de órganos, anormalidades de hipoperfusión, o hipotensión inducida por sepsis. Las anormalidades de hipoperfusión incluyen, pero no se limitan a, acidosis láctica, oliguria, o una alteración aguda en el estado mental.

"Choque séptico" se refiere a hipotensión inducida por sepsis que no es sensible a sobrecarga de fluido intravenoso adecuado y con manifestaciones de hipoperfusión periférica.

10 Un "convertidor" o "sujeto que se convierte" se refiere a un sujeto SIRS positivo que avanza hasta la sospecha clínica de sepsis durante el período en que el sujeto es monitoreado, típicamente durante una estadía en ICU.

Un "no convertidor" o "sujeto que no se convierte" se refiere a un sujeto SIRS positivo que no avanza hasta la sospecha clínica de sepsis durante el período en que el sujeto es monitoreado, típicamente durante una estadía en ICU.

15 Un "biomarcador" es un compuesto que está presente en o se obtiene de una muestra biológica. "Obtenido de" según lo utilizado en este contexto se refiere a un compuesto que, cuando es detectado, es indicativo de una molécula particular que está presente en la muestra biológica. Por ejemplo, la detección de un fragmento particular de un compuesto puede ser indicativo de la presencia del mismo compuesto en la muestra biológica. Un biomarcador, por ejemplo, puede aislarse de la muestra biológica, directamente medido en la muestra biológica, o detectado en o determinado para ser en la muestra biológica. Un biomarcador, por ejemplo, puede ser funcional, parcialmente funcional, o no funcional.

Según lo utilizado en la presente memoria, "técnicas convencionales" en el contexto del diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica son aquellas técnicas que clasifican un sujeto en base a cambios fenotípicos sin evaluar un biomarcador de acuerdo a la presente invención.

25 "Predecir el desarrollo de sepsis" es una determinación respecto de si el sujeto desarrolla sepsis. Dicha predicción está limitada por la exactitud de los medios utilizados para tomar esta determinación. La presente invención proporciona un método, por ejemplo, mediante la utilización de una norma/s de decisión, para tomar esta determinación con una exactitud que sea 60% o mayor. Según lo utilizado en la presente memoria, los términos "predecir el desarrollo de sepsis" y "predecir sepsis" son intercambiables. En algunas realizaciones, el acto de predecir el desarrollo de sepsis (predecir sepsis) se logra mediante la evaluación de uno o más perfiles de biomarcador de un sujeto mediante la utilización de una regla de decisión que es indicativa del desarrollo de sepsis y, como resultado de esta evaluación, mediante la recepción de un resultado de la regla de decisión que indica que el sujeto se volverá séptico. Dicha evaluación de uno o más perfiles de biomarcadores de un sujeto de ensayo mediante la utilización una regla de decisión utiliza algunas o todas las cantidades en uno o más perfiles de biomarcadores para obtener dicho resultado.

35 Según lo utilizado en la presente memoria, el término "específicamente," y términos análogos, en el contexto de un anticuerpo, se refiere a péptidos, polipéptidos, y anticuerpos o fragmentos de los mismos que específicamente se unen a un antígeno o una clase de antígenos, o fragmentos de los mismos, y no se unen específicamente a otros antígenos u otros fragmentos. Un péptido o polipéptido que específicamente se une a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con afinidad inferior, según lo determinado por técnicas experimentales estándar, por ejemplo, mediante cualquier inmunoensayo bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Dichos inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayos (RIAs) y ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISAs). Los anticuerpos o fragmentos que específicamente se unen a un antígeno pueden tener reactividad cruzada con antígenos relacionados. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos que específicamente se unen a un antígeno no reaccionan en forma cruzada con otros antígenos. Véase, por ejemplo, Paul, ed., 2003, Fundamental Immunology, 5th ed., Raven Press, Nueva York en las páginas 69-105, para un debate con respecto a las interacciones antígeno-anticuerpo, especificidad y reactividad cruzada, y métodos para determinar todo lo anterior.

Según lo utilizado en la presente memoria, una "población de referencia" es una población de sujetos que puede utilizarse para construir una regla de decisión para la evaluación de un biomarcador de sujetos en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria sistémica.

Un "sujeto de referencia" es un sujeto que ha sido diagnosticado, o será diagnosticado dentro de un período de tiempo definido, con una afección inflamatoria sistémica de acuerdo a estándares reconocidos por aquellos expertos en la técnica. Un sujeto de referencia es útil para establecer una cantidad de referencia del biomarcador que puede utilizarse para evaluar una cantidad del biomarcador en un sujeto de ensayo para el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica.

Un "perfil de biomarcador" comprende una pluralidad de uno o más tipos de biomarcadores (por ejemplo, un polipéptido, péptido, lípido, ácido nucleico, metabolito, ARNm, ADNc, y/o un carbohidrato, etc.), o una indicación de

los mismos, junto con una característica, tal como un aspecto medible (por ejemplo, abundancia, nivel de expresión) de los biomarcadores. Un perfil de biomarcador comprende al menos dos de dichos biomarcadores o indicaciones de los mismos, donde los biomarcadores pueden estar en clases iguales o diferentes, tales como, por ejemplo, un ácido nucleico y un carbohidrato. Un perfil de biomarcador también puede comprender al menos tres, cuatro, cinco, 10, 20, 30 o más biomarcadores o indicaciones de los mismos. En una realización, un perfil de biomarcador comprende cientos, o aún miles, de biomarcadores o indicaciones de los mismos. Un perfil de biomarcador además puede comprender uno o más controles o estándares internos. En una realización, el perfil de biomarcador comprende al menos un biomarcador, o indicación del mismo, que sirve como un estándar interno. En otra realización, un perfil de biomarcador comprende una indicación de uno o más tipos de biomarcadores. El término "indicación" según lo utilizado en la presente memoria en este contexto simplemente se refiere a una situación donde el perfil de biomarcador contiene símbolos, datos, abreviaciones u otros indicios similares para un biomarcador, en vez de la misma entidad molecular del biomarcador.

Cada biomarcador en un perfil de biomarcador incluye una "característica" correspondiente. Una "característica", según lo utilizado en la presente memoria, se refiere a un aspecto medible de un biomarcador. Una característica puede incluir, por ejemplo, la presencia o ausencia del biomarcador en la muestra biológica, la abundancia o cantidad del biomarcador en la muestra, la relación de cantidades de moléculas en la muestra, etc. Una característica también puede ser la diferencia entre un aspecto medible del biomarcador correspondiente que se toma de dos muestras, donde las dos muestras son recolectadas de un sujeto en dos puntos de tiempo diferentes. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que otros métodos de cómputo de una característica pueden ser inventados y todos dichos métodos están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, una característica puede representar el promedio de una abundancia de un biomarcador en todas las muestras biológicas recolectadas de un sujeto en dos o más puntos de tiempo. Además, una característica puede ser la diferencia o relación de la abundancia de dos o más biomarcadores de una muestra biológica obtenida de un sujeto en un único punto de tiempo. Un perfil de biomarcador también puede comprender al menos tres, cuatro, cinco, 10, 20, 30 o más características. En una realización, un perfil de biomarcador comprende cientos, o aún miles, de características.

Un "cambio fenotípico" es un cambio detectable en un parámetro asociada a un estado dado del sujeto. Por ejemplo, un cambio fenotípico puede incluir un incremento o disminución de un biomarcador en un fluido corporal, donde el cambio está asociado a SIRS, sepsis, la aparición de sepsis o a una etapa particular en el avance de sepsis. Un cambio fenotípico además puede incluir un cambio en un aspecto detectable de un estado dado del sujeto que no es un cambio en un aspecto medible de un biomarcador. Por ejemplo, un cambio en el fenotipo puede incluir un cambio detectable en la temperatura corporal, ritmo de respiración, pulso, presión sanguínea, u otro parámetro fisiológico. Dichos cambios pueden determinarse a través de una observación clínica y medición mediante la utilización de técnicas convencionales que son bien conocidas para el técnico experto.

Una "regla de decisión" es un método utilizado para evaluar los perfiles de biomarcadores. Dichas reglas de decisión pueden tomar una o más formas que son conocidas en la técnica, según lo que se ejemplifica en Hastie et al., 2001, *The Elements of Statistical Learning*, Springer Verlag, Nueva York. Una regla de decisión puede utilizarse para actuar sobre un conjunto de datos de características para, *inter alia*, predecir la aparición de sepsis, para determinar el avance de sepsis, o para diagnosticar sepsis. Las reglas de decisión ejemplares que pueden utilizarse en algunas realizaciones de la presente invención se describen en mayor detalle en la Sección 5.5, más abajo.

"Predecir el desarrollo de sepsis" es una determinación en cuanto a si el sujeto desarrolla sepsis. Dicha predicción está limitada por la exactitud de los medios utilizados para tomar esta determinación. La presente invención proporciona un método, por ejemplo, mediante la utilización de una regla/s de decisión, para tomar esta determinación con una exactitud que es 60% o mayor. Según lo utilizado en la presente memoria, los términos "predecir el desarrollo de sepsis" y "predecir sepsis" son intercambiables. En algunas realizaciones, el acto de predecir el desarrollo de sepsis (predecir sepsis) se logra mediante la evaluación de uno o más perfiles de biomarcadores de un sujeto mediante la utilización de una regla de decisión que sea indicativa del desarrollo de sepsis y, como resultado de esta evaluación, mediante la recepción de un resultado de la regla de decisión que indica que el sujeto se volverá séptico. Dicha evaluación de uno o más perfiles de biomarcadores de un sujeto de ensayo mediante la utilización de una regla de decisión utiliza una o todas las características en uno o más perfiles de biomarcadores para obtener dicho resultado.

Según lo utilizado en la presente memoria, una "población de entrenamiento" es un conjunto de muestras de una población de sujetos utilizados para construir una regla de decisión, mediante la utilización de un algoritmo de análisis de datos, para la evaluación del perfil de biomarcadores de sujetos en riesgo de desarrollar sepsis. En una realización preferible, una población de entrenamiento incluye muestras de sujetos que son convertidores y sujetos que son no convertidores.

Según lo utilizado en la presente memoria, un "algoritmo de análisis de datos" es un algoritmo utilizado para construir una regla de decisión mediante la utilización de perfiles de biomarcadores de sujetos en una población de entrenamiento. Los algoritmos de análisis de datos representativos se describen en la Sección 5.5. Una "regla de decisión" es el producto final de un algoritmo de análisis de datos, y se caracteriza por uno o más conjuntos de valores, donde cada uno de estos conjuntos de valores es indicativo de un aspecto de SIRS, la aparición de sepsis,

sepsis, o una predicción de que un sujeto adquirirá sepsis. En un ejemplo específico, un conjunto de valores representa una predicción de que un sujeto desarrollará sepsis. En otro ejemplo, un conjunto de valores representa una predicción de que un sujeto no desarrollará sepsis.

Según lo utilizado en la presente memoria, un "conjunto de valores" es una combinación de valores, o intervalos de valores para las características en un perfil de biomarcador. La naturaleza de este conjunto de valores y los valores en el mismo depende del tipo de características presentes en el perfil de biomarcador y el algoritmo de análisis de datos utilizado para construir la regla de decisión que impone el conjunto de valores. Por ejemplo, puede obtenerse un perfil de biomarcador de cada miembro de una población de entrenamiento. Cada uno de dicho perfil de biomarcador incluye una característica medida para cada biomarcador. Estos valores de características pueden ser utilizados por un algoritmo de análisis de datos para construir una regla de decisión. El algoritmo de análisis de datos puede ser un árbol de decisión, descrito más abajo. Una regla de decisión define conjuntos de valores. Uno de dicho conjunto de valores predice la aparición de sepsis. Un sujeto cuyos valores de características de biomarcadores satisfacen este conjunto de valores posiblemente se volverá séptico. Por ejemplo, un conjunto de valores puede comprender la cantidad de biomarcador A siendo menor que un primer valor y la cantidad de biomarcador B siendo menor que un segundo valor. Otro conjunto de valores predice un estado libre séptico. Un sujeto cuyos valores de características de biomarcadores satisfacen este conjunto de valores no es posible que se vuelva séptico. Un conjunto de valores ejemplar de esto podría comprender el biomarcador A siendo mayor que el primer valor y el biomarcador B siendo mayor que un tercer valor.

Cuando el algoritmo de análisis de datos es un análisis de red neuronal y el producto final de este análisis de red neuronal es una red neuronal adecuadamente ponderada, un conjunto de valores es aquellos intervalos de valores de características de perfil de biomarcador que harán que la red neuronal ponderada indique que la aparición de sepsis es probable. Otro conjunto de valores es aquellos intervalos de valores de características de perfil de biomarcador que harán que la red neuronal ponderada indique que la aparición de sepsis no es probable.

"Prevenir" o "prevención" se refiere a una reducción en el riesgo de adquirir una enfermedad o trastorno (*es decir*, hacer que al menos uno de los síntomas clínicos la enfermedad no se desarrolle en un sujeto que puede estar expuesto o predispuesto para la enfermedad pero aún no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad). Preferiblemente, la prevención se refiere al uso de un compuesto o composición en un sujeto aún no afectado por la enfermedad o trastorno o que aun no exhibe un síntoma de la enfermedad o trastorno, por ejemplo un sujeto aún no infectado o que aún no exhibe los síntomas de la infección.

"Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere a, en una realización, aliviar la enfermedad o trastorno (es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma) que existe en un sujeto. En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar al menos un parámetro físico, que puede ser imperceptible por el sujeto. Aún en otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno, físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma perceptible) o fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos. Aún en otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a retrasar la aparición de la enfermedad o trastorno.

El término "etiqueta" se refiere a una muestra de material escrito, impreso o gráfico en el envase inmediato d un artículo, por ejemplo el material escrito mostrado en un vial que contiene un agente farmacéuticamente activo.

El término "etiquetado" se refiere a todas las etiquetas y otro material escrito, impreso o gráfico en cualquier artículo o cualquiera de sus envases o envoltorios o que acompaña dicho artículo, por ejemplo, un prospecto o audio de instrucciones o videos, por ejemplo cintas de vídeo o DVDs, que acompañan o están asociados a un envase de un agente farmacéuticamente activo.

"Alilo" se refiere a un radical $-C(O)R$, donde R es alquilo.

"Alquilo," por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se establezca lo contrario, un radical de hidrocarburo de cadena ramificada o lineal que puede ser completamente saturado, mono o poliinsaturado, que posee el número de átomos de carbono designado (es decir, C_1-C_{22} significa uno a veintiún carbonos). Los ejemplos de radicales de hidrocarburo saturado incluyen grupos tales como etilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que posee uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butenilo, y los homólogos e isómeros.

"Sal fisiológicamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto progenitor. Dichas sales incluyen: (1) sales de adición ácida formadas con ácidos orgánicos o inorgánicos tales como ácido hidrocórico, hidrobromico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, tricloroacético, propiónico, hexanoico, ciclopentilpropiónico, glicólico, glutárico, pirúvico, láctico, malónico, succínico, sórbico, ascórbico, málico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, picrico, cinnamico, mandelico, ftálico, laurico, metanosulfónico,

etanosulfónico, 1,2-etano-disulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, 2-naftalenosulfónico, 4-toluenosulfónico, canfórico, canfórsulfónico, 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-ene-1-carboxílico, glucoheptónico, 3-fenilpropiónico, trimetilacético, *tert*-butilacético, lauril sulfúrico, glucónico, benzoico, glutámico, hidroxinaftoico, salicílico, esteárico, muconico y ácidos similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto progenitor (a) es reemplazado por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion alcalino térreo o un ion de aluminio, o hidróxidos de metal alcalino o alcalino térreo, tales como hidróxido de sodio, potasio, calcio, magnesio, y bario, amoníaco o (b) se coordina con una base orgánica, tal como aminas orgánicas aromáticas, alifáticas o alicíclicas, tales como metilamina, dimetilamina, dietilamina, picolina, etanolamina, danolamina, trietanolamina, N-metilglucamina y similares.

Las sales además incluyen, a modo de ejemplo solamente, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares, y cuando el compuesto contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicas, tales como hidrocloreuro, hidrobromuro, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares. El término "catión fisiológicamente aceptable" se refiere a un contraion catiónico fisiológicamente aceptable, no tóxico de un grupo funcional ácido. Dichos cationes son ejemplificados por cationes de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio y tetraalquilamonio y similares.

"Solvato" se refiere a un compuesto de la presente invención o una sal del mismo, que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes. Donde el disolvente es agua, el solvato es un hidrato.

Debe entenderse que los compuestos que poseen la misma fórmula molecular pero difieren en la naturaleza o secuencia de unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos en espacio son denominados "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros".

Los estereoisómeros que no son imágenes espejo una de otra se denominan "diastereómeros" y aquellos que son imágenes espejo no superponibles una de otra se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto posee un centro asimétrico, por ejemplo, cuando está unido a cuatro grupos diferentes, un par de enantiómeros es posible. Un enantiómero puede caracterizarse por la configuración absoluta de su centro asimétrico y es designado (R) o (S) de acuerdo a las reglas de Cahn and Prelog (Cahn et al., 1966, Angew. Chem. 78: 413-447, Angew. Chem., Int. Ed Engl. 5: 385-414 (errata: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 5: 511); Prelog and Helmchen, 1982, Angew. Chem. 94:614-631, Angew. Chem. Internal. Ed. Engl. 21:567-583; Mata and Lobo, 1993, Tetrahedron: Asymmetry 4: 657-668) o puede caracterizarse por la manera en la que la molécula rota el plano de luz polarizada y se designa dextrorrotatorio o levorotatorio (es decir, como isómeros (+)- o (-)-, respectivamente). Un compuesto quiral puede existir como enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que contiene proporciones iguales de enantiómeros se denomina una "mezcla racémica".

En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden poseer uno o más centro asimétricos; dichos compuestos por ello pueden producirse como (R)- o (S)-enantiómeros individuales o como una mezcla de los mismos. A menos que se indique lo contrario, por ejemplo por designación de estereoquímica en cualquier posición de una fórmula, la descripción o nombre de un compuesto particular en la especificación y reivindicaciones tiene como objeto incluir ambos enantiómeros individuales y mezclas, racémicas o no, de los mismos. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y separación de los estereoisómeros son bien conocidos en la técnica. En realizaciones particulares, la presente invención proporciona los estereoisómeros de los compuestos representados en la presente memoria en el tratamiento con base.

Realizaciones de la invención

La presente invención permite el diagnóstico o pronóstico rápido y exacto de una afección inflamatoria sistémica mediante la evaluación de la lisofosfatidilcolina en un sujeto. Las cantidades de lisofosfatidilcolina pueden ser construidas a partir de una o más muestras biológicas de sujetos en un único punto de tiempo ("instantáneo"), o múltiples puntos de tiempo, durante el transcurso de tiempo en que el sujeto está en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria sistémica. En forma ventajosa, la afección inflamatoria sistémica puede ser diagnosticada o prevista previo a la aparición de síntomas clínicos convencionales, lo que permite de tal modo la intervención terapéutica más efectiva.

Sujetos

En ciertas realizaciones de la invención, el sujeto es un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate no humano. En las realizaciones mucho más preferibles, el sujeto es un ser humano.

Aunque los métodos de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica en cualquier sujeto, particularmente los sujetos útiles incluyen aquellos que están en riesgo de la afección inflamatoria sistémica. El sujeto puede estar en riesgo de la afección inflamatoria sistémica de acuerdo a cualquier criterio conocido para el practicante con experiencia en la técnica.

En ciertas realizaciones, el sujeto es SIRS negativo. En el contexto de la presente invención, los sujetos SIRS negativos incluyen sujetos saludables que, por cualquier motivo de acuerdo al juicio del practicante de la técnica,

necesitan el diagnóstico o pronóstico de sepsis. Dichos sujetos incluyen, pero no se limitan a, pacientes SIRS negativos en unidades de cuidado intensivo hospitalario y sujetos situados en forma similar. Los métodos de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de SIRS, sepsis, sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad. Otros métodos de la invención pueden utilizarse para monitorear un tratamiento o prevención para el riesgo incrementado o disminuido de SIRS, sepsis, sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad. En realizaciones particulares, el sujeto es un paciente que podría estar en riesgo de una afección inflamatoria sistémica, tal como un paciente de una unidad de cuidados intensivos.

En otras realizaciones, el sujeto es SIRS positivo. Los métodos de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de sepsis, sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad, o pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de la conversión en SIRS negativo. Otros métodos de la invención pueden utilizarse para monitorear un tratamiento o prevención para el riesgo incrementado o disminuido de sepsis, sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad, o para monitorear la conversión posible en SIRS negativo.

En otras realizaciones, el sujeto posee sepsis. Los métodos de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad, o pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de conversión en SIRS positivo (y sepsis negativo) o conversión en SIRS negativo. Otros métodos de la invención pueden utilizarse para monitorear un tratamiento o prevención para el riesgo incrementado o disminuido de sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad, o para monitorear la posible conversión en SIRS positivo (y sepsis negativo) o conversión en SIRS negativo.

En otras realizaciones, el sujeto posee sepsis severa. Los métodos de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad, o pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de conversión en sepsis o en SIRS positivo (y sepsis negativo) o en SIRS negativo. Otros métodos de la invención pueden utilizarse para monitorear un tratamiento o prevención para el riesgo incrementado o disminuido de choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad, o para monitorear la posible conversión en sepsis o en SIRS positivo (y sepsis negativo) en SIRS negativo.

En otras realizaciones, el sujeto posee choque séptico. Los métodos de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de disfunción múltiple de órganos o mortalidad, o pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de conversión en sepsis severa, en sepsis, en SIRS positivo (y sepsis negativo) o en SIRS negativo. Otros métodos de la invención pueden utilizarse para monitorear un tratamiento o prevención para el riesgo incrementado o disminuido de disfunción múltiple de órganos o mortalidad, o para monitorear la posible conversión en sepsis severa, en sepsis, en SIRS positivo (y sepsis negativo) o en SIRS negativo.

En otras realizaciones, el sujeto posee disfunción múltiple de órganos. Los métodos de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de mortalidad, o pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de conversión en choque séptico, sepsis severa, en sepsis, en SIRS positivo (y sepsis negativo) o en SIRS negativo. Otros métodos de la invención pueden utilizarse para monitorear un tratamiento o prevención para el riesgo incrementado o disminuido de mortalidad, o para monitorear la posible conversión en choque séptico, sepsis severa, en sepsis, en SIRS positivo (y sepsis negativo) o en SIRS negativo.

En realizaciones preferibles, el sujeto es SIRS negativo (*es decir* el sujeto puede ser saludable) pero necesita el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica de acuerdo al criterio de un practicante con experiencia en la técnica. El sujeto podría ser, por ejemplo, un paciente en una unidad de cuidados intensivos. De manera similar, en realizaciones preferibles, los sujetos son SIRS negativo, y se utilizan los métodos de la invención para monitorear la prevención de una afección inflamatoria sistémica. Por ejemplo, en un sujeto SIRS negativo considerado en riesgo de una afección inflamatoria sistémica, por ejemplo de acuerdo a un método de la invención, un curso de intervención podría ser administrado al sujeto para prevenir una afección inflamatoria sistémica. Dicha prevención de una afección inflamatoria sistémica puede monitorearse con un método de la invención.

En otras realizaciones preferibles, los sujetos son SIRS positivo, y se utilizan los métodos de la invención para el diagnóstico o pronóstico de otra afección inflamatoria sistémica. De manera similar, en realizaciones preferibles, los sujetos son SIRS positivo, y se utilizan los métodos de la invención para monitorear el tratamiento de SIRS o prevención de otra afección inflamatoria sistémica. Por ejemplo, en un sujeto SIRS positivo considerado en riesgo de otra afección inflamatoria sistémica, por ejemplo de acuerdo a un método de la invención, un curso de intervención podría ser administrado al sujeto para prevenir la afección inflamatoria sistémica. Dicha prevención de la afección inflamatoria sistémica puede monitorearse con un método de la invención.

En realizaciones específicas de la invención, los sujetos en riesgo de desarrollar sepsis o SIRS son seleccionados mediante la utilización de los métodos de la invención. En conformidad con estas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden emplearse para seleccionar, por ejemplo, sujetos admitidos en una unidad de cuidados intensivos y/o aquellos que han experimentado alguna clase de trauma (tal como, por ejemplo, cirugía, accidente vehicular, herida de disparo, etc.).

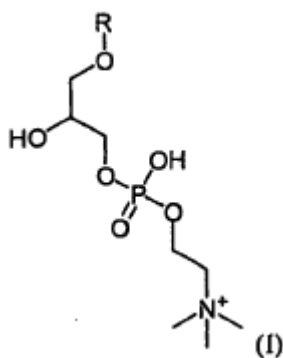
En realizaciones específicas, un sujeto se selecciona mediante la utilización los métodos y composiciones de la

invención tan frecuentemente como sea necesario (por ejemplo, durante su estadía en una unidad de cuidados intensivos) para el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica. En una realización preferible, el sujeto se selecciona pronto después de su llegada en una unidad de cuidados intensivos. En algunas realizaciones, el sujeto se selecciona diariamente después de que llegan a una unidad de cuidados intensivos. En algunas realizaciones, el sujeto se selecciona cada 1 a 8 horas, 8 a 12 horas, 12 a 16 horas, o 16 a 24 horas después de que llegan a una unidad de cuidados intensivos.

Lisofosfatidilcolina total

En un aspecto, la presente invención proporciona pronóstico o diagnóstico de una afección inflamatoria sistémica en base a la lisofosfatidilcolina total.

En ciertas realizaciones, la lisofosfatidilcolina total en una muestra de un sujeto se utiliza para el pronóstico o diagnóstico de la afección inflamatoria sistémica. La lisofosfatidilcolina total se refiere a una cantidad que corresponde a toda la lisofosfatidilcolina (libre o unida o ambos) en la muestra. Por ejemplo, la lisofosfatidilcolina total puede referirse a aquellas moléculas en la muestra que son en conformidad con la fórmula (I):



o cualquier sal o solvato del mismo, donde R es cualquier grupo acilo. El grupo acilo puede ser cualquier grupo acilo conocido para aquellos expertos en la técnica. Los grupos acilo ejemplares incluyen caproilo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, palmitoleilo, oleilo, araquidonilo y linoleilo. Preferiblemente, la lisofosfatidilcolina total incluye al menos 1-O-palmitoil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina y 1-O-estearoil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina. En las realizaciones típicas, la lisofosfatidilcolina total se mide sin importar la identidad del grupo acilo. Las técnicas útiles se describen en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, la lisofosfatidilcolina total sola se utiliza para el pronóstico o diagnóstico de la afección inflamatoria sistémica. En otras realizaciones, uno o más biomarcadores adicionales se utilizan para el pronóstico o diagnóstico de la afección inflamatoria sistémica. En otras realizaciones, una o más mediciones clínicas se utilizan adicionalmente para el pronóstico o diagnóstico de la afección inflamatoria sistémica. En ciertas realizaciones, uno o más biomarcadores adicionales y una o más mediciones clínicas se utilizan adicionalmente para el pronóstico o diagnóstico de la afección inflamatoria sistémica.

El practicante con experiencia puede utilizar cualquier técnica para medir o indicar la lisofosfatidilcolina total en una muestra. En ciertas realizaciones, el practicante con experiencia puede medir una cantidad o valor a partir de una muestra que se correlaciona con la lisofosfatidilcolina total. Por ejemplo, en ciertas muestras de sujetos, una fracción de lisofosfatidilcolina total puede estar libre de otras moléculas mientras otra fracción de lisofosfatidilcolina total puede estar unida por otras moléculas. Por ejemplo, una fracción de lisofosfatidilcolina total puede estar unida por albúmina. Las técnicas de preparación y medición de muestras utilizadas por el practicante con experiencia pueden afectar la cantidad de lisofosfatidilcolina realmente medida. Por ejemplo, las técnicas de precipitación y/o purificación pueden separar la lisofosfatidilcolina libre y unida. Las técnicas de detección podrían ser más sensibles a la lisofosfatidilcolina libre o a la lisofosfatidilcolina unida. Esta cantidad medida puede correlacionarse con la cantidad de lisofosfatidilcolina total en la muestra de acuerdo a métodos disponibles para el practicante con experiencia. En ciertas realizaciones, una medición de lisofosfatidilcolina libre se utiliza para indicar la cantidad de lisofosfatidilcolina total en la muestra. En ciertas realizaciones, una medición de lisofosfatidilcolina unida se utiliza para indicar la cantidad de lisofosfatidilcolina total en la muestra. En ciertas realizaciones, una medición de lisofosfatidilcolina libre y unida se utiliza para indicar la cantidad de lisofosfatidilcolina total en la muestra. En ciertas realizaciones, la lisofosfatidilcolina libre puede utilizarse para el pronóstico o diagnóstico en los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, la lisofosfatidilcolina unida puede utilizarse para el pronóstico o diagnóstico en los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, la lisofosfatidilcolina libre y unida pueden utilizarse para el pronóstico o diagnóstico en los métodos de la invención.

Cada biomarcador adicional puede ser cualquier tipo de biomarcador para una afección inflamatoria sistémica conocido para aquellos expertos en la técnica que incluye biomarcadores de proteína, péptido, ácido nucleico, lípido, fosfolípido y metabolito (por ejemplo, proteína, péptido, ácido nucleico, nucleósido, lípido o fosfolípido, metabolito).

Otros biomarcadores ejemplares para el pronóstico o diagnóstico de una afección inflamatoria sistémica, y los métodos para su evaluación, se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense N° 20030194752, 20040096917, 20040097460, 20040106142, 20040157242, y Solicitud Provisional Estadounidense N° 60/671.620, presentada el 15 de abril de 2005, 60/671.941, presentada el 15 de abril de 2005, y 60/674.046, presentada el 22 de abril de 2005. Otros biomarcadores ejemplares para sepsis incluyen endotoxina; ADN bacteriano; proteínas de fase aguda tales como proteína C, procalcitonina, proteína de unión a LBP - LPS; factores de coagulación tales como productos de degradación de fibrina, antitrombina III, dímero D; marcadores de célula de membrana tales como HLA- DR, CD-64, E-selectina; hormonas tales como cortisol, ACTH; receptores solubles tales como CD-14, sTNFRI, sTNF-RII; y citoquinas tales como TNF, IL- 6, IL-8 y IL- 10; y otros tales como D-dímero, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, inhibidor-1 activador de plasminógeno, trombosmodulina soluble, IL-6, IL-10, IL-8, proteína C, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina, proteína S, antitrombina, TNF- α . Véase, por ejemplo, Kinasewitz et al., 2004, Critical Care 8: R82-R90, Bozza et al., 2005, Mem Inst. Oswaldo Cruz 100 (s)1:217-221, los contenidos de los que se incorporan por la presente por referencia en su totalidad. Los biomarcadores preferibles incluyen proteína reactiva C, procalcitonina y IL-6.

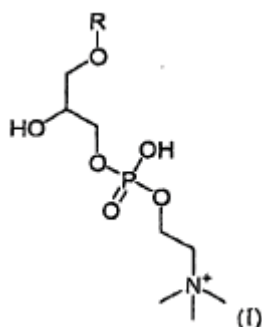
En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para evaluar un panel de biomarcadores de un sujeto para el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica. El panel puede comprender cualquier número de biomarcadores suficiente para llevar a cabo un diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica de acuerdo al criterio de uno con experiencia en la técnica. El panel debe comprender la lisofosfatidilcolina total. El panel adicionalmente puede comprender otros biomarcadores para la afección inflamatoria sistémica, que incluyen aquellos descritos en el párrafo anterior. En algunas realizaciones, el panel comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 o más biomarcadores para la afección inflamatoria sistémica. Cada biomarcador debe evaluarse mediante técnicas apropiadas para la clase de biomarcador. Las técnicas ejemplares se describen en la presente memoria, y otras técnicas deben ser evidentes para aquellos expertos en la técnica. En realizaciones convenientes, los biomarcadores de la misma clase, o biomarcadores que pueden ser evaluados por la misma técnica, pueden ser evaluados juntos en el panel. Por ejemplo, en una realización particular, los biomarcadores metabolito y/o proteína pueden ser evaluados mediante técnicas de inmunoensayo en un arreglo o formato de chip, según lo que se describe más abajo.

La medición clínica para la afección inflamatoria sistémica puede ser cualquier medición clínica para la afección inflamatoria sistémica conocida para aquellos expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la medición clínica es de acuerdo a un modelo de severidad clínica para sepsis. Dichos modelos incluyen, pero no se limitan a, la puntuación de Evaluación de Salud Crónica y Fisiología Aguda (APACHE, y sus mejoras APACHE II y III) (Knaus et al., 1985, Crit Care Med 13: 818-829; Knaus et al., 1991, Chest 100: 1619-1636), el Modelo de Predicción de Mortalidad (MPM) (Lemeshow et al., 1993, JAMA 270: 2957-2963), la puntuación de Fisiología Aguda Simplificada (SAPS) (Le Gall et al., 1984, Crit Care Med 12: 975-977), la puntuación de Disfunción Múltiple de Órganos (MODS) (Marshall et al., 1995, Crit Care Med 23: 1638-1652), la puntuación de Evaluación de Falla de Órganos Secuencial (SOFA) (Ferreira et al., 2002, JAMA 286: 1754-1758), la Puntuación Logística de Disfunción de Órganos (LODS) (Le Gall et al., 1996, JAMA 276: 802-810) y el concepto de predisposición, infección, respuesta, y disfunción de órganos (PIRO) (Levy et al., 2003, Intensive Care Med 29: 530-538). En ciertas realizaciones, la medición clínica comprende una o más mediciones utilizadas por aquellos expertos en la técnica para ayudar en el pronóstico o diagnóstico de sepsis. Dichas mediciones incluyen, pero no se limitan a, temperatura, ritmo cardíaco, recuento de glóbulos blancos en sangre, recuento diferencial de glóbulos blancos en sangre (monocitos, linfocitos, granulocitos y/o neutrófilos), relación de neutrófilo inmaduro y neutrófilo total, recuento de plaquetas, creatinina sérica, urea, lactato, exceso de bases, pO₂ y HCO₃⁻.

Biomarcador

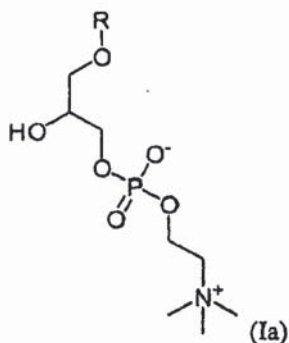
En otro aspecto, la presente invención proporciona el pronóstico o diagnóstico de una afección inflamatoria sistémica con un biomarcador de lisofosfatidilcolina de la invención.

En ciertas realizaciones, el biomarcador es una 1-O-acil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfolcolina. Por ejemplo, en ciertas realizaciones el biomarcador es un compuesto en conformidad con la fórmula (I):



o cualquier sal o solvato del mismo, donde R es un grupo acilo.

Las sales ejemplares de la fórmula (I) son proporcionadas por la fórmula (Ia):



donde dicha sal puede estar coordinada con cualquier ion o iones conocidos para aquellos expertos en la técnica. El ion o iones pueden ser fisiológicos pero no necesitan ser fisiológicos. Por ejemplo, el ion o ion puede resultar del contacto con la sal durante la preparación de la muestra del sujeto, según lo que se describe más abajo. En algunas realizaciones, la sal está coordinada con un anión, por ejemplo, un anión fisiológico conocido para aquellos expertos en la técnica. Los aniones ejemplares incluyen cloruro, bromuro, fosfato, acetato, carbonato, bicarbonato y sulfato. En algunas realizaciones, la sal está coordinada con un catión, por ejemplo, un catión fisiológico, conocido para aquellos expertos en la técnica. Los cationes ejemplares incluyen sodio, potasio, calcio, magnesio y amonio. En algunas realizaciones, tal como será reconocido por aquellos expertos en la técnica, la sal está coordinada con uno o más aniones y con uno o más cationes.

El grupo acilo puede ser cualquier grupo acilo conocido para aquellos expertos en la técnica. En ciertas realizaciones el grupo acilo es saturado. Los grupos acilo saturados incluyen caproilo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo y estearoilo. En otras realizaciones, el grupo acilo es monoinsaturado. Los grupos acilo monoinsaturados incluyen palmitoleilo y oleilo. En otras realizaciones, el grupo acilo es poliinsaturado. Los grupos acilo poliinsaturados incluyen araquidonilo y linoleilo.

Más sistemáticamente, en ciertas realizaciones, el grupo acilo es acilo C₁₀-C₂₂. En ciertas realizaciones, el grupo acilo es acilo C₁₄-C₂₂. Los grupos acilo ejemplares incluyen 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 20:4(n-6) y 22:6(n-3), de acuerdo a la nomenclatura familiar para aquellos expertos en la técnica. En dicha nomenclatura, el primer número indica el número de átomos de carbono en el grupo acilo, y el segundo número indica el número de enlaces dobles en el grupo. Por ejemplo, "18:1" indica un grupo acilo con 18 átomos de carbono y un enlace doble. Los números en paréntesis, si los hubiere, indican la ubicación del enlace doble, y la nota "(n-x)" indica un enlace doble x posiciones lejos del metilo terminal de la cadena más larga del ácido graso. Véase Biochem. J., 1978, 171, 21-35; Chem. Phys. Lipids, 1978, 21, 159-173; Eur. J. Biochem., 1977, 79, 11-21; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1977, 358, 617-631; J. Lipido Res., 1978, 19, 114-128; Lipids, 1977, 12, 455-468; Mol. Cell. Biochem., 1977, 17, 157-171; Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2ª edición, Portland Press, 1992, páginas 180-190.

En ciertas realizaciones, el grupo acilo es acilo C₁₄-C₂₂. En ciertas realizaciones, el grupo acilo es acilo C₁₆-C₂₀. En otras realizaciones, el grupo acilo es acilo C₁₆-C₁₈. En ciertas realizaciones, el grupo acilo es hexadecanoilo u octadecanoilo. En realizaciones particulares, el grupo acilo es acilo C₁₆. En una realización preferible, el grupo acilo es hexadecanoilo. En otras realizaciones particulares, el grupo acilo es acilo C₁₈. En una realización preferible, el grupo acilo es octadecanoilo.

El biomarcador puede ser cualquier forma del biomarcador del sujeto, por ejemplo cualquier sal o solvato del biomarcador que puede ser identificado por aquellos expertos en la técnica. En realizaciones preferibles, el biomarcador está en forma de una sal de sodio.

En ciertas realizaciones, el biomarcador es un metabolito de un compuesto en conformidad con la fórmula (I). Por ejemplo, el biomarcador puede ser un precursor de un compuesto en conformidad con la fórmula (I) conocido para aquellos expertos en la técnica. El precursor puede ser una o dos o tres, o en algunas realizaciones más, etapas previas al compuesto en conformidad con la fórmula (I) en una vía biosintética conocida para aquellos expertos en la técnica. En otras realizaciones, el biomarcador puede ser un metabolito en dirección 3' de un compuesto en conformidad con la fórmula (I) en una vía biosintética conocida para aquellos expertos en la técnica. El metabolito en dirección 3' puede ser una o dos o tres, o en algunas realizaciones más, etapas después del compuesto en conformidad con la fórmula (I) en una vía biosintética conocida para aquellos expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la vía biosintética es una vía de novo para la síntesis del factor activador de plaquetas conocido para aquellos expertos en la técnica. En otras realizaciones, la vía biosintética es una vía de remodelación para la síntesis del factor activador de plaquetas conocido para aquellos expertos en la técnica.

En realizaciones particulares, el metabolito es una 1-O-acil-2-O-acil-*sn*-glicero-3-fosfolina. En realizaciones preferibles, el grupo 2-O-acilo es cualquier grupo acilo descrito más arriba o acetilo. En realizaciones particulares, el metabolito es una 1-O-acil-2-O-alkil-*sn*-glicero-3-fosfolina. En realizaciones preferibles, el grupo 2-O-alkilo es cualquier grupo conocido para aquellos expertos en la técnica para modificar una glicero-3-fosfolina, por ejemplo cualquier alquilo C₁₄-C₂₂.

En ciertas realizaciones, un único biomarcador se utiliza para el pronóstico o diagnóstico de la afección inflamatoria sistémica. En otras realizaciones, una pluralidad de biomarcadores se utiliza para el pronóstico o diagnóstico de la afección inflamatoria sistémica. Los biomarcadores en la pluralidad pueden ser de acuerdo a la invención según lo que se describe más arriba, o la pluralidad puede comprender biomarcadores de acuerdo a la invención junto con otros biomarcadores para el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica conocidos para aquellos expertos en la técnica. El biomarcador puede ser cualquier tipo de biomarcador para una afección inflamatoria sistémica conocido para aquellos expertos en la técnica que incluye los biomarcadores proteína, péptido, ácido nucleico, lípido, fosfolípido y metabolito (*por ejemplo*, proteína, péptido, ácido nucleico, nucleósido, lípido o fosfolípido metabolito).

Otros biomarcadores ejemplares para el pronóstico o diagnóstico de una afección inflamatoria sistémica, y métodos para su evaluación, se describen en la Publicación de Patente Estadounidense N° 20030194752, 20040096917, 20040097460, 20040106142, 20040157242, y Solicitud Provisional Estadounidense N°60/671.620, presentada el 15 de abril de 2005, 60/671.941, presentada el 15 de abril de 2005, y 60/67.046, presentada el 22 de abril de 2005. Otros biomarcadores ejemplares para sepsis incluyen endotoxina; ADN bacteriano; proteínas de fase aguda tales como proteína C, procalcitonina, proteína de unión a LBP - LPS; factores de coagulación tales como productos de degradación de fibrina, antitrombina III, dímero D; marcadores de célula de membrana tales como HLA-DR, CD-64, E-selectina; hormonas tales como cortisol, ACTH; receptores solubles tales como CD-14, sTNFRI, sTNF-RII; y citoquinas tales como TNF, IL- 6, IL-8 y IL-10; y otros tales como D-dímero, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, inhibidor-1 activador de plasminógeno, trombosmodulina soluble, IL-6, IL-10, IL-8, proteína C, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina, proteína S, antitrombina, TNF- α , Véase, *por ejemplo*, Kinasewitz et al., 2004, Critical Care 8:R82-R90, Bozza et al., 2005, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100(s)1:217-221. Los biomarcadores preferibles incluyen proteína reactiva C, procalcitonina y IL-6.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para evaluar un panel de biomarcadores de un sujeto para el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica. El panel puede comprender cualquier número de biomarcadores suficiente para llevar a cabo un diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica de acuerdo al criterio de uno con experiencia en la técnica. El panel debe comprender uno o más biomarcadores de la invención, *por ejemplo*, un biomarcador en conformidad con la fórmula I o fórmula Ia. El panel adicionalmente puede comprender otros biomarcadores para la afección inflamatoria sistémica, que incluyen aquellos descritos en el párrafo anterior. En algunas realizaciones, el panel comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 o más biomarcadores para la afección inflamatoria sistémica. Cada biomarcador debe evaluarse mediante técnicas apropiadas para la clase de biomarcador. Las técnicas ejemplares se describen en la presente memoria, y otras técnicas deben ser evidentes para aquellos expertos en la técnica. En realizaciones convenientes, los biomarcadores de la misma clase, o biomarcadores que pueden ser evaluados mediante la misma técnica, pueden ser evaluados juntos en el panel. *Por ejemplo*, en una realización particular, los biomarcadores metabolito y/o proteína pueden ser evaluados mediante técnicas de inmunoensayo en un arreglo o formato de chip, según lo que se describe más abajo.

Medición de la lisofosfatidilcolina

En esta sección y las secciones que siguen, a menos que se especifique lo contrario, el término lisofosfatidilcolina se refiere a la lisofosfatidilcolina total o a un biomarcador de lisofosfatidilcolina de la invención.

En ciertas realizaciones de la invención, el método para medir la lisofosfatidilcolina no es crítico. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica que comprende la única etapa de evaluar el riesgo de la afección inflamatoria sistémica a partir de lisofosfatidilcolina.

La lisofosfatidilcolina total puede ser medida por uno que practique un método de la invención en cualquier manera que fuere. Las técnicas ejemplares se describen en la presente memoria. Según lo que se describe más arriba, cualquier técnica que indica lisofosfatidilcolina en la muestra puede utilizarse en los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, los métodos son en base a la lisofosfatidilcolina libre en la muestra. En ciertas realizaciones, los métodos son en base a la lisofosfatidilcolina unida en la muestra. En ciertas realizaciones, los métodos son en base a la lisofosfatidilcolina libre y unida en la muestra.

La cantidad de un biomarcador de lisofosfatidilcolina puede ser medida por uno que practique un método de la invención en cualquier manera que fuere. Las técnicas ejemplares se describen en la presente memoria.

Cuando una pluralidad o panel de biomarcadores debe evaluarse, cada biomarcador individual debe evaluarse de acuerdo a una técnica apropiada para ese biomarcador. En realizaciones ventajosas, los biomarcadores que pueden ser evaluados mediante la misma técnica o mediante técnicas compatibles pueden ser evaluados juntos. *Por*

ejemplo, los biomarcadores proteína, péptido, lípido, fosfolípido y metabolito que pueden ser evaluados mediante inmunoensayos pueden ser evaluados juntos o en grupos de acuerdo a técnicas conocidas para aquellos expertos en la técnica.

5 En una realización, solamente una única muestra biológica tomada en un único punto en el tiempo del sujeto se utiliza para realizar un pronóstico o diagnóstico de sepsis. En otra realización, una pluralidad de muestras biológicas tomadas en diferentes puntos en el tiempo del sujeto se utilizan para realizar un pronóstico o diagnóstico de sepsis.

10 En una realización específica, la cantidad de lisofosfatidilcolina se obtiene mediante la utilización de muestras recolectadas del sujeto en un punto de tiempo. En otra realización específica, la cantidad de lisofosfatidilcolina se obtiene mediante la utilización de muestras obtenidas del sujeto en puntos de tiempo separados. En un ejemplo, estas muestras se obtienen del sujeto una vez o, alternativamente, en forma diaria, o más frecuentemente, por ejemplo, cada 2, 3, 4, 6, 8 o 12 horas.

15 La lisofosfatidilcolina puede obtenerse de cualquier muestra biológica, que puede ser, a modo de ejemplo y no como limitación, sangre, plasma, suero, saliva, esputo, orina, fluido espinal cerebral, células, un extracto celular, una muestra tisular, una biopsia tisular, una muestra de heces o cualquier muestra que pueda obtenerse de un sujeto mediante la utilización de técnicas bien conocidas para aquellos expertos en la técnica. La muestra biológica precisa que es tomada del sujeto puede variar, pero la toma de muestra preferiblemente es mínimamente invasiva y se realiza fácilmente mediante técnicas convencionales.

20 La muestra biológica puede ser procesada o purificada de acuerdo al criterio de aquellos expertos en la técnica en base a, por ejemplo, el tipo de biomarcador y la técnica de medición. Por ejemplo, cuando el biomarcador es un lípido o fosfolípido metabolito, la muestra puede ser procesada mediante extracción y/o cromatografía. Cuando el biomarcador es una proteína o péptido, por ejemplo cuando un panel de biomarcadores debe evaluarse, la muestra puede ser procesada por precipitación, centrifugación, filtración y/o cromatografía. Cuando el biomarcador es un ácido nucleico, por ejemplo cuando un panel de biomarcadores debe evaluarse, la muestra puede ser procesada para asilar los ácidos nucleicos mediante extracción, precipitación y/o cromatografía.

25 Alguna parte de la mezcla de péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, y metabolitos (por ejemplo, metabolitos o péptidos, proteínas, fosfolípidos o nucleósidos) y/o otras moléculas de la muestra después pueden resolverse como un perfil de biomarcador. Esto puede lograrse mediante la medición de las cantidades de los biomarcadores en el perfil de biomarcador. Un perfil de biomarcador comprende una pluralidad de uno o más tipos de biomarcadores (por ejemplo, un fosfolípido, un ARNm, un ADNc, una proteína y/o un carbohidrato, etc.), o una indicación de los mismos, junto con cantidades de los biomarcadores. Un perfil de biomarcador puede comprender al menos uno de dicho biomarcador o indicación del mismo. Múltiples biomarcadores pueden estar en la misma clase o clases diferentes, tales como, por ejemplo, fosfolípido y un polipéptido.

30 Estas cantidades pueden determinarse a través del uso de cualquier técnica de medición reproducible o combinación de técnicas de medición. Dichas técnicas incluyen aquellas que son bien conocidas en la técnica que incluyen cualquier técnica descrita en la presente memoria. Típicamente, dichas técnicas se utilizan para medir las cantidades mediante la utilización de una muestra biológica tomada de un sujeto en un único punto en el tiempo o múltiples muestras tomadas en múltiples puntos en el tiempo. En una realización preferible, una técnica ejemplar para obtener un perfil de biomarcador de una muestra tomada de un sujeto es el inmunoensayo. El perfil de biomarcadores puede generarse mediante la utilización de un kit, tal como un kit descrito más abajo.

40 En ciertas realizaciones, los métodos de detección del biomarcador incluyen su detección a través de la interacción con un anticuerpo específico del biomarcador. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos al biomarcador de la invención. Los anticuerpos pueden generarse mediante la utilización de técnicas estándar bien conocidas para aquellos expertos en la técnica. En realizaciones específicas, los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo intacto, o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, scFv, Fab o F(ab')₂).

45 Por ejemplo, los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, específicos para un biomarcador pueden utilizarse para detectar cuantitativamente o cualitativamente la presencia de un biomarcador. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante técnicas de inmunofluorescencia. Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos), adicionalmente, pueden emplearse histológicamente como en microscopía inmunoelectrónica o inmunofluorescencia, para la detección *in situ* de un biomarcador. La detección *in situ* puede lograrse mediante la extracción de una muestra biológica (por ejemplo, un espécimen de biopsia) de un paciente, y la aplicación a la misma de un anticuerpo etiquetado que está dirigido a un biomarcador. El anticuerpo (o fragmento) preferiblemente se aplica cubriendo el anticuerpo (o fragmento) sobre una muestra biológica. A través del uso de dicho procedimiento, es posible determinar no sólo la presencia del biomarcador, sino también su distribución, en una muestra particular. Una amplia variedad de métodos histológicos bien conocidos (tales como procedimientos de manchado) pueden utilizarse para lograr dicha detección *in situ*.

Los inmunoensayos para un biomarcador típicamente comprenden incubar una muestra biológica de un anticuerpo etiquetado en forma detectable capaz de identificar un biomarcador, y detectar el anticuerpo unido mediante

cualquiera de un número de técnicas bien conocidas en la técnica. Según lo debatido en mayor detalle, más abajo, el término "etiquetado" puede referirse al etiquetado directo del anticuerpo a través de, por ejemplo, el acoplamiento de (es decir, conexión física) una sustancia detectable al anticuerpo, y también puede denominarse etiquetado indirecto del anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente etiquetado. Los ejemplos de etiquetado indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario mediante la utilización de un anticuerpo secundario etiquetado en forma fluorescente.

La muestra biológica puede ponerse en contacto con e inmovilizarse en un soporte o vehículo de fase sólida tal como nitrocelulosa, u otro soporte sólido que sea capaz de inmovilizar células, partículas de células o proteínas solubles.

El soporte después puede lavarse con tampones apropiados seguido por el tratamiento con el anticuerpo específico del gen de identidad tipográfica etiquetado en forma detectable. El soporte de fase sólida después puede lavarse con el tampón una segunda vez para eliminar anticuerpo no unido. La cantidad de etiqueta unida en soporte sólido después puede detectarse mediante métodos convencionales.

Por "soporte o vehículo de fase sólida" se quiere significar cualquier soporte capaz de unirse a un antígeno o un anticuerpo. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas natural y modificada, poliacrilamidas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en alguna medida o insoluble para los fines de la presente invención. El material soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. De ese modo, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una cuenta, o cilíndrica, como en la superficie interna de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una hoja, tira de ensayo, etc. Los soportes preferibles incluyen cuentas de poliestireno. Aquellos expertos en la técnica conocerán muchos otros vehículos apropiados para unir el anticuerpo o antígeno, o será capaz de averiguar el mismo mediante el uso de experimentación de rutina.

Una de las formas en las que un anticuerpo específico para un biomarcador puede ser etiquetado en forma detectable es mediante la conexión del mismo a una enzima y el uso en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, 1978, "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller et al., 1978, J. Clin. Pathol. 31:507-520; Butler, J.E., 1981, Meth. Enzymol. 73:482-523; Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL; Ishikawa, E. et al., (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kigaku Shoin, Tokio. La enzima que está unida al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferiblemente un sustrato cromogénico, de tal manera para producir un resto químico que pueda ser detectado, por ejemplo, mediante medios espectrofotométricos, fluorimétricos o mediante medios visuales. Las enzimas que pueden utilizarse para etiquetar en forma detectable el anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, malato dehidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol dehidrogenasa en levadura, alfa-glucosidasa, dehidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La detección puede lograrse mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también puede lograrse mediante la comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados de manera.

La detección también puede lograrse mediante la utilización de cualquier variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, al etiquetar radioactivamente los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, es posible detectar un biomarcador a través del uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986. El isótopo radioactivo (por ejemplo, ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H) puede ser detectado mediante dichos medios como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o mediante autoradiografía.

También es posible etiquetar el anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo etiquetado en forma fluorescente se expone a la luz de longitud de onda apropiada, después puede detectarse su presencia debido a la fluorescencia. Entre los compuestos etiquetados fluorescentes más comúnmente utilizados están el isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo también puede etiquetarse en forma detectable mediante la utilización de metales emisores de fluorescencia tales como ^{152}Eu , u otros de la serie lantánida. Estos metales pueden ser unidos al anticuerpo mediante la utilización de dichos grupos quelantes metálicos como ácido dietilentriaminapentacético (DTPA) o ácido etilendiaminetetraacético (EDTA).

El anticuerpo también puede etiquetarse en forma detectable al acoplar el mismo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado quimioluminiscente después se determina mediante la detección de la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos etiquetados quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.

Del mismo modo, un compuesto bioluminiscente puede utilizarse para etiquetar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en los sistemas biológicos en la que una proteína catalítica aumenta la eficiencia de la reacción quimioluminescente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina mediante la detección de la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes para fines de etiquetado son luciferina, luciferasa y aequorina.

En realizaciones ventajosas, los anticuerpos pueden estar en forma de un arreglo. Dicho arreglo puede utilizarse para la medición o detección de una pluralidad o panel de biomarcadores simultáneamente. El arreglo puede ser cualquier arreglo para anticuerpos conocido para aquellos con experiencia en la técnica. En ciertas realizaciones, una pluralidad de anticuerpos puede estar en forma de un chip de anticuerpo para la detección de una pluralidad o panel de biomarcadores. Los arreglos de anticuerpos ejemplares y chips de anticuerpo se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense N° 20050048566, 20050054015, 20050037343, 20050095591, 20050100947, 20040161748, 20040097460, y 20040096917. Los arreglos comerciales de anticuerpos pueden utilizarse o adaptarse para la presente invención, e incluyen, pero sin limitarse a, aquellos disponibles en Whatman Schliecher & Schuell, Eurogentec, Stigma Aldrich, Novagen y Chemicon International. La unión del antígeno al anticuerpo puede proceder de acuerdo a las técnicas apropiadas para el arreglo de anticuerpo o chip de anticuerpo, e incluyen, pero sin limitarse a, fluorescencia, resonancia de plasmones superficiales y espectrometría de masa.

En otra realización, las moléculas de unión específica distintas de los anticuerpos, tales como aptameros, pueden utilizarse para unirse a los biomarcadores. Aún en otra realización, el perfil de biomarcador puede comprender un aspecto medible de un agente infeccioso (por ejemplo, lipopolisacáridos o proteínas virales) o un componente del mismo.

Las cantidades de biomarcadores en un perfil de biomarcador también, por ejemplo, pueden generarse mediante el uso de uno o más de los siguientes métodos descritos más abajo. Por ejemplo, los métodos pueden incluir espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), un método de espectrometría de masa, tal como espectrometría de masa - ionización por electropulverización (ESI- MS), ESI-MS/MS, ESI-MS/(MS)ⁿ (n es un número entero mayor que cero), ionización desorción por láser asistida por matriz - tiempo de vuelo - espectrometría de masa (MALDI-TOF-MS), ionización desorción por láser mejorada por superficie - tiempo de vuelo - espectrometría de masa (SELDI-TOFMS), desorción/ionización en silicio (DIOS), espectrometría de masa de ion secundario (SIMS), cuádruplo de tiempo de vuelo (QTOF), ionización química a presión atmosférica - espectrometría de masa (APCI-MS), APCI-MS/MS, APCI-(MS)ⁿ, fotoionización a presión atmosférica - espectrometría de masa (APPI- MS), APPI-MS/MS, y APPI-(MS)ⁿ. Otros métodos de espectrometría de masa pueden incluir, *inter alia*, cuádruplo, espectrometría de masa de transformada de Fourier (FTMS) y trampa iónica. Otros métodos apropiados pueden incluir división por extracción química, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía líquida hidrofóbica (fase inversa), focalización isoelectrica, electroforesis en gel de poliacrilamida en una dimensión (PAGE), electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE) u otra cromatografía, tal como cromatografía líquida, gaseosa o de capa delgada, o cualquier puede fraccionarse previo a la aplicación del método de separación.

En una realización, se utiliza desorción/ionización por láser tiempo de vuelo espectrometría de masa para determinar la cantidad de un biomarcador donde el biomarcador es una molécula que ha sido ionizada y evaporada de un soporte de inmovilización por radiación láser incidente. Una variedad de técnicas de desorción/ionización láser son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Guttman et al., 2001, Anal. Chem. 73:1252-62 y Wei et al., 1999, Nature 399:243-246).

La desorción/ionización láser tiempo de vuelo espectrometría de masa permite la generación de grandes cantidades de información en un periodo de tiempo relativamente corto. Una muestra biológica se aplica a una de varias variedades de un soporte que se une a todos los biomarcadores, o un subconjunto de los mismos, en la muestra. Los lisados celulares o muestras se aplican directamente a estas superficies en volúmenes tan pequeños como 0,5 PL, con o sin previa purificación o fraccionamiento. Los lisados o muestra pueden concentrarse o diluirse previo a la aplicación sobre la superficie del soporte. Después se utiliza desorción/ionización por láser para generar espectros de masa de la muestra, o muestras, en tan poco como tres horas.

El análisis por cromatografía líquida - espectrometría de masa produce un espectro de intensidad de masa, los picos del que representan diversos componentes de la muestra, donde cada componente posee una relación masa y carga (m/z) y tiempo de retención característicos (r.t.). La presencia de un pico con la relación m/z y tiempo de retención de un biomarcador indica que el marcador está presente. El pico que representa un marcador puede compararse con un pico correspondiente de otro espectro (por ejemplo, de una muestra de control) para obtener un estándar interno) puede utilizarse cuando se desea una medición cuantitativa. Además, el software de deconvolución está disponible para separar los picos que se superponen. El tiempo de retención depende en alguna medida de las condiciones empleadas en la realización de la separación por cromatografía líquida.

En la espectrometría de masa MALDI (MALDI- MS), pueden utilizarse diversos analizadores de masa, por ejemplo, instrumentos de deflexión magnética/sector magnético en modo único o triple cuádruplo (MS/MS), transformada de Fourier y tiempo de vuelo (TOF), que incluyen tiempo de vuelo ortogonal (O- TOF), configuraciones tal como se conoce en la técnica de espectrometría de masa. Para el proceso de desorción/ionización, pueden utilizarse

numerosas combinaciones de matriz/láser. También pueden emplearse configuraciones de trampa iónica y reflectrón.

La espectrometría de masa - ionización por electropulverización (ESI-MS) es ampliamente aplicable para el análisis de macromoléculas, que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, y carbohidratos (Fenn et al., 1989, *Science* 24:64-71; Crain et al., 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:25-34; Smith et al., 1990, *Anal. Chem.* 62:882-99; Han & Gross, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10635-10639). Las técnicas de electropulverización se han utilizado para separar y medir biomarcadores como aquellos de fórmula I y fórmula la (véase Petkovic et al., 2001, *Anal. Biochem.* 289(2):202-16; Pulfer & Murphy, 2003, *Mass Spec Rev* 22 : 332-364; Han & Gross, 1995, *J. Amer. Soc. Mass Spec.* 6:1202-1210).

Para las siguientes clases de metabolitos, las siguientes fuentes proporcionan guía adicional en el análisis espectral de masa de dichas moléculas (1) lípidos (véase, por ejemplo, Fenselau, C., *ACS Symp. Ser.*, 541: 1-7 (1994)); (2) metabolitos volátiles (véase, por ejemplo, Lauritsen and Lloyd, D., *ACS Symp. Ser.* 541:91-106 (1994)); (3) carbohidratos (véase, por ejemplo, Fox and Black, *ACS Symp. Ser.* 541: 107-131 (1994); (4) ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Edmonds et al., *ACS Symp. Ser.*, 54:14.7-158 (1994); y (5) proteínas (véase, por ejemplo, Vorm, O. et al., *Anal. Chem.* 66: 3281-3287 (1994); y Vorm and Mann, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 5:955-958 (1994)).

En ciertas realizaciones, las especies en la muestra biológica pueden separarse por cromatografía líquida en conjunción con cualquiera de las técnicas de espectrometría de masa descritas más arriba. Dichas técnicas de cromatografía líquida/ espectrometría de masa han probado ser útiles para la separación de biomarcadores tales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, lípidos, fosfolípidos y metabolitos. Por ejemplo, debido a que se ha logrado la separación sensible de especies de fosfolípidos con LC/MS (véase Kim et al., 1994, *Anal. Chem.* 66(22):3977-82; Ma & Kim, 1995, *Anal. Biochem.* 226(2):293-301), dichas técnicas pueden utilizarse para separar y medir un biomarcador en conformidad con la fórmula I o fórmula la.

En realizaciones específicas de la invención, los biomarcadores en una pluralidad o panel de biomarcadores son ácidos nucleicos. Dichos biomarcadores y cantidades correspondientes del perfil de biomarcador pueden generarse, por ejemplo, mediante la detección del producto de expresión (por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido) de uno o más genes descritos en la presente memoria. En una realización específica, los biomarcadores y cantidades correspondientes en un perfil de biomarcador se obtienen mediante la detección y/o análisis de uno o más ácidos nucleicos mediante la utilización de cualquier método bien conocido para aquellos expertos en la técnica que incluye, pero sin limitarse de ningún modo a, hibridación, análisis de microarreglo, RT-PCR, ensayos de protección de nucleasa y análisis de transferencia Northern. Tal como será reconocido por aquellos expertos en la técnica, en realizaciones convenientes, la muestra biológica puede dividirse, con una porción evaluada para los biomarcadores de ácido nucleico, y otra parte evaluada para otros biomarcadores tales como proteínas, péptidos, lípidos, fosfolípidos y metabolitos. En realidad, la muestra biológica puede ser dividida tantas veces como se desee por el practicante con experiencia para facilitar la evaluación o medición de cada biomarcador en una pluralidad o panel de biomarcadores.

En ciertas realizaciones de la invención, se emplean arreglos de ácido nucleico para generar cantidades de biomarcadores en un perfil de biomarcador mediante la detección de la expresión de cualquiera o más de los genes descritos en la presente memoria. En una realización de la invención, un microarreglo, tal como un microarreglo de ADNc, se utiliza para determinar las cantidades de biomarcadores en un perfil de biomarcador. El uso diagnóstico de arreglos de ADNc es bien conocido en la técnica. (véase, por ejemplo, Zou et. al., 2002, *Oncogene* 21: 4855-4862; así como Draghici, 2003, *Data Analysis Tools for DNA Microarrays*, Chapman & Hall/CRC. Los métodos ejemplares para el análisis de microarreglos de ADNc se describen más abajo, y en los ejemplos en la Sección 6, *infra*.

En ciertas realizaciones, las cantidades para biomarcadores en un perfil de biomarcador se obtienen mediante la hibridación a ácidos nucleicos etiquetados en forma detectable del arreglo que representan o corresponden a las secuencias de ácidos nucleicos en las transcripciones de ARNm presentes en una muestra biológica (por ejemplo, ADNc etiquetado en forma fluorescente sintetizado de la muestra) a un microarreglo que comprende una o más manchas de sonda.

Los arreglos de ácidos nucleicos, por ejemplo, microarreglos, pueden producirse en un número de formas, de las que varias se describen en la presente memoria más abajo. Preferiblemente, los arreglos son reproducibles, lo que permite que múltiples copias de un arreglo dado sean producidas y resulten de dichos microarreglos en comparación uno con otro. Preferiblemente, los arreglos se realizan a partir de materiales que son estables en condiciones de unión (por ejemplo, hibridación de ácidos nucleicos). Aquellos expertos en la técnica conocerán soportes, sustratos o vehículos apropiados para hibridizar sondas de ensayo con manchas de sondas en un arreglo, o será capaz de averiguar los mismos para el uso de experimentación de rutina.

Varias técnicas cromatográficas pueden utilizarse para separar biomarcadores. Por ejemplo, productos de amplificación pueden separarse mediante electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poliácridamida mediante la utilización de métodos convencionales. Véase Sambrook *et al.*, 2001. Varias técnicas para detectar biomarcadores cuantitativamente sin electroforesis también pueden utilizarse de acuerdo a la invención (véase, por

ejemplo, PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis et al., 1990, Academic Press, Inc. N.Y). Por ejemplo, pueden emplearse técnicas cromatográficas para efectuar la separación. Hay muchas clases de cromatografía que pueden utilizarse en la presente invención: adsorción; división, intercambio iónico y tamiz molecular, HPLC, y muchas técnicas especializadas para utilizarlas que incluyen cromatografía en columna, papel, 5 capa delgada y gaseosa (Freifelder, Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology, 2nd ed., Wm. Freeman and Co., Nueva York, N.Y., 1982).

En ciertas realizaciones, uno o más de los biomarcadores es una proteína. En una realización específica, un perfil de biomarcador es generado mediante la detección y/o análisis de una o más proteínas y/o discriminación de fragmentos de los mismos mediante la utilización de cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica 10 para detectar proteínas que incluye, pero sin limitarse a análisis de microarreglo de proteína, inmunohistoquímica y espectrometría de masa.

Pueden utilizarse técnicas estándar para determinar la cantidad de proteína o proteínas de interés presentes en una muestra. Por ejemplo, pueden emplearse técnicas estándar mediante la utilización de, por ejemplo, inmunoensayos tales como, por ejemplo transferencia Western, inmunoprecipitación seguida por electroforesis en gel de 15 poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, (SDS- PAGE), inmunocitoquímica, y similares para determinar la cantidad de proteína o proteínas de interés presentes en una muestra. Un agente ejemplar para detectar una proteína de interés es un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una proteína de interés, preferiblemente un anticuerpo etiquetado en forma detectable, directamente o indirectamente.

Para dichos métodos de detección, si se desea que una proteína de la muestra sea analizada puede aislarse fácilmente mediante la utilización de técnicas que son bien conocidas para aquellos expertos en la técnica. Los métodos de aislamiento de proteína pueden, por ejemplo, ser tales como aquellos descritos en Harlow and Lane, 20 1988, Antibodys: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, Nueva York).

En ciertas realizaciones, los métodos de detección de la proteína o proteínas de interés incluyen su detección a través de la interacción con un anticuerpo específico de la proteína. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos a una 25 proteína de interés. Los anticuerpos pueden generarse mediante la utilización de técnicas estándar bien conocidas para aquellos expertos en la técnica. En realizaciones específicas, los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo intacto, o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, scFv, Fab o F(ab')₂). Los inmunoensayos ejemplares se describen más arriba.

En algunas realizaciones, un ensayo de chip de proteína (véase, por ejemplo, Zhu & Snyder, 2003, Curr. Opin. Chem. Biol. 7:55-63; Mitchell, 2002, Nature Biotechnology 20:225-229) se utiliza para medir las cantidades para los biomarcadores en el perfil de biomarcador. Véase también, por ejemplo, Lin, 2004, Modern Pathology, 1-9; Li, 2004, 30 Journal of Urology 171, 1782-1787; Wadsworth, 2004, Clinical Cancer Research, 10, 1625-1632; Prieto, 2003, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 26, 2315-2328; Coombes, 2003, Clinical Chemistry 49, 1615-1623; Mian, 2003, Proteomics 3, 1725-1737; Lehre et al., 2003, BJU International 92, 223-225; y Diamond, 2003, Journal of the American Society for Mass Spectrometry 14, 760-765. Particularmente útiles en ciertas realizaciones de la invención son los chips de anticuerpo que facilitan la detección mediante MALDI o SELDI (véase, 35 por ejemplo Wang, et al., 2001, Int'l. J. of Cancer 92:8 71-876; Figeys, 2002, Proteomics 2:373-382; Sonksen et al., 1998, Anal. Chem. 70:2731-6; Glökler, & Angenendt, 2003, J. Chromatography B, 797:229-240).

Anticuerpos selectivos para biomarcadores de la invención

Los anticuerpos contra los biomarcadores de la invención pueden producirse u obtenerse de acuerdo a cualquier técnica evidente para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos contra fosfolípidos y metabolitos de la invención pueden prepararse o aislarse de acuerdo a las técnicas descritas en Mourdjeva et al., 2005 Apoptosis 10(1):209-17, von Landenberg et al., 1999, J Autoimmun. 13:215-23, o Menon et al. J Autoimmun. 10:43- 40 57.

Los anticuerpos contra polipéptidos, o metabolitos de los mismos, pueden prepararse de acuerdo a técnicas estándar.

Un fosfolípido aislado de la invención, o un metabolito o fragmento del mismo, puede utilizarse como un inmunógeno para generar anticuerpos mediante la utilización de técnicas estándar para la preparación de anticuerpo policlonal y monoclonal. Un inmunógeno típicamente se utiliza para preparar anticuerpos mediante la inmunización de un sujeto apropiado, (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero). Una preparación inmunogénica apropiada puede comprender, por ejemplo, polipéptido químicamente sintetizado o recombinantemente expresado. La preparación 50 además puede incluir un adyuvante, tal como adyuvante incompleto o completo de Freud, o agente inmunoestimulador similar. En ciertas realizaciones, para facilitar la producción de anticuerpo el fosfolípido de la invención, o un metabolito o fragmento del mismo, puede acoplarse a un vehículo, por ejemplo una proteína tal como Hemocianina extraída del molusco llamado 'lapa californiana', albúmina de suero bovino, tiroglobulina, y ovalbumina. 55

Los anticuerpos policlonales pueden prepararse mediante la inmunización de un sujeto apropiado con un fosfolípido de la invención, o un metabolito o fragmento del mismo, de la invención como un inmunógeno. El título del

anticuerpo en el sujeto inmunizado puede monitorearse en el tiempo mediante técnicas estándar, tales como con un ensayo inmonoenzimático ligado a enzimas (ELISA) mediante la utilización de polipéptido inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo pueden aislarse del sujeto (por ejemplo, de la sangre) y además purificarse mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A para obtener la fracción IgG. Alternativamente, los anticuerpos específicos de un fosfolípido de la invención, o un metabolito o fragmento del mismo, de la invención puede seleccionarse para (por ejemplo, parcialmente purificado) o purificarse mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad. Por ejemplo, una proteína expresada recombinantemente y purificada (o parcialmente purificada) de la invención se produce según lo que se describe en la presente memoria, y se acopla en forma covalente o no covalente a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una columna de cromatografía. La columna después puede utilizarse para purificar por afinidad los anticuerpos específicos para las proteínas de la invención de una muestra que comprende anticuerpos dirigidos contra un gran número de diferentes epítopes, lo que genera de tal modo una composición de anticuerpo sustancialmente purificado, es decir, una que esté sustancialmente libre de anticuerpos contaminantes. Por una composición de anticuerpos sustancialmente purificados se quiere decir, en este contexto, que la muestra de anticuerpos comprende como máximo solamente el 30% (en peso seco) de anticuerpos contaminantes dirigidos contra epítopes distintos de aquellos en la proteína o polipéptido deseados de la invención, y preferiblemente como máximo el 20%, aún más preferiblemente como máximo el 10%, y mucho más preferiblemente como máximo el 5% (en peso seco) de la muestra son anticuerpos contaminantes. Una composición de anticuerpos purificados significa que al menos el 99% de los anticuerpos en la composición están dirigidos contra la proteína o polipéptido deseados de la invención.

En un tiempo apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo específico son más altos, las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridomas originalmente descrita por Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), la técnica de hibridomas de célula humana B (Kozbor et al., 1983, *Immunol Today* 4:72), la técnica de EBV-hibridomas (Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) o técnicas de triomas. La tecnología para producir hibridomas es bien conocida (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. (eds.) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, N.Y. (1994)). Las células de hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal de la invención son detectadas mediante la selección de sobrenadantes de cultivo de hibridomas para anticuerpos que se unen al polipéptido de interés, por ejemplo, mediante la utilización de un ensayo estándar ELISA.

En forma alternativa a la preparación de las hibridoma que segregan anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal dirigido contra un polipéptido de la invención puede identificarse y aislarse mediante la selección de una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de expresión de fago de anticuerpo) con el polipéptido de interés. Los kits para generar y seleccionar bibliotecas de expresión de fagos están comercialmente disponibles (por ejemplo, el Sistema de Anticuerpos Recombinantes de Farmacia, Catálogo N° 27-9400-01; y el Kit de Expresión de Fagos Stratagene SurfZAP, Catálogo N° 240612). Adicionalmente, los ejemplos de métodos y reactivos particularmente receptivos para el uso en la generación y selección de una biblioteca de expresión de anticuerpos puede encontrarse en, por ejemplo, Patente Estadounidense N° 5.223.409; Publicación PCT N° WO 92/18619; Publicación PCT N° WO 91/17271; Publicación PCT N° WO 92/20791; Publicación PCT N° WO 92/15679; Publicación PCT N° WO 93/01288; Publicación PCT N° WO 92/01047; Publicación PCT N° WO 92/09690; Publicación PCT N° WO 90/02809; Fuchs et al., 1991, *BioTechnology* 9:1370-1372; Hay et al., 1992, *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse et al., 1989, *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al., 1993, *EMBO J.* 12:725-7 4.

Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden partes humanas y no humanas, que pueden fabricarse mediante la utilización de técnicas de ADN recombinantes estándar, están dentro del alcance de la invención. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes se obtienen de diferentes especies animales, tales como aquellas que poseen una región variable obtenida de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana (Véase, por ejemplo, Cabilly et al., Patente Estadounidense N° 4.816.567; y Boss et al., Patente Estadounidense N° 4.816.397). Los anticuerpos humanizados son anticuerpos de moléculas de especies no humanas que posee una o más regiones que determinan complementariedad (CDRs) de una especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Queen, Patente Estadounidense N° 5.585.089).

Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo mediante la utilización de métodos descritos en la Publicación PCT N° WO 87/02671; Solicitud de Patente Europea 184.187; Solicitud de Patente Europea 171.496; Solicitud de Patente Europea 173.494; Publicación PCT N° WO 86/01533; Patente Estadounidense N° 4.816.567; Solicitud de Patente Europea 125.023; Better et al., 1988, *Science* 240:1041-1043; Liu et al., 1987, *Proc Natl Acad Sci.* 84:3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al., 1987, *Proc Natl Acad Sci.* 84:214-218; Nishimura et al., 1987, *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood et al., 1985, *Nature* 314:446-449; y Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207; Ol et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Patente Estadounidense N° 5.225.539, Jones et al., 1986, *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan et al., 1988, *Science* 239: 1534; y Beidler et al., 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos pueden producirse, por ejemplo, mediante la utilización de ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina endógena, pero

que pueden expresar genes de cadena ligera y pesada humana. Los ratones transgénicos son inmunizados en forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una parte de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse mediante la utilización de tecnología convencional de hibridomas. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se redispone durante la diferenciación de células B, y posteriormente pasan por cambio de clase y mutación somática. De ese modo, al utilizar dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA y IgE terapéuticamente útiles. Para una perspectiva general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev Immunol.* 13:65-93). Para un debate detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense N° 5.625.126; Patente Estadounidense N° 5.633.425; Patente Estadounidense N° 5.569.825; Patente Estadounidense N° 5.661.016; y Patente Estadounidense N° 5.545.806. Además, las compañías tales como Abgenix, Inc. (Fremont, Calif.), puede comprometerse a proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado mediante la utilización de tecnología similar a aquella descrita más arriba.

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse mediante la utilización de una técnica denominada "selección guiada." En este abordaje un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespersen et al., 1994, *BioTechnology* 12:899-903).

Ensayo enzimáticos para biomarcadores de la invención

En realizaciones ventajosas, la lisofosfatidilcolina total puede detectarse, medirse o monitorearse mediante uno o más ensayos enzimáticos. Los ensayos enzimáticos pueden ser cualquier ensayo enzimático conocido para aquellos expertos en la técnica que sea útil para detectar, medir o monitorear uno o más de los biomarcadores de la invención.

En ciertas realizaciones, los ensayos enzimáticos pueden ser de acuerdo a la solicitud publicada JP 2002-17938 (Kishimoto et al., 2002, *Method of Measuring Phospholipid*), o de acuerdo a Kishimoto et al., 2002, *Clinical Biochem.* 35:411-416.

En ciertas realizaciones, la lisofosfatidilcolina total puede medirse mediante el contacto de una muestra de la invención con una enzima capaz de hidrolizar la lisofosfatidilcolina para producir glicerofosforilcolina. La enzima puede ser cualquier enzima conocida para aquellos expertos en la técnica. Las enzimas ejemplares incluyen lisofosfolipasas tales como EC 3.1.1.5 (comercialmente disponible en, por ejemplo, Asahi Chemical Co.). En ciertas realizaciones, la lisofosfolipasa preferencialmente hidroliza lisofosfolípidos respecto de otros fosfolípidos. En ciertas realizaciones, la lisofosfolipasa es de *Bacillus*. En ciertas realizaciones, la lisofosfolipasa es de acuerdo a JP 2002-17938.

La glicerofosforilcolina resultante puede detectarse, medirse o monitorearse de acuerdo a cualquier técnica evidente para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la glicerofosforilcolina puede ponerse en contacto con una glicerofosforilcolina diesterasa conocida para aquellos expertos en la técnica (por ejemplo EC 3.1.4.2) en condiciones apropiadas para producir colina. La colina resultante puede ponerse en contacto con una colina oxidasa conocida para aquellos expertos en la técnica (por ejemplo EC 1.1.3.17) en condiciones apropiadas para producir peróxido. El uso de la colina oxidasa permite que el método detecte la lisofosfatidilcolina en vez de otros lisofosfolípidos tales como lisofosfolípidos que comprenden serina o etanolamina. El peróxido resultante puede detectarse mediante cualquier técnica evidente para aquellos expertos en la técnica que incluye, por ejemplo, técnicas colorimétricas.

La detección de peróxido de hidrógeno puede lograrse mediante cualquier técnica evidente para uno con experiencia en la técnica. Las técnicas ejemplares incluyen quimioluminiscencia (Kiba et al., 2003, *Analytical Science* 19(6):823-827), fluorescencia (Zhang et al., 199, *Talanta* 48 (5):1031-1038; Chen et al., 2001, *Analytica Chimica* 434 (1):51-58), y espectrofotometría (Pappas et al., 2002, *Analytica Chimica* 455(2):305-313). Otras técnicas ejemplares incluyen complejos de metal (Paleologos, 2002, *Analytical Chemistry* 74 (1):100-106) así como detección electroquímica mediada por redox (por ejemplo, medidores de glucosa comercialmente disponibles).

En realizaciones ventajosas, la actividad de peroxidasa puede detectarse con un sustrato fluorogénico. Dichas realizaciones proporcionan técnicas rápidas y sensibles para la detección de lisofosfatidilcolina total en la muestra. Estas técnicas de ese modo proporcionan ensayos rápidos y sensibles para el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica según lo que se describe en la presente memoria. El sustrato fluorogénico puede ser cualquier sustrato fluorogénico conocido para aquellos expertos en la técnica que sea capaz de la conversión en un producto fluorescente mediante una peroxidasa en presencia de peróxido en condiciones apropiadas, por ejemplo con agua y oxígeno. En realizaciones particulares, el sustrato fluorogénico es 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina. Este sustrato puede obtenerse de proveedores comerciales (por ejemplo Amplex Red, Invitrogen). Aquellos expertos en la técnica reconocerán que este sustrato fluorogénico puede convertirse en el producto fluorescente 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona (resorufina), detectable mediante técnicas evidentes para aquellos expertos en la técnica. Las técnicas de detección útiles incluyen, por supuesto, la detección de fluorescencia. Preferiblemente, los métodos de

detección se llevan a cabo en condiciones en las que el producto puede formarse y detectarse. Las condiciones útiles y resultados se describen en los ejemplos de trabajo más abajo.

En ciertas realizaciones, la glicerofosforilcolina puede ponerse en contacto con una glicerofosforilcolina fosfodiesterasa conocida para aquellos expertos en la técnica en condiciones apropiadas para producir glicerol-3-fosfato. El glicerol-3-fosfato resultante puede ponerse en contacto con una glicerol-3-fosfato oxidasa conocida para aquellos expertos en la técnica en condiciones apropiadas para producir peróxido. Las glicerol-3-fosfato oxidasas útiles incluyen aquellas obtenidas de *Streptococcus*, *Aerococcus*, y *Pediococcus*, y aquellas descritas en JP 2002-17938. El peróxido resultante puede detectarse mediante cualquier técnica evidente para aquellos expertos en la técnica que incluye, por ejemplo, técnicas colorimétricas.

En ciertas realizaciones, la glicerofosforilcolina puede ponerse en contacto con una glicerofosforilcolina fosfodiesterasa conocida para aquellos expertos en la técnica en condiciones apropiadas para producir glicerol-3-fosfato. El glicerol-3-fosfato resultante puede ponerse en contacto con una glicerol-3-fosfato dehidrogenasa conocida para aquellos con experiencia en la técnica en condiciones apropiadas para producir un producto detectable. Por ejemplo, el contacto puede ser en presencia de NAD^+ para producir NADH detectable. El contacto también puede ser en presencia de NADP^+ para producir NADPH detectable.

Las técnicas para detectar, medir o monitorear productos detectables tales como peróxido, NADH y NADPH son bien conocidas para aquellos expertos en la técnica. Las técnicas útiles se describen en JP 2002-17938, Misaki, 1999, Modern Medical Laboratory 27 (8): 973-980, (1999), Patente Japonesa N° 1594750, Patente Japonesa en Trámite N° 05-229993, y Aoyama, 1997, Journal of Medical Technology 14: 1014-1019.

Diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica

En ciertos métodos de la invención, la lisofosfatidilcolina total en el sujeto se utiliza para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica. Según lo que se describe más arriba, la lisofosfatidilcolina total puede medirse directamente, o puede realizarse una medición que se correlacione con la cantidad de lisofosfatidilcolina total. En ciertas realizaciones, se mide la lisofosfatidilcolina libre. En ciertas realizaciones, se mide la lisofosfatidilcolina unida. En ciertas realizaciones, se miden la lisofosfatidilcolina libre y la lisofosfatidilcolina unida.

En ciertos métodos de la invención, se utiliza la cantidad de uno o más biomarcadores de lisofosfatidilcolina en el sujeto para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica.

En ciertos métodos de la invención, se utilizan la cantidad de lisofosfatidilcolina total y uno o más biomarcadores de lisofosfatidilcolina en el sujeto para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica.

En algunas realizaciones, una única muestra del sujeto es suficiente para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica. En dichas realizaciones, la cantidad de lisofosfatidilcolina puede compararse con una referencia interna en la muestra biológica que esté presente en una cantidad relativamente constante en individuos similares al sujeto. La referencia interna puede ser cualquier referencia considerada apropiada para uno con experiencia en la técnica y preferiblemente no se relaciona con el biomarcador o afecciones inflamatorias sistémicas. En ciertas realizaciones, la referencia interna es fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o fosfatidilserina.

En algunas realizaciones, se evalúa una pluralidad de muestras biológicas del sujeto para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica. En dichas realizaciones, el cambio en la cantidad de lisofosfatidilcolina es indicativo de riesgo de la afección inflamatoria sistémica.

En ciertas realizaciones, las cantidades crecientes de lisofosfatidilcolina indican un riesgo decreciente de una afección inflamatoria sistémica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una segunda cantidad que es al menos 110%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400% o 500% de una cantidad previa indica riesgo disminuido de la afección inflamatoria sistémica.

En ciertas realizaciones, las cantidades decrecientes de lisofosfatidilcolina indican un riesgo creciente de una afección inflamatoria sistémica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una segunda cantidad que es menor que 95%, 90%, 80%, 75%, 50%, 33%, 25%, 20% o 10% de una cantidad previa indica riesgo disminuido de la afección inflamatoria sistémica.

En ciertas realizaciones, el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica puede ser en base a una comparación de la cantidad de lisofosfatidilcolina en una muestra del sujeto con una cantidad de referencia de lisofosfatidilcolina. Las cantidades de referencia se describen en la sección más abajo. Significativamente, la cantidad de la cantidad de referencia no necesita ser obtenida o medida por un practicante de un método de la invención. En vez, la cantidad de referencia puede identificarse mediante la consulta de las cantidades de la referencia en las poblaciones de referencia disponibles para aquellos expertos en la técnica. Dichas cantidades pueden publicarse, por ejemplo, en la literatura científica en bases de datos electrónicas.

En realizaciones preferibles, la cantidad de referencia se mide mediante la misma técnica o una técnica comparable utilizada para medir la cantidad en la muestra. Por ejemplo, preferiblemente, si se mide la lisofosfatidilcolina libre en

la muestra, la cantidad de referencia puede ser en base a lisofosfatidilcolina libre en un sujeto de referencia o una población de referencia. Por ejemplo, preferiblemente, si se mide la lisofosfatidilcolina unida en la muestra, la cantidad de referencia puede ser en base a la lisofosfatidilcolina unida. Por supuesto, si la lisofosfatidilcolina total y la cantidad de referencia se miden mediante técnicas diferentes, la correlación de las dos cantidades debe estar dentro de la capacidad del practicante con experiencia.

Si un biomarcador de lisofosfatidilcolina se mide en la muestra, la cantidad de referencia puede ser en base al biomarcador de lisofosfatidilcolina en un sujeto de referencia o población de referencia. Por supuesto, si se miden el biomarcador de lisofosfatidilcolina y la cantidad de referencia mediante técnicas diferentes, la correlación de las dos cantidades debe estar dentro de la capacidad del practicante con experiencia.

Cuando se utiliza una cantidad de referencia, la diferencia entre la cantidad de referencia y la cantidad en el sujeto de ensayo es utilizada por un practicante con experiencia en la técnica para realizar un diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica. En ciertas realizaciones, si la cantidad en el sujeto de ensayo está entre el 10-190%, 20-180%, 30-170%, 40-160%, 50-150%, 75-125%, 80-120%, 90-110% o 95-105% de la cantidad de referencia, se indica el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica.

Si se utiliza una cantidad límite de referencia, la diferencia entre el límite y la cantidad en el sujeto de ensayo es utilizada por un practicante con experiencia en la técnica para realizar un diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica. En ciertas realizaciones, si la cantidad en el sujeto de ensayo está más abajo, o sustancialmente más abajo, de la cantidad límite de referencia, se indica el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica, y si la cantidad en el sujeto de ensayo está más arriba, o sustancialmente más arriba, de la cantidad límite de referencia, no se indicaría ningún diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica.

En ciertas realizaciones, la diferencia entre la cantidad de lisofosfatidilcolina en el sujeto de ensayo y la cantidad de referencia se correlaciona inversamente con el riesgo a la afección inflamatoria sistémica. Dicha correlación puede ser determinada por aquellos expertos en la técnica.

Cuando se utilizan cantidades de referencia de una pluralidad de sujetos de referencia, la evaluación puede ser en base a cualquier técnica estadística conocida para aquellos expertos en la técnica. De manera similar, cuando se utilizan una pluralidad de biomarcadores, el diagnóstico o pronóstico puede ser en base a la pluralidad de cantidades de acuerdo a técnicas conocidas para aquellos expertos en la técnica, tales como aquellas descritas en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense N° 20030194752, 20040096917, 20040097460, 20040106142, 20040157242, y Solicitud Provisional Estadounidense N°60/671,620, presentada el 15 de abril de 2005, 60/671,941, presentada el 15 de abril de 2005, y 60/674,046, presentada el 22 de abril de 2005.

Biomarcador de referencia

En ciertos métodos de la invención, la cantidad de lisofosfatidilcolina total del sujeto se compara con una cantidad de referencia correspondiente de lisofosfatidilcolina total. La cantidad de referencia típicamente es la cantidad de lisofosfatidilcolina total en un sujeto de referencia (no el sujeto del método) que tiene, o tendrá dentro de un período definido de tiempo, una afección inflamatoria sistémica conocida. Si bien no intentamos ceñirnos a ninguna teoría particular de operación, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de una correlación entre la lisofosfatidilcolina total y una afección inflamatoria sistémica en un sujeto. Por consiguiente, uno que practica un método de la invención puede comparar la cantidad de lisofosfatidilcolina total en un sujeto con una cantidad de referencia de lisofosfatidilcolina total para realizar un pronóstico o diagnóstico de la afección inflamatoria sistémica.

En ciertos métodos de la invención, la cantidad del biomarcador de lisofosfatidilcolina del sujeto se compara con una cantidad de referencia correspondiente del biomarcador. La cantidad de referencia típicamente es la cantidad del mismo biomarcador, o n derivado del mismo, en un sujeto de referencia (no el sujeto del método) que tiene, o tendrá dentro de un período de tiempo definido, una afección inflamatoria sistémica conocida. Si bien no intentamos ceñirnos a ninguna teoría particular de operación, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de una correlación entre un biomarcador de lisofosfatidilcolina de la invención y una afección inflamatoria sistémica en un sujeto. Por consiguiente, uno que practica un método de la invención puede comparar la cantidad de un biomarcador de lisofosfatidilcolina en un sujeto con una cantidad de referencia del biomarcador de lisofosfatidilcolina para realizar un pronóstico o diagnóstico de la afección inflamatoria sistémica.

En forma ventajosa, a fin de practicar los métodos de la invención, uno no necesita juntar cantidades de lisofosfatidilcolina de referencia en las poblaciones de referencia. Dichas cantidades de referencia pueden identificarse en fuentes disponibles para aquellos expertos en la técnica, tales como bases de datos públicas o privadas, o por referencia a los datos proporcionados en la presente memoria. Como tal, en los métodos que utilizan una cantidad de referencia de lisofosfatidilcolina, uno necesita solamente realizar la comparación descrita en el método.

Puede medirse una cantidad de referencia de acuerdo a técnicas conocidas para aquellos expertos en la técnica que incluyen aquellas descritas en la presente memoria. En forma ventajosa, en ciertas realizaciones, la cantidad de lisofosfatidilcolina en el sujeto de referencia y la cantidad de lisofosfatidilcolina en el sujeto de ensayo se obtienen mediante la misma técnica.

- El sujeto de referencia puede ser cualquier sujeto que presente, o que presentará dentro de un período de tiempo definido, síntomas de la afección inflamatoria sistémica de acuerdo a uno con experiencia en la técnica. En ciertas realizaciones, la cantidad de referencia se obtiene en un momento cuando el sujeto de referencia presenta los síntomas. En ciertas realizaciones, la cantidad de referencia puede obtenerse en un momento antes o un momento después de que el sujeto de referencia presenta síntomas de, o se le diagnostica, la afección inflamatoria sistémica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las cantidades de referencia se obtienen de los sujetos de referencia 48, 36, 24 o 12 horas previo a la aparición de sepsis. Aquellos expertos en la técnica reconocerán que dichas cantidades pueden obtenerse mediante la medición de cantidades en una población de referencia en riesgo de sepsis y el seguimiento del diagnóstico del sujeto de referencia en el tiempo.
- El sujeto de referencia puede tener cualquier afección inflamatoria sistémica o puede estar libre de una afección inflamatoria sistémica. En ciertas realizaciones, el sujeto de referencia puede ser SIRS negativo o presenta síntomas de SIRS, sepsis, sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad. Dichas cantidades de referencia pueden utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de la afección.
- Los métodos para el diagnóstico de la afección inflamatoria sistémica se deben llevar a cabo de acuerdo al conocimiento de aquellos expertos en la técnica. Dichos métodos son de rutina y no se describirán en la presente memoria.
- En ciertas realizaciones, el diagnóstico o pronóstico de una afección inflamatoria sistémica se basa en una cantidad límite de referencia. Una cantidad límite de referencia es un valor absoluto para la cantidad que indica riesgo de la afección inflamatoria sistémica. Por ejemplo, una cantidad límite de referencia de 100 para un biomarcador de la invención puede indicar riesgo de una afección inflamatoria sistémica cuando el sujeto de ensayo posee una cantidad del biomarcador que es menor que 100 (o mayor que 100 en realizaciones alternativas). Las cantidades límites de referencia pueden determinarse mediante la utilización de técnicas estadísticas conocidas para aquellos expertos en la técnica en base a cantidades de referencia obtenidas de sujetos de referencia. Por ejemplo, un límite para una afección inflamatoria sistémica particular puede determinarse de manera que un nuevo sujeto de referencia pueda tener un diagnóstico o pronóstico dentro de un intervalo de confianza apropiado para aquellos expertos en la técnica, por ejemplo con 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de confianza.

Métodos para monitorear el tratamiento o prevención de afecciones inflamatorias sistémicas

- En ciertos aspectos, la presente invención proporciona métodos para monitorear una afección inflamatoria sistémica, o el riesgo de la afección inflamatoria sistémica, en un sujeto que necesita el mismo. En ciertas realizaciones, la cantidad de lisofosfatidilcolina se obtiene del sujeto y se utiliza para evaluar la afección o el riesgo de la afección.
- En realizaciones particulares, la presente invención proporciona métodos para monitorear un tratamiento de una afección inflamatoria sistémica. Los métodos de la invención pueden utilizarse para evaluar la efectividad del tratamiento y alterar el tratamiento dependiendo de los resultados del método. Dichos métodos en general comprenden la etapa de medir la cantidad de lisofosfatidilcolina para evaluar el riesgo de una afección inflamatoria sistémica en un sujeto al que se le ha administrado, o se le administrará, un tratamiento o prevención de una afección inflamatoria sistémica.
- En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para monitorear un tratamiento o prevención de SIRS, sepsis, sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad. El tratamiento o prevención puede ser cualquier tratamiento o prevención de SIRS, sepsis, sepsis severa, choque séptico, disfunción múltiple de órganos o mortalidad conocida por aquellos con experiencia.
- En ciertas realizaciones, el tratamiento o prevención comprende la administración de antibióticos de acuerdo a técnicas conocidas para aquellos con experiencia. EL antibiótico puede ser cualquier antibiótico apropiado para el tratamiento o prevención de la afección inflamatoria sistémica conocido para aquellos expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el antibiótico puede ser efectivo contra bacterias gram positivas tal como gentamicina, ceftriaxona, tobramicina o ceftazidina. En algunas realizaciones, el antibiótico puede ser efectivo contra bacterias gram negativas tal como vancomicina. En algunas realizaciones, el antibiótico puede ser efectivo contra bacterias anaerobias, tal como metronidazol.
- En otras realizaciones, el tratamiento o prevención comprende la administración de esteroide de acuerdo a técnicas conocidas para aquellos con experiencia. El esteroide puede ser cualquier esteroide apropiado para el tratamiento o prevención de la afección inflamatoria sistémica conocido para aquellos expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el esteroide es hidrocortisona o dexametasona.
- En otras realizaciones, el tratamiento o prevención comprende la administración de un vasoconstrictor o terapia inotrópica de acuerdo a técnicas conocidas para aquellos con experiencia. El vasoconstrictor o terapia inotrópica puede ser cualquier vasoconstrictor o terapia inotrópica apropiados para el tratamiento o prevención de la afección inflamatoria sistémica conocidos para aquellos con experiencia en la técnica. En ciertas realizaciones, el vasoconstrictor o terapia inotrópica es norepinefrina, dopamina o dobutaima.
- En otras realizaciones, el tratamiento o prevención comprende la administración de XIGRIS® (drotrecogin alfa

(activada), Eli Lilly and Company). XIGRIS® es una forma recombinante de la proteína C activada humana aprobada por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos para la reducción de la mortalidad en pacientes adultos con sepsis severa.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir una afección inflamatoria sistémica. Los métodos comprenden las etapas de administrar un tratamiento o prevención de la afección inflamatoria sistémica y monitorear el riesgo o severidad de la afección inflamatoria sistémica de acuerdo a un método de la invención. El riesgo o severidad de la afección inflamatoria sistémica puede evaluarse de acuerdo a los métodos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, puede ajustarse otra administración del tratamiento o prevención en base al resultado del monitoreo de acuerdo al criterio de uno con experiencia en la técnica.

En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una afección inflamatoria sistémica en un sujeto que necesita el mismo que comprende las etapas de administrar al sujeto una cantidad efectiva de XIGRIS® y monitorear la afección inflamatoria sistémica de acuerdo a un método de la invención. En ciertas realizaciones, la afección inflamatoria sistémica es sepsis o sepsis severa.

En algunas realizaciones, se obtiene con el tiempo una pluralidad de cantidades de lisofosfatidilcolina para monitorear la afección inflamatoria sistémica. En ciertas realizaciones, las cantidades crecientes indican el riesgo disminuido de la afección inflamatoria sistémica o severidad disminuida de la afección. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una segunda cantidad que es al menos 110%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400% o 500% de una cantidad previa indica el riesgo disminuido de la afección inflamatoria sistémica o severidad disminuida de la afección. En otras realizaciones, las cantidades decrecientes indican el riesgo incrementado de la afección inflamatoria sistémica o severidad incrementada de la afección. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una segunda cantidad que es menor que 95%, 90%, 80%, 75%, 50%, 33%, 25%, 20% o 10% de una cantidad previa indica riesgo incrementado de la afección inflamatoria sistémica o severidad incrementada de la afección.

En algunas realizaciones, una o más cantidades se obtienen con el tiempo. En dichas realizaciones, se utiliza la diferencia entre la cantidad de lisofosfatidilcolina y una cantidad de referencia de lisofosfatidilcolina total para una afección inflamatoria sistémica para el diagnóstico o pronóstico de la afección inflamatoria sistémica. La comparación con la cantidad de referencia puede llevarse a cabo según lo que se describe más arriba.

Kits para el diagnóstico o pronóstico, o monitoreo, de una afección inflamatoria sistémica

También se describen en la presente memoria los kits que son útiles para el diagnóstico o pronóstico, o monitoreo, de una afección inflamatoria sistémica en un sujeto. En algunas realizaciones, los kits comprenden un reactivo que específicamente se une a la lisofosfatidilcolina total. El reactivo puede ser parte de un arreglo, o el reactivo puede ser envasado en forma separada y/o individualmente. El kit también puede comprender al menos un estándar interno que debe ser utilizado en la evaluación de la lisofosfatidilcolina total.

En realizaciones particulares, los kits comprenden un arreglo de anticuerpos o un chip de anticuerpos con especificidad para uno o más biomarcadores en una pluralidad de panel de biomarcadores de la invención.

Los kits pueden contener reactivos que pueden utilizarse para detectar los biomarcadores contenidos en las muestras biológicas de las que se generan los perfiles de biomarcador. En una realización específica, un kit para predecir el desarrollo de sepsis en un sujeto de ensayo comprende un anticuerpo que específicamente se une a la lisofosfatidilcolina total. En conformidad con esta realización, el kit puede comprender un anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo (por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv, o scFv) que preferencialmente se unen a la lisofosfatidilcolina total. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden etiquetarse en forma detectable.

En ciertas realizaciones los kits comprenden reactivos útiles para la detección de lisofosfatidilcolina total en una muestra. En ciertas realizaciones, los reactivos comprenden uno o más enzimas y uno o más sustratos útiles para la detección de lisofosfatidilcolina. En realizaciones particulares, los kits pueden comprender un sustrato fluorogénico útil para la detección de lisofosfatidilcolina total. Ciertos kits comprenden una enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la lisofosfatidilcolina para formar glicerofosfatidilcolina en condiciones apropiadas, una enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la glicerofosfatidilcolina para formar colina en condiciones apropiadas, una enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la colina para formar peróxido en condiciones apropiadas, una peroxidasa y un sustrato fluorogénico de dicha peroxidasa. Ciertos kits comprenden una lisofosfolipasa, una glicerofosfatidilcolina diesterasa, una colina oxidasa, una peroxidasa y 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina. Ciertos kits comprenden EC 3.1.1.5, EC 3.1.4.2, EC 1.1.3.17, peroxidasa de rábano y 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina. Los kits además pueden comprender uno o más estándares de referencia para evaluar la lisofosfatidilcolina total de acuerdo a métodos de la invención.

También se describen en la presente memoria los kits que son útiles para el diagnóstico o pronóstico, o monitoreo, de una afección inflamatoria sistémica en un sujeto. En algunas realizaciones, los kits comprenden un reactivo que específicamente se une a un biomarcador de la presente invención. El reactivo puede ser parte de un arreglo, o el reactivo puede envasarse en forma separada y/o individualmente. El kit también puede comprender al menos un estándar interno para ser utilizado en la evaluación de un biomarcador de la presente invención. En realizaciones

particulares, los kits comprenden un arreglo de anticuerpos o un chip de anticuerpos con especificidad para uno o más biomarcadores en una pluralidad o panel de biomarcadores de la invención.

Los kits pueden contener reactivos que pueden utilizarse para detectar biomarcadores contenidos en las muestras biológicas a partir de las que se generan los perfiles de biomarcadores. En una realización específica, un kit para predecir el desarrollo de sepsis en un sujeto de ensayo comprende un anticuerpo que específicamente se une a un biomarcador de la invención. En conformidad con esta realización, el kit puede comprender un anticuerpo o fragmento funcional o derivado del mismo (por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv, o scFv) que específicamente se unen a uno o más de los biomarcadores de la invención. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden etiquetarse en forma detectable.

En otras realizaciones, un kit puede comprender un reactivo de unión a un biomarcador específico, tal como un aptámero. Si los biomarcadores comprenden un ácido nucleico, el kit puede proporcionar una sonda de oligonucleótido que es capaz de formar un dúplex con el biomarcador o con una hebra complementaria de un biomarcador. La sonda de oligonucleótidos puede etiquetarse en forma detectable.

Los kits también pueden incluir reactivos tales como tampones, u otros reactivos que pueden utilizarse en la obtención de la cantidad de un biomarcador. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares.

En las realizaciones que utilizan biomarcadores además de la lisofosfatidilcolina, tales como biomarcadores de ácido nucleico, los kits pueden comprender en forma ventajosa un microarreglo. En una realización este microarreglo comprende una pluralidad de manchas de sonda para los biomarcadores que deben ser evaluados con el kit. En algunas realizaciones, el microarreglo consiste en entre aproximadamente tres y aproximadamente cien manchas de sonda en un sustrato. En algunas realizaciones, el microarreglo consiste en entre aproximadamente tres y aproximadamente cien manchas de sonda en un sustrato. Según lo utilizado en este contexto, el término "aproximadamente" significa dentro del porcentaje de interés del valor establecido, dentro de diez por ciento del valor establecido, o dentro de veinticinco por ciento del valor establecido.

En ciertas realizaciones, los kits además comprenden una etiqueta o etiquetado con instrucciones para llevar a cabo un método de la invención. Por ejemplo, la etiqueta o etiquetado puede proporcionar una cantidad de referencia o cantidades de referencia de lisofosfatidilcolina correspondientes a una o más afecciones inflamatorias sistémicas. La etiqueta o etiquetado puede proporcionar una o más cantidades de referencia límites de lisofosfatidilcolina correspondientes a una o más afecciones inflamatorias sistémicas. Además, la etiqueta o etiquetado puede proporcionar citas o conexiones a fuentes de dichas cantidades de referencia.

Algunos kits además pueden comprender un producto de programa informático para le uso en conjunción con un sistema informático, donde el producto de programa informático comprende un medio de almacenamiento legible por computadora y un mecanismo de programa informático incluido en el mismo. En dichos kits, el mecanismo de programa informático comprende instrucciones para evaluar si una o más cantidades de lisofosfatidilcolina de un sujeto de ensayo en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria sistémica satisfacen un primer conjunto de valores. La satisfacción del primer conjunto de valores predice que el sujeto de ensayo posiblemente desarrolle la afección inflamatoria sistémica. En algunos kits, el producto de programa informático además comprende instrucciones para evaluar si una o más cantidades de lisofosfatidilcolina del sujeto de ensayo satisfacen un segundo conjunto de valores. La satisfacción de un segundo conjunto de valores predice que el sujeto de ensayo no es posible que desarrolle la afección inflamatoria sistémica.

Algoritmos para el diagnóstico o pronóstico, o monitoreo, de una afección inflamatoria sistémica

La presente invención proporciona lisofosfatidilcolina total y biomarcadores de lisofosfatidilcolina útiles para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de una afección inflamatoria sistémica. Según lo que se describe más arriba, la lisofosfatidilcolina puede utilizarse sola o como parte de una pluralidad o panel de biomarcadores. Una pluralidad o panel de biomarcadores puede comprender una lisofosfatidilcolina de la invención, biomarcadores conocidos para aquellos expertos en la técnica que sean útiles, o ambos. En realizaciones ventajosas, estos biomarcadores son capaces de discriminar entre convertidores y no convertidores.

La identidad de estos biomarcadores y sus características correspondientes (por ejemplo, valores de cantidad o expresión) pueden utilizarse para desarrollar una regla de decisión, o pluralidad de reglas de decisión, que discriminan entre convertidores y no convertidores. Los algoritmos de análisis de datos puede utilizarse construir un número de dichas reglas de decisión. Algoritmo de análisis de datos utilizan características (por ejemplo, valores de cantidad o expresión) de un subconjunto de los biomarcadores de la presente invención en toda una población de entrenamiento que incluye convertidores y no convertidores. Típicamente, un sujeto SIRS es considerado un no convertidor cuando el sujeto no desarrolla sepsis en un período de tiempo definido (por ejemplo, período de observación). Este período de tiempo definido puede ser, por ejemplo, doce horas, veinticuatro horas, cuarenta y ocho horas, un día, una semana, un mes, o más. Los algoritmos de análisis de datos específicos para construir una

regla de decisión, o pluralidad de reglas de decisión, que discriminen entre sujetos que desarrollan sepsis y sujetos que no desarrollan sepsis durante un período definido se describirá en las subsecciones más abajo. Una vez que una regla de decisión se ha construido mediante la utilización de estos algoritmos de análisis de datos ejemplares u otras técnicas conocidas en la técnica, la regla de decisión puede utilizarse para clasificar un sujeto de ensayo en una de dos o más clases fenotípicas (por ejemplo, un convertidor o un no convertidor). Estos se logra mediante la aplicación de la regla de decisión a un perfil de biomarcador obtenido de un sujeto de ensayo. Dichas reglas de decisión, por ello, tienen valor como indicadores diagnósticos.

La presente invención proporciona, en un aspecto, la evaluación de un perfil de biomarcador de un sujeto de ensayo respecto del perfil de biomarcadores obtenidos de una población de entrenamiento. En algunas realizaciones, cada perfil de biomarcador obtenido de sujetos en la población de entrenamiento, así como el sujeto de ensayo, comprende una característica para cada uno de una pluralidad de diferentes biomarcadores. En algunas realizaciones, esta comparación se logra mediante (i) el desarrollo de una regla de decisión mediante la utilización de los perfiles de biomarcadores de la población de entrenamiento y (ii) la aplicación de la regla de decisión al perfil de biomarcador del sujeto de ensayo. Como tal, las reglas de decisión aplicadas en algunas realizaciones de la presente invención se utilizan para determinar si un sujeto de ensayo que posee SIRS posiblemente adquirirá o no sepsis.

En algunas realizaciones de la presente invención, cuando los resultados de la aplicación de una regla de decisión indican que el sujeto posiblemente adquirirá sepsis, el sujeto es diagnosticado como un sujeto "sepsis". Si los resultados de una aplicación de una regla de decisión indican que el sujeto no adquirirá sepsis, el sujeto es diagnosticado como un sujeto "SIRS". De ese modo, en algunas realizaciones, el resultado en la situación de decisión binaria descrita más arriba tiene cuatro posibles resultados:

- Verdaderamente séptico, donde la regla de decisión indica que el sujeto adquirirá sepsis y el sujeto en realidad adquiere sepsis durante el período de tiempo definido (verdadero positivo, TP);
- (ii) falsamente séptico, donde la regla de decisión indica que el sujeto adquirirá sepsis y el sujeto, en realidad, no adquiere sepsis durante el período de tiempo definido (falso positivo, FP);
- (iii) verdaderamente SIRS, donde la regla de decisión indica que el sujeto no adquirirá sepsis y el sujeto, en realidad, no adquiere sepsis durante el período de tiempo definido (verdadero negativo, TN); o
- (iv) falsamente SIRS, donde la regla de decisión indica que el sujeto no adquirirá sepsis y el sujeto, en realidad, adquiere sepsis durante el período de tiempo definido (falso negativo, FN).

Se apreciará que pueden realizarse otras definiciones para TP, FP, TN, FN. Por ejemplo, TP podría haber sido definido como casos donde la regla de decisión indica que el sujeto no adquirirá sepsis y el sujeto, en realidad, no adquiere sepsis durante el período de tiempo definido. Si bien todas dichas definiciones alternativas están dentro del alcance de la presente invención, para facilidad de entendimiento de la presente invención, las definiciones para TP, FP, TN, y FN dada por las definiciones (i) a (iv) más arriba se utilizarán en la presente memoria, a menos que se establezca lo contrario.

Tal como será apreciado por aquellos expertos en la técnica, puede utilizarse un número de criterios cuantitativos para comunicar el desempeño de las comparaciones realizadas entre un perfil de biomarcador de ensayo y los perfiles de biomarcador de referencia (por ejemplo, la aplicación de una regla de decisión al perfil de biomarcador de un sujeto de ensayo). Estos incluyen valor predictivo positivo (PPV), valor predictivo negativo (NPV), especificidad, sensibilidad, exactitud, y certeza. Además, pueden utilizarse otras construcciones tales como curvas de operador receptor (ROC) para evaluar el desempeño de la regla de decisión. Según lo utilizado en la presente memoria:

- $PPV = TP / (TP + FP)$
- $NPV = TN / (TN + FN)$
- $especificidad = TN / (TN + FP)$
- $sensibilidad = TP / (TP + FN)$
- $exactitud = certeza = (TN + TP) / N$

Aquí, N es el número de muestras comparadas (por ejemplo, el número de muestras de ensayo para las que se solicita una determinación de sepsis o SIRS). Por ejemplo, considérese el caso en el que hay diez sujetos para los que se solicita la clasificación SIRS/ sepsis. Los perfiles de biomarcadores se construyen para cada uno de los diez sujetos de ensayo. Después, cada uno de los perfiles de biomarcadores se evalúa mediante la aplicación de una regla de decisión, donde la regla de decisión se desarrolló en base a los perfiles de biomarcadores obtenidos de una población de entrenamiento. En este ejemplo, N, de las ecuaciones de más arriba, es igual a 10. Típicamente, N es un número de muestras, donde cada muestra se recolectó de un miembro diferente de una población. Esta población puede, en realidad, ser de dos tipos diferentes. En un tipo, la población comprende sujetos cuyas

muestras y datos fenotípicos (por ejemplo, valores de características de biomarcadores y una indicación de si el sujeto adquirió sepsis o no) se utilizó para construir o depurar una regla de decisión. Dicha población se denomina en la presente memoria como una población de entrenamiento. En el otro tipo, la población comprende sujetos que no fueron utilizados para construir la regla de decisión. Dicha población se denomina en la presente memoria como una población de validación. A menos que se establezca lo contrario, la población representada por N es exclusivamente una población de entrenamiento o exclusivamente una población de validación, en oposición a una mezcla de los dos tipos de población. Se apreciará que las puntuaciones tales como exactitud serán mayores (más cerca de la unidad) cuando son en base a una población de entrenamiento en oposición a una población de validación. No obstante, a menos que se establezca explícitamente lo contrario en la presente memoria, todos los criterios utilizados para evaluar el desempeño de una regla de decisión (u otras formas de evaluación de un perfil de biomarcador de un sujeto de ensayo) que incluye la certeza (exactitud) se refieren a los criterios que fueron medidos mediante la aplicación de la regla de decisión correspondiente a los criterios respecto de una población de entrenamiento o una población de validación. Además, las definiciones para PPV, NPV, especificidad, sensibilidad, y exactitud definidos más arriba también pueden encontrarse en Draghici, Data Analysis Tools for DNA Microanalysis, 2003, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, páginas 342-343.

En algunas realizaciones la población de entrenamiento comprende no convertidores y convertidores. En algunas realizaciones, los perfiles de biomarcadores se construyen a partir de esta población mediante la utilización de muestras biológicas recolectadas de la población de entrenamiento en algún período de tiempo previo a la aparición de sepsis por los convertidores de la población. Como tal, para los convertidores de la población de entrenamiento, una muestra biológica puede ser recolectada dos semanas antes, una semana antes, cuatro días antes, tres días antes, un día antes, o cualquier otro período de tiempo antes de que los convertidores se vuelvan sépticos. En la práctica, dichas recolecciones se obtienen mediante la recolección de una muestra biológica en intervalos de tiempo regulares después de la admisión al hospital con un diagnóstico de SIRS. Por ejemplo, en un abordaje, los sujetos que han sido diagnosticados con SIRS en un hospital son utilizados como una población de entrenamiento. Una vez admitidos al hospital con SIRS, las muestras biológicas son recolectadas de los sujetos en tiempos seleccionados (por ejemplo, a cada hora, cada ocho horas, cada doce horas, diariamente, etc.). Una parte de los sujetos adquiere sepsis y una parte de los sujetos no adquiere sepsis. Para los sujetos que adquieren sepsis, la muestra biológica tomada de los sujetos justo antes de la aparición de sepsis se denominan muestra biológicas T-12. Todas las otras muestras biológicas de los sujetos son indexadas en forma retroactiva respecto de estas muestras biológicas. Por ejemplo, cuando una muestra biológica se ha tomado de un sujeto en forma diaria, la muestra biológica tomada el día antes de la muestra T-12 es denominada como muestra biológica T-36. Los puntos de tiempo para las muestras biológicas para un no convertidor en la población de entrenamiento son identificados mediante la "comparación de tiempo" del sujeto que no se convierte con un sujeto que se convierte. Con el fin de ilustrar, considérese el caso en el que un sujeto en la población de entrenamiento se vuelve clínicamente definido como séptico en su sexto día de reclutamiento. Con el fin de ilustración, para ese sujeto, T-36 es día cuatro del estudio, y la muestra biológica T-36 es la muestra biológica que se obtuvo en el día cuatro del estudio. Del mismo modo, T-36 para el sujeto que no se convierte comparado se considera que es el día cuatro del estudio en este sujeto que no se convierte en pares.

En algunas realizaciones, N es más que uno, más que cinco, más que diez, más que veinte, entre diez y 100, más que 100, o menor que 1000 sujetos. Una regla de decisión (u otras formas de comparación) pueden tener al menos aproximadamente 99% de certeza, p aún más, en algunas realizaciones, contra una población de entrenamiento o una población de validación. En otras realizaciones, la certeza es al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 70% contra una población de entrenamiento o una población de validación. El grado de certeza útil puede variar, dependiendo del método particular de la presente invención. Según lo utilizado en la presente memoria, "certeza" significa "exactitud." En una realización, la sensibilidad y/o especificidad es al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 70% contra una población de entrenamiento o una población de validación. El número de características que puede ser utilizado por una regla de decisión para clasificar un sujeto de ensayo con la certeza adecuada es típicamente aproximadamente cuatro. Dependiendo del grado de certeza solicitada, sin embargo, el número de características utilizadas en una regla de decisión puede ser más menos, pero en todos los casos es al menos dos. En una realización, el número de características que puede ser utilizado por una regla de decisión para clasificar un sujeto de ensayo se optimiza para permitir una clasificación de un sujeto de ensayo con alta certeza.

En los ejemplos más abajo, los datos de abundancia de metabolitos se recolectaron para una pluralidad de biomarcadores en cada sujeto. Es decir, para cada biomarcador en un perfil de biomarcador, se midió una característica, datos de abundancia de metabolitos para el biomarcador. Las reglas de decisión se desarrollan a partir de dichos perfiles de biomarcadores de una población de entrenamiento mediante la utilización de algoritmos de análisis de datos para predecir los fenotipos de muestra en base a patrones de expresión génica observados. Si bien nuevas herramientas de clasificación están siendo desarrolladas constantemente, el cuerpo existente de reconocimiento de patrón y algoritmos de predicción proporcionan algoritmos de análisis de datos efectivos para construir reglas de decisión. Véase, por ejemplo, National Research Council; Panel on Discriminant Analysis Classification and Clustering, Discriminant Analysis and Clustering, Washington, D.C.: National Academy Press.

Además, las técnicas descritas en Dudoit et al., 2002, "Comparison of discrimination methods for the classification of tumors using gene expression data." JASA 97; 77-87, puede utilizarse para desarrollar dichas reglas de decisión.

Los algoritmos de análisis de datos relevantes para desarrollar una regla de decisión incluyen, pero no se limitan a, análisis discriminantes que incluyen técnicas de discriminación lineales, logísticas, y más flexibles (véase, por ejemplo, Gnanadesikan, 1977, *Métodos for Statistical Data Analysis of Multivariate Observations*, Nueva York: Wiley 1977); algoritmos basados en árboles tales como árboles de clasificación y regresión (CART) y variantes (véase, por ejemplo, Breiman, 1984, *Árbol de Regresión y Clasificación*, Belmont, California: Wadsworth International Group, así como la Sección 5.1.3, más abajo); modelos aditivos generalizados (véase, por ejemplo, Tibshirani, 1990, *Generalized Additive Models*, Londres: Chapman and Hall); y redes neuronales (véase, por ejemplo, Neal, 1996, *Bayesian Learning for Neural Networks*, Nueva York: Springer-Verlag; y Insua, 1998, *Feedforward neural networks for nonparametric regression* In: *Practical Nonparametric and Semiparametric Bayesian Statistics*, páginas 181-194, Nueva York: Springer; así como la Sección 1.6, más abajo).

En una realización, se lleva a cabo la comparación del perfil de biomarcador de un sujeto de ensayo con los perfiles de biomarcadores obtenidos de una población de entrenamiento, y comprende aplicar una regla de decisión. La regla de decisión se construye mediante la utilización de un algoritmo de análisis de datos, tal como un algoritmo de reconocimiento de patrón informático. Otros algoritmos de análisis de datos apropiados para construir reglas de decisión incluyen, pero no se limitan a, algoritmo de regresión logística (véase la Sección 1.10, más abajo) o un algoritmo no paramétrico que detecta diferencias en la distribución de los valores de características (por ejemplo, un Ensayo de Ránking con Signos de Wilcoxon (ajustado y no ajustado)). La regla de decisión puede basarse en dos, tres, cuatro, cinco, 10, 20 o más características, correspondientes a observables medidos de uno, dos, tres, cuatro, cinco, 10, 20 o más biomarcadores. En una realización, la regla de decisión se basa en cientos de características o más. Las reglas de decisión también pueden construirse mediante la utilización de un algoritmo de árboles de clasificación. Por ejemplo, cada perfil de biomarcador de una población de entrenamiento puede comprender al menos tres características, donde las características son predictores en un algoritmo de árboles de clasificación (véase la Sección 1.1, más abajo). La regla de decisión predice el agrupamiento dentro de una población (o clase) con una exactitud de al menos aproximadamente al menos aproximadamente 70%, de al menos aproximadamente 75%, de al menos aproximadamente 80%, de al menos aproximadamente 85%, de al menos aproximadamente 90%, de al menos aproximadamente 95%, de al menos aproximadamente 97%, de al menos aproximadamente 98%, de al menos aproximadamente 99%, o aproximadamente 100%.

Los algoritmos de análisis de datos apropiados son conocidos en la técnica, algunos de los que son revisados en Hastie *et al.*, *supra*. En una realización específica, un algoritmo de análisis de datos de la invención comprende Árbol de Regresión y Clasificación (CART; Sección 1.1, más abajo), Árbol de Regresión de Múltiples Aditivos (MART; Sección 1.4, más abajo), Análisis de Predicción para Microarreglos (PAM; Sección 1.2, más abajo) o Análisis de Árboles aleatorios (Sección 1.1, más abajo). Dichos algoritmos clasifican los espectros complejos de materiales biológicos, tales como una muestra sanguínea, para distinguir los sujetos como normales o como que poseen niveles de expresión de biomarcador característicos de un estado de enfermedad particular. En otras realizaciones, un algoritmo de análisis de datos de la invención comprende ANOVA y equivalentes no paramétricos, análisis discriminante lineal (Sección 1.10, más abajo), análisis de regresión logística (Sección 1.10, más abajo), análisis clasificador de vecino más próximo (Sección 1.9, más abajo), redes neuronales (Sección 1.6, más abajo), análisis de componente (Sección 1.8, más abajo), análisis discriminante cuadrático (Sección 1.11, más abajo), clasificadores de regresión (Sección 1.5, más abajo) y máquinas de vector soporte (Sección 1.12, más abajo). Si bien dichos algoritmos pueden utilizarse para construir una regla de decisión y/o incrementar la velocidad y eficiencia de la aplicación de la regla de decisión y evitar la desviación del investigador, uno con experiencia común en la técnica se dará cuenta que los algoritmos en base a computadora no se requieren para llevar a cabo los métodos de la presente invención.

Pueden utilizarse reglas de decisión para evaluar los perfiles de biomarcadores, sin importar el método que se utilizó para generar el perfil de biomarcador. Por ejemplo, las reglas de decisión apropiadas que pueden utilizarse para evaluar los perfiles de biomarcadores generados mediante la utilización de cromatografía gaseosa, según lo debatido en Harper, "Pyrolysis and GC in Polymer Analysis," Dekker, Nueva York (1985). Además, Wagner et al., 2002, *Anal. Chem.* 74:1824-1835 divulga una regla de decisión que mejora la capacidad de clasificar los sujetos en base a espectros obtenidos por tiempo de vuelo estático - espectrometría de masa iónica secundaria (TOF-SIMS). Adicionalmente, Bright et al., 2002, *J. Microbiol. Methods* 48:127-38, divulga un método para distinguir entre cepas bacterianas con alta certeza (79-89% de tasas de clasificación correcta) mediante el análisis de los espectros MALDI-TOF-MS. Dalluge, 2000, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366:701-711, debate el uso de MALDI-TOF-MS y la cromatografía líquida-espectrometría de masa ionización por electropulverización (LC/ESI-MS) para clasificar los perfiles de biomarcadores en muestras biológicas complejas.

Árboles de decisión

Un tipo de regla de decisión que puede construirse mediante la utilización de los valores de características de los biomarcadores identificados en la presente invención es un árbol de decisión. Aquí, el "algoritmo de análisis de datos" es cualquier técnica que puede construir el árbol de decisión, en tanto que el "árbol de decisión" final es la regla de decisión. Un árbol de decisión se construye mediante la utilización de una población de entrenamiento y

algoritmos de análisis de datos específicos. Los árboles de decisión en general son descritos por Duda, 2001, Pattern Classification, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. páginas 395-396. Los métodos en base a árboles dividen el espacio de característica en un conjunto de rectángulos, y después se ajustan a un modelo (como una constante) en cada uno.

- 5 Los datos de la población de entrenamiento incluyen las características (por ejemplo, valores de expresión, o algún otro observable) para los biomarcadores de la presente invención en toda una población de conjunto de entrenamiento. Un algoritmo específico que puede utilizarse para construir un árbol de decisión es un árbol de clasificación y regresión (CART). Otros algoritmos de árbol de decisión específicos incluyen, pero no se limitan a, ID3, C4.5, MART y Árboles aleatorios. CART, ID3, y C4.5 se describen en Duda, 2001, Pattern Classification, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, páginas 396-408 y páginas 411-412. CART, MART, y C4.5 se describen en Hastie et al., 2001, The Elements of Statistical Learning, Springer- Verlag, Nueva York, Capítulo 9. Los Árboles Aleatorios se describen en Breiman, 1999, "Random Forests - Random Features," Technical Report 567, Departamento de Estadísticas, U.C.Berkeley, septiembre de 1999.

- 15 En algunas realizaciones de la presente invención, los árboles de decisión se utilizan para clasificar los sujetos mediante la utilización de características para combinaciones de biomarcadores de la presente invención. Los algoritmos de árboles de decisión pertenecen a la clase de algoritmos de conocimiento supervisado. El objeto de un árbol de decisión es inducir un clasificador (un árbol) de los datos ejemplares del mundo real. Este árbol puede utilizarse para clasificar ejemplos no vistos que no se han utilizado para obtener el árbol de decisión. Como tal, un árbol de decisión se obtiene de los datos de entrenamiento. Los datos de entrenamiento ejemplares contienen datos para una pluralidad de sujetos (la población de entrenamiento). Para cada sujeto respectivo existe una pluralidad de características la clase del sujeto respectivo (por ejemplo, sepsis/SIRS). En una realización de la presente invención, los datos de entrenamiento son datos de expresión para una combinación de biomarcadores en toda la población de entrenamiento.

El siguiente algoritmo describe una derivación de árbol de decisión: Arbol (Ejemplos, Clase, Características)

- 25 Crear un nodo raíz
Si todos los Ejemplos poseen el mismo valor de Clase, dar a la raíz esta etiqueta
De otro modo si la Característica está vacía etiquetar la raíz de acuerdo al valor más común
De otro modo comenzar
Calcular la ganancia de información para cada Característica
30 Seleccionar la Característica A con la mayor ganancia de información y convertirla en la Característica raíz para cada valor posible, v, de esta Característica
Añadir una nueva rama debajo de la raíz, correspondiente a $A = v$
Dejar que los Ejemplos (v) sean aquellos ejemplos con $A = v$
Si los Ejemplos (v) está vacío, convertir la nueva rama en una nodo hoja etiquetado con el valor más común entre los Ejemplos
35 De otro modo dejar que la nueva rama sea el árbol creado por
Árbol (Ejemplos (v), Clase, Características - {A})
Finalizar

- 40 Una descripción más detallada del cálculo de la ganancia de información se muestra a continuación. Si las clases posibles v_i de los ejemplos tienen probabilidades $P(v_i)$ entonces el contenido de información I de la respuesta real está dada por:

$$I(P(v_1), \dots, P(v_n)) = \sum_{i=1}^n -P(v_i) \log_2 P(v_i)$$

- 45 El valor I muestra cuanta información necesitamos para ser capaces de describir el resultado de una clasificación para el conjunto de datos específico utilizado. Suponiendo que el conjunto de datos contiene ejemplos (por ejemplo sujetos) p positivo (por ejemplo desarrollará sepsis) y n negativo (por ejemplo no desarrollará sepsis), la información contenida en una respuesta correcta es:

$$I\left(\frac{p}{p+n}, \frac{n}{p+n}\right) = -\frac{p}{p+n} \log_2 \frac{p}{p+n} - \frac{n}{p+n} \log_2 \frac{n}{p+n}$$

- 50 donde log2 es el logaritmo que utiliza base dos. Al ensayar las características únicas la cantidad de información necesaria para realizar una clasificación correcta puede reducirse. El resto de una característica A específica (por ejemplo, que representa un biomarcador específico) muestra cuanta información que es necesaria puede reducirse.

$$\text{Resto } I(A) = \sum_{i=1}^v \frac{p_i + n_i}{p + n} I\left(\frac{p_i}{p_i + n_i}, \frac{n_i}{p_i - n_i}\right)$$

"v" es el número de valores de atributo único para la característica A en un cierto conjunto de datos, "i" es un cierto valor de atributo, "pi" es el número de ejemplos para la característica A donde la clasificación es positiva (por ejemplo desarrollará sepsis), "ni" es el número de ejemplos para la característica A donde la clasificación es negativa (por ejemplo no desarrollará sepsis). La ganancia de información de una característica A específica se calcula como la diferencia entre el contenido de información para las clases y el resto de la característica A:

$$\text{Ganancia } I(A) = I\left(\frac{p}{p + n}, \frac{n}{p + n}\right) - \text{Resto } I(A)$$

La ganancia de información se utiliza para evaluar que tan importantes son las diferentes características para la clasificación (que tan bien dividen los ejemplos), y la característica con la más alta información.

10 En general hay un número de diferentes algoritmos de árbol de decisión, muchos de los que se describen en Duda, Pattern Classification, Segunda Edición, 2001, John Wiley & Sons, Inc. Los algoritmos de árbol de decisión a menudo requieren consideración del procesamiento de características, medida de impureza, criterio de interrupción, y poda. Los algoritmos de árbol de decisión específicos incluyen, pero no se limitan a árboles de clasificación y regresión (CART), árboles de decisión multivariados, ID3, y C4.5.

15 En un abordaje, cuando se utiliza un árbol de decisión, los datos de expresión génica para una combinación selecta de genes descrita en la presente invención en toda una población de entrenamiento se estandarizan para tener cero medio y varianza unitaria. Los miembros de la población de entrenamiento se dividen aleatoriamente en un conjunto de entrenamiento y un conjunto de ensayo. Por ejemplo, en una realización, dos tercios de los miembros de la población de entrenamiento son colocados en el conjunto de entrenamiento y un tercio de los miembros de la población de entrenamiento se colocan en el conjunto de ensayo. Los valores de expresión para una combinación selecta de biomarcadores descrita en la presente invención se utilizan para construir el árbol de decisión. Después, se determina la capacidad del árbol de decisión para clasificar correctamente los miembros en el conjunto de ensayo. En algunas realizaciones, este cómputo se lleva a cabo varias veces para una combinación dada de biomarcadores. En cada iteración computacional, los miembros de la población de entrenamiento son asignados aleatoriamente al conjunto de entrenamiento y al conjunto de ensayo. Después, la calidad de la combinación de biomarcadores se toma como el promedio de cada iteración del cómputo del árbol de decisión.

Además de los árboles de decisión univariados en los que cada división se basa en un valor de característica para un biomarcador correspondiente, entre el conjunto de biomarcadores de la presente invención, o los valores de características relativos de dos de dichos biomarcadores, los árboles de decisión multivariados pueden implementarse como una regla de decisión. En dichos árboles de decisión multivariados, algunas o todas las decisiones realmente comprenden una combinación lineal de valores de características para una pluralidad de biomarcadores de la presente invención. Dicha combinación lineal puede entrenarse mediante la utilización de técnicas conocidas tales como gradiente descendiente en una clasificación mediante el uso de un criterio de suma de error al cuadrado. Para ilustrar dicho árbol de decisión, considérese la expresión:

$$35 \quad 0,04 x_1 + 0,16 x_2 < 500$$

Aquí, x_1 y x_2 se refieren a dos características diferentes para dos biomarcadores diferentes de entre los biomarcadores de la presente invención. Para podar la regla de decisión, los valores de características x_1 y x_2 se obtienen de las mediciones obtenidas del sujeto no clasificado. Estos valores después se insertan en la ecuación. Si se computa un valor menor que 500, después se toma una primera rama en el árbol de decisión. De otra manera, se toma una segunda rama en el árbol de decisión. Los árboles de decisión multivariados se describen en Duda, 2001, Pattern Classification, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, páginas 408-409.

Otro abordaje que puede utilizarse en la presente invención es regresión adaptativa multivariada mediante la utilización de ranuras (MARS). MARS es un procedimiento adaptativo para la regresión, y se ajusta bien para los problemas de alta dimensión tratados por la presente invención. MARS puede verse como una generalización de la regresión lineal en etapas o una modificación del método CART para mejorar el desempeño de CART en el ajuste de la regresión. MARS se describe en Hastie et al., 2001, The Elements of Statistical Learning, Springer-Verlag, Nueva York, páginas 283-295.

Análisis predictivo de microarreglos (PAM)

Un abordaje para desarrollar una regla de decisión mediante la utilización de valores de características de biomarcadores de la presente invención es el clasificador centroide más próximo. Dichos técnica computa, para cada

clase (sepsis y SIRS), un centroide dado por los niveles de características promedio de los biomarcadores en la clase, y después asigna nuevas muestras a la clase cuyo centroide está más próximo. Este abordaje es similar al agrupamiento k-medias excepto que los grupos son reemplazados por clases conocidas. Este algoritmo puede ser sensible al ruido cuando se utiliza un gran número de biomarcadores. Una mejora de la técnica utiliza la depreciación: para cada biomarcador, las diferencias entre los centroides de clase se fijan en cero si se considera que posiblemente se deben al azar. Este abordaje se implementa en el Análisis de Predicción de Microarreglo, o PAM. Véase, por ejemplo, Tibshirani et al., 2002, Proceedings of the National Academy of Science USA 99; 6567-6572.

La depreciación es controlada por un umbral más abajo cuyas diferencias son consideradas ruido. Los biomarcadores que no muestran ninguna diferencia arriba del nivel de ruido son eliminados. Puede elegirse un umbral mediante validación cruzada. A medida que el umbral disminuye, más biomarcadores son incluidos y los errores de clasificación estimada disminuyen, hasta que alcanzan un piso y comienzan trepar nuevamente como resultado de los biomarcadores de ruido – un fenómeno conocido como sobreadaptación.

Bagging, amplificación, y método de subespacio aleatorio

El Bagging, amplificación, el método de subespacio aleatorio, y los árboles aditivos son algoritmos de análisis de datos conocidos como técnicas de combinación que pueden utilizarse para mejorar las débiles reglas de decisión. Estas técnicas están diseñadas para, y usualmente se aplican a, árboles de decisión, tales como los árboles de decisión descritos en la Sección 1.1, más arriba. Además, dichas técnicas también pueden ser útiles en las reglas de decisión desarrolladas mediante la utilización de otros tipos de algoritmos de análisis de datos tales como análisis discriminante lineal.

En bagging, uno obtiene muestra del conjunto de entrenamiento, lo que genera réplicas de arranque independiente aleatorio, construye la regla de decisión en cada uno de los mismos, y los añade mediante un voto de mayoría simple en la regla de decisión final. Véase, por ejemplo, Breiman, 1996, Machine Learning 24, 123-140; y Efron & Tibshirani, An Introduction to Bootstrap, Chapman & Hall, Nueva York, 1993.

En amplificación, las reglas de decisión se construyen en versiones ponderadas del conjunto de entrenamiento, que son dependientes de los resultados de clasificación previa. Inicialmente, todas las características bajo consideración tienen ponderaciones iguales, y la primera regla de decisión se construye sobre este conjunto de datos. Después, las ponderaciones se cambian de acuerdo al desempeño de la regla de decisión. Las características erróneamente clasificadas obtienen ponderaciones más grandes, y la próxima regla de decisión es amplificada en el conjunto de entrenamiento reponderado. De esta manera, se obtiene una secuencia de conjuntos de entrenamiento y reglas de decisión, que después es combinada mediante el voto de mayoría simple o mediante el voto de mayoría ponderada en la regla de decisión final. Véase, por ejemplo, Freund & Schapire, "Experiments with a new boosting algorithm," Proceedings 13th International Conference on Machine Learning, 1996, 148-156.

Para ilustrar la amplificación, considérese el caso donde hay dos fenotipos exhibidos por la población en estudio, el fenotipo 1 (por ejemplo, que adquiere sepsis durante un período de tiempo definido), y el fenotipo 2 (por ejemplo, SIRS solamente, que significa que el sujeto adquiere sepsis dentro de un período de tiempo definido). Dado un vector de biomarcadores indicadores (por ejemplo, un vector de características que representa dichos biomarcadores) del conjunto de datos de entrenamiento, una regla de decisión $G(X)$ produce una predicción que toma uno de los valores tipo en los dos conjuntos de valores: {fenotipo 1, fenotipo 2}. El índice de error sobre la muestra de entrenamiento es

$$\overline{err} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I(y_i \neq G(x_i))$$

donde N es el número de sujetos en el conjunto de entrenamiento (la suma total de los sujetos que tiene el fenotipo 1 o el fenotipo 2). Por ejemplo, si hay 49 organismos que adquieren sepsis y 72 organismos que permanecen en el estado SIRS, N es 121. Una regla de decisión débil es una cuyo índice de error sea solamente levemente mejor que la suposición aleatoria. En el algoritmo de amplificación, la regla de decisión débil se aplica repetidamente a versiones modificadas de los datos, lo que produce de tal modo una secuencia de reglas de decisión débiles $G_m(x)$, $m = 1, 2, \dots, M$. Las predicciones de todas las reglas de decisión en esta secuencia después se combinan a través de un voto de mayoría ponderada para producir la regla de decisión final:

$$G(x) = \text{sign} \left(\sum_{m=1}^M \alpha_m G_m(x) \right)$$

Aquí $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_M$ son computados mediante el algoritmo de amplificación y su propósito es ponderar la contribución de cada regla de decisión respectiva $G_m(x)$. Su efecto es dar mayor influencia a las reglas de decisión más exactas en la secuencia.

Las modificaciones de datos en cada etapa de amplificación consiste en aplicar las ponderaciones $w_1, w_2, \dots, w_n$ a cada una de las observaciones de entrenamiento (x_i, y_i) , $i = 1, 2, \dots, N$. Inicialmente todas las ponderaciones se fijan en $w_i = 1/N$, de manera que la primera etapa simplemente enseña la regla de decisión sobre los datos en la forma habitual. Para cada iteración sucesiva $m = 2, 3, \dots, M$ las ponderaciones de observación se modifican individualmente y la regla de decisión se reaplica a las observaciones ponderadas. En la etapa m , aquellas observaciones que fueron mal clasificadas por la regla de decisión $G_{m-1}(x)$ inducidas en la etapa previa tienen sus ponderaciones incrementadas, mientras que las ponderaciones se reducen para aquellas que fueron clasificadas correctamente. De ese modo a medida que proceden las iteraciones, las observaciones que son difíciles de clasificar correctamente reciben influencia siempre creciente. Cada regla de decisión sucesiva es de tal modo forzada a concentrarse en aquellas observaciones de entrenamiento que han sido perdidas por las observaciones previas en la secuencia.

El algoritmo de amplificación se resume de la siguiente manera:

1. Inicializar las ponderaciones de observación $w_i = 1/N$, $i = 1, 2, \dots, N$.

2. Para $m = 1$ a M :

(a) Ajustar una regla de decisión $G_m(x)$ al conjunto de entrenamiento mediante la utilización de ponderaciones w_i .

(b) Computar

$$err_m = \frac{\sum_{i=1}^N w_i I(y_i \neq G_m(x_i))}{\sum_{i=1}^N w_i}$$

(c) Computar $\alpha_m = \log((1 - err_m)/err_m)$.

(d)

Conjunto $w_i \leftarrow w_i \cdot \exp[\alpha_m \cdot I(y_i \neq G_m(x_i))], i = 1, 2, \dots, N$.

3. Resultado

$$G(x) = \text{sign} \left[\sum_{m=1}^M \alpha_m G_m(x) \right]$$

En una realización en conformidad con este algoritmo, cada objeto es, en realidad, un factor. Además, en el algoritmo, la regla de decisión actual $G_m(x)$ es inducida en las observaciones ponderadas en la es computado en la línea 2b. La línea 2c calcula la ponderación α_m dada a $G_m(x)$ en la producción del clasificador final $G(x)$ (línea 3). Las ponderaciones individuales de cada una de las observaciones se actualizan para la siguiente iteración en la línea 2d. Las observaciones mal clasificadas por $G_m(x)$ tienen sus ponderaciones escaladas por un factor $\exp(\alpha_m)$, lo que incrementa su influencia relativa para inducir el siguiente clasificador $G_{m+1}(x)$ en la secuencia. En algunas realizaciones, las modificaciones de Freund y Schapire, 1997, Journal of Computer and System Sciences 55, páginas. 119-139, se utilizan métodos de amplificación. Véase, por ejemplo, Hasti et al., The Elements of Statistical Learning, 2001, Springer, Nueva York, Capítulo 10. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la preselección de características se lleva a cabo mediante la utilización de una técnica tal como los métodos de puntuación no paramétricos de Park et al., 2002, Pac. Symp. Biocomput. 6, 52-63,

La preselección de características es una forma de reducción de dimensionalidad en la que los genes que discriminan entre clasificaciones mejor son seleccionados para el uso en el clasificador. Después, se utiliza el procedimiento LogitBoost introducido por Friedman et al., 2000, Ann Stat 28, 337-407 en vez del procedimiento de amplificación de Freund y Schapire. En algunas realizaciones, en la presente invención se utilizan la amplificación y otros métodos de clasificación de Ben-Dor et al., 2000, Journal of Computational Biology 7, 559-583. En algunas realizaciones, se utilizan la amplificación y otros métodos de clasificación de Freund and Schapire, 1997, Journal of Computer and System Sciences 55, 119-139.

En el método de subespacio aleatorio, las reglas de decisión se construyen en subespacios aleatorios del espacio de características de datos. Estas reglas de decisión habitualmente se combinan mediante el voto de mayoría simple en la regla de decisión final. Véase, por ejemplo, Ho, "The Random subspace method for constructing decision forests," IEEE Trans Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1998; 20(8): 832-844.

5 Árboles de regresión de múltiples aditivos

Árboles de Regresión de Múltiples Aditivos (MART) representa otra manera de construir una regla de decisión que puede utilizarse en la presente invención. Un algoritmo genérico para MART es:

1. Inicializar

$$f_0(x) = \arg \min_{\gamma} \sum_{i=1}^N L(y_i, \gamma).$$

10 2. Para $m = 1$ a M :

(a) Para $i = 1, 2, \dots, N$ computar

$$r_{im} = - \left[\frac{\partial L(y_i, f(x_i))}{\partial f(x_i)} \right]_{f=f_{m-1}}$$

(b) Ajustar un árbol de regresión a los blancos r_{im} que dan regiones terminales $R_{jm}, j = 1, 2, \dots, J_m$.

(c) Para $j = 1, 2, \dots, J_m$ computar

$$\gamma_{jm} = \arg \min_{\gamma} \sum_{x_i \in R_{jm}} L(y_i, f_{m-1}(x_i) + \gamma).$$

15

(d) Actualizar

$$f_m(x) = f_{m-1}(x) + \sum_{j=1}^{J_m} \gamma_{jm} I(x \in R_{jm})$$

3. Resultado

$$\hat{f}(x) = f_M(x)$$

20 Los algoritmos específicos se obtienen mediante la inserción de diferentes criterios de pérdida $L(y, f(x))$. La primera línea del algoritmo inicializa al modelo constante óptimo, que es un árbol de nodo terminal único. Los componentes del gradiente negativo computado en la línea 2 (a) se denominan pseudo residuos generalizados, r . Los gradientes para las funciones de pérdida comúnmente utilizadas se resumen en la Tabla 10.2, de HHastie *et al.*, 2001, *The Elements of Statistical Learning*, Springer-Verlag, Nueva York, página 321. El algoritmo para clasificación es similar y se describe en Hastie *et al.*, Capítulo 10. Los parámetros de sintonización asociados al procedimiento MART son el número de iteraciones M y los tamaños de cada uno de los árboles constituyentes $J_m, m = 1, 2, \dots, M$.

25

Reglas de decisión obtenidas de la regresión

En algunas realizaciones, se construye una regla de decisión utilizada para clasificar sujetos mediante la utilización de regresión. En dichas realizaciones, la regla de decisión puede caracterizarse como un clasificador por regresión, preferiblemente un clasificador por regresión logístico. Dicho clasificador por regresión incluye un coeficiente para cada uno de los biomarcadores (por ejemplo, una característica para cada uno de dichos biomarcadores) utilizado para construir el clasificador. En dichas realizaciones, los coeficientes para el clasificador por regresión se computan mediante la utilización de, por ejemplo, un abordaje de máxima probabilidad. En dicho cómputo, se utilizan las características para los biomarcadores (por ejemplo, RT-PCR, datos de micro-arreglo). En realizaciones particulares, se utilizan los datos de marcador molecular de solamente dos subgrupos de rasgos (por ejemplo, subgrupo de

30

35

rasgos a: adquirirá sepsis en un período de tiempo definido y subgrupo de rasgos b: no adquirirá sepsis en un período de tiempo definido) y la variable dependiente está ausente o en presencia de un rasgo particular en el sujetos para los que los datos del biomarcador están disponibles.

En otra realización específica, la población de entrenamiento comprende una pluralidad de subgrupos de rasgos (por ejemplo, tres o más subgrupos de rasgos, cuatro o más subgrupos de rasgos específicos, *etc.*). Estos múltiples subgrupos de rasgos pueden corresponder a estadios discretos en el progreso fenotípico de saludable, a SIRS, a sepsis, a estadios más avanzados de sepsis en una población de entrenamiento. En esta realización específica, puede utilizarse una generalización del modelo de regresión logístico que manipula las respuestas de múltiples categorías para desarrollar una decisión que discrimine entre los diversos subgrupos de rasgos encontrados en la población de entrenamiento. Por ejemplo, los datos medidos para marcadores seleccionados pueden aplicarse a cualquiera de los modelos logit de categoría mu descritos en Agresti, *An Introduction to Categorical Data Analysis*, 1996, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, Capítulo 8, para desarrollar un clasificador capaz de discriminar entre cualquiera de una pluralidad de subgrupos de rasgos representados en una población de entrenamiento.

Redes neuronales

En algunas realizaciones, los datos de características medidos para biomarcadores selectos de la presente invención (por ejemplo, datos RT-PCR, datos de espectrometría de masa, datos de microarreglo) pueden utilizarse para entrenar una red neuronal. Una red neuronal es una regla de decisión de clasificación o regresión de dos estadios. Una red neuronal tiene una estructura en capas que incluye una capa de unidades de entrada (y la desviación) conectada por una cada de ponderaciones a una capa de unidades de salida. Para la regresión, la capa de las unidades de salida típicamente incluye sólo una unidad de salida. Sin embargo, las redes neuronales pueden manipular múltiples respuestas cuantitativas en una manera perfecta.

En las redes neuronales de múltiples capas, hay unidades de entrada (capa de entrada), unidades ocultas (capa oculta), y unidad es de salida (capa de salida). Hay, además, una única unidad de desviación que está conectada a cada unidad distinta de las unidades de entrada. Las redes neuronales se describen en Duda et al., 2001, *Pattern Classification*, Segunda Edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; y Hastie et al., 2001, *The Elements of Statistical Learning*, Springer-Verlag, Nueva York.

Las redes neuronales también se describen en Draghici, 2003, *Data Analysis Tools for DNA Microarrays*, Chapman & Hall/CRC; y Mount, 2001, *Bioinformatics: sequence and genome analysis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. L que se divulga más abajo es algunas formas ejemplares de redes neuronales.

El abordaje básico para el uso de redes neuronales es comenzar con una red no entrenada, presentar un patrón de entrenamiento a la capa de entrada, y pasar señales a través de la red y determinar la salida en la capa de salida. Estas salidas después se comparan con los valores blanco; cualquier diferencia corresponde a un error. Este error o función de criterio es alguna función escalar de las ponderaciones y se minimiza cuando las salidas de red coinciden con las salidas deseadas. De ese modo, las ponderaciones son ajustadas para reducir esta medición de error. Para la regresión, este error puede ser suma de errores al cuadrado. Para la clasificación, este error puede ser error al cuadrado o entropía cruzada (desviación). Véase, por ejemplo, Hastie et al., 2001, *The Elements of Statistical Learning*, Springer-Verlag, Nueva York.

Tres protocolos de entrenamiento comúnmente utilizados son estocástico, de lote, y en línea. En el entrenamiento estocástico, se eligen los patrones en forma aleatoria del conjunto de entrenamiento y las ponderaciones de red son actualizadas para cada presentación de patrón. Las redes no lineales de múltiples capas entrenadas por métodos de gradiente descendiente tales como propagación hacia atrás estocástica realizan una estimación de máxima probabilidad de los valores de ponderación en el clasificador definido por la topología de la red. En el entrenamiento por lotes, todos los patrones presentados a la red antes de que el aprendizaje tome lugar. Típicamente, en el entrenamiento por lotes, se realizan varios pases a través de los datos de entrenamiento. En el entrenamiento en línea, cada patrón es presentado una vez y sólo una vez a la red.

En algunas realizaciones, se da consideran los valores de inicio para las ponderaciones. Si las ponderaciones están cerca de cero, después la parte operativa sigmoide comúnmente utilizada en la capa oculta de una red neuronal (véase, por ejemplo, Hastie et al., 2001, *The Elements of Statistical Learning*, Springer Verlag, Nueva York) es aproximadamente lineal, y por lo tanto la red neuronal colapsa en un clasificador aproximadamente lineal. En algunas realizaciones, los valores de inicio para las ponderaciones se eligen para que sean valores aleatorios cerca de cero. Por lo tanto el clasificador comienza casi lineal, y se vuelve no lineal a medida que las ponderaciones aumentan. Las unidades individuales se localizan a direcciones e introducen no linearidades donde es necesario. El uso de las ponderaciones cero exactas lleva a derivadas cero y perfecta simetría, y el algoritmo nunca se mueve. Alternativamente, comenzar con grandes ponderaciones a menudo lleva a soluciones pobres.

Debido a que la escalada de entradas determina la escalada efectiva de las ponderaciones en la capa inferior, puede tener un gran efecto en la calidad de la solución final. De ese modo, en algunas realizaciones, al principio todos los valores de expresión son estandarizados para tener media cero y una desviación estándar de uno. Esto asegura que todas las entradas sean tratadas de igual manera en el proceso de regularización, y permite que uno

elija un intervalo significativo para las ponderaciones de inicio aleatorias. Con las entradas de estandarización, es típico tomar ponderaciones uniformes aleatorias en el intervalo $[-0.7, +0.7]$.

Un problema recurrente en el uso de redes de tres capas es el número óptimo de unidades ocultas para utilizar en la red. El número de entradas y salidas de una red de tres capas está determinado por el problema a ser resuelto. En la presente invención, el número de entradas para una red neuronal dada será igual al número de biomarcadores seleccionados de la población de entrenamiento. El número de salida para la red neuronal típicamente será uno. Sin embargo, en algunas realizaciones se utiliza más que una salida de manera que más que sólo dos estados puedan ser definidos por la red. Por ejemplo, una red neuronal de múltiples salidas puede utilizarse para discriminar entre, fenotipos saludables, diversos estadios de SIRS, y/o diversos estadios de sepsis. Si se utilizan demasiadas unidades ocultas en una red neuronal, la red tendrá demasiados grados de libertad y es entrenada demasiado, existe un peligro de que la red sobreajustará los datos. Si hay muy pocas unidades ocultas, el conjunto de entrenamiento no puede ser aprendido. En términos generales, sin embargo, es mejor tener demasiadas unidades ocultas que muy pocas. Con muy pocas unidades ocultas, el clasificador podría no tener suficiente flexibilidad para capturar las no linealidades en la fecha; con demasiadas unidades ocultas, la ponderación extra puede achicarse hacia cero si se utiliza la regularización o poda apropiadas, según lo que se describe más abajo. En las realizaciones típicas, el número de unidades ocultas está algo en el intervalo de 5 a 100, con el número que crece con el número de entradas y número de casos de entrenamiento.

Un abordaje general para determinar el número de unidades ocultas para utilizar es aplicar un abordaje de regularización. En el abordaje de regularización, se construye una nueva función de criterio que depende no sólo del error de entrenamiento clásico, sino también de la complejidad del clasificador. Específicamente, la nueva función de criterio penaliza los clasificadores altamente complejos; buscar el mínimo en este criterio es equilibrar el error en el conjunto de entrenamiento con el error en el conjunto de entrenamiento más un término de regularización, que expresa restricciones o propiedades deseables de soluciones: $J = J_{\text{pal}} + \lambda J_{\text{reg}}$. El parámetro λ se ajusta para imponer la regularización más o menos fuertemente. En otras palabras, mayores valores para λ tenderán a achicar las ponderaciones hacia cero: típicamente se utiliza la validación cruzada con un conjunto de validación para estimar λ . Este conjunto de validación puede obtenerse al dejar a un lado un subconjunto aleatorio de la población de entrenamiento. Se han propuesto otras formas de penalidad, por ejemplo la penalidad de eliminación de ponderación (véase, por ejemplo, Hastie et al., 2001, *The Elements of Statistical Learning*, Springer Verlag, Nueva York).

Otra metodología para determinar el número de unidades ocultas para utilizar es eliminar -podar- las ponderaciones que menos se necesitan. En una metodología, las ponderaciones con la magnitud más pequeña se eliminan (se fijan en cero). Dicha poda basada en la magnitud puede funcionar, pero no es óptima; a veces las ponderaciones con pequeñas magnitudes son importantes para los datos de entrenamiento y aprendizaje. En algunas realizaciones, en vez de utilizar un abordaje de poda basado en la magnitud, se computan las estadísticas de Wald. La idea fundamental en las estadísticas de Wald es que pueden utilizarse para estimar la importancia de una unidad oculta (ponderación) en un clasificador. Después, las unidades ocultas que poseen la menor importancia se eliminan (al fijar sus ponderaciones de entrada y salida en cero). Dos algoritmos en este sentido son los algoritmos Lesión Cerebral Óptima (OBD) y el Cirujano Cerebral Óptimo (OBS) que utilizan la aproximación de segundo orden para predecir como el error de entrenamiento depende de una ponderación, y elimina la ponderación que lleva al incremento más pequeño en el error de entrenamiento.

La Lesión Cerebral Óptima y el Cirujano Cerebral Óptimo comparten el mismo abordaje básico para entrenar una red a error mínimo local en la ponderación w , y después podar una ponderación que lleva al incremento más pequeño en el error de entrenamiento. El incremento funcional previsto en el error para un cambio en el vector de ponderación completo δw es:

$$\delta J = \left(\frac{\partial J}{\partial w} \right)^t \cdot \delta w + \frac{1}{2} \delta w^t \cdot \frac{\partial^2 J}{\partial w^2} \cdot \delta w + O(\|\delta w\|^3)$$

donde:

$$\frac{\partial^2 J}{\partial w^2}$$

es la matriz de Hessian. El primer término desaparece en un mínimo local en error; los términos del tercer orden y órdenes más altos se ignoran. La solución general para minimizar esta función dada la restricción de eliminar una ponderación es:

$$\delta w = - \left[\frac{w_q}{H^{-1}} \right]_{qq} H^{-1} \cdot u_q \text{ and } L_q = \frac{1}{2} - \left[\frac{w_q^2}{H^{-1}} \right]_{qq}$$

- 5 Aquí, u_q es el vector unitario a lo largo de la dirección q th en el espacio de ponderación y L_q es la aproximación a punto sobresaliente de la ponderación q – el incremento en el error de entrenamiento si la ponderación q se poda y las otras ponderaciones se actualizan δw . Estas ecuaciones requieren la inversa de H . Un método para calcular la matriz inversa es comenzar con un valor pequeño,

$$H_0^{-1} = \alpha^{-1} I$$

- 10 donde α es un parámetro pequeño – efectivamente una constante de ponderación. Después la matriz se actualiza con cada patrón de acuerdo a:

$$H_{m+1}^{-1} = H_m^{-1} - \frac{H_m^{-1} X_{m+1} X_{m+1}^T H_m^{-1}}{\frac{n}{a_m} + X_{m+1}^T H_m^{-1} X_{m+1}} \quad \text{Eqn. 1}$$

- 15 Donde las suscripciones corresponden al patrón que está siendo presentado y a_m disminuye con m . Después de que el conjunto de entrenamiento se ha presentado, la matriz inversa de Hessian está dada por $H^{-1} = H_n^{-1}$. En forma algorítmica, el método de Cirujano Cerebral Óptimo es:

Comenzar a inicializar nH , w , θ

Entrenar una red razonablemente grande al error mínimo computa H^{-1} por la ecuación 1

$$q^* \leftarrow \arg \min_q w_q^2 / (2 [H^{-1}]_{qq}) \quad (\text{saliency } L_q)$$

$$w \leftarrow w - \left[\frac{w_{q^*}}{H^{-1}} \right]_{q^* q^*} H^{-1} e_{q^*} \quad (\text{saliency } L_{q^*})$$

hasta $J(w) > \theta$

- 20 regresar w

finalizar

- 25 El método de Lesión Cerebral Óptima es más simple a nivel computacional debido a que el cálculo de la matriz inversa de Hessian en la línea 3 es particularmente simple para una matriz diagonal. El algoritmo de más arriba finaliza cuando el error es mayor que un criterio inicializado para que sea θ . Otra metodología es cambiar la línea 6 para terminar cuando el cambio en $J(w)$ debido a la eliminación de una ponderación sea mayor que algún valor de criterio. En algunas realizaciones, la red neuronal de propagación hacia atrás. Véase, por ejemplo Abdi, 1994, "A neural network primer," J. Biol System. 2, 247-283.

Agrupamiento

En algunas realizaciones, se utilizan las características para los biomarcadores selectos de la presente invención para agrupar un conjunto de entrenamiento. Por ejemplo, considérese el caso en el que se utilizan diez características (correspondientes a diez biomarcadores) descritas en la presente invención. Cada miembro m de la población de entrenamiento tendrá valores de características (por ejemplo valores de expresión) para cada uno de los diez biomarcadores. Dichos valores de un miembro m en la población de entrenamiento definen el vector:

$$X_{1m}, X_{2m}, X_{3m}, X_{4m}, X_{5m}, X_{6m}, X_{7m}, X_{8m}, X_{9m}, X_{10m}$$

donde X_{im} es el nivel de expresión del i th biomarcador en el organismo m . Si hay m organismos en el conjunto de entrenamiento, la selección de i biomarcadores definirá m vectores. Obsérvese que los métodos de la presente invención no requieren que cada valor de expresión de todo biomarcador único utilizado en los vectores esté representado en cada vector único m . En otras palabras, aún pueden utilizarse los datos de un sujeto en el que uno de los i th biomarcadores no se encuentra para el agrupamiento. En dichos casos, al valor de expresión perdido se le asigna un "cero" o algún otro valor normalizado. En algunas realizaciones, previo al agrupamiento, los valores de características se normalizan para tener un valor medio de cero y una varianza de unidad. Aquellos miembros de la población de entrenamiento que exhiben patrones de expresión similares en todo el grupo de entrenamiento tenderán a agruparse juntos. Se considera que una combinación particular de genes de la presente invención es un buen clasificador en este aspecto de la invención cuando los vectores se agrupan en los grupos de rasgos encontrados en la población de entrenamiento. Por ejemplo, si la población de entrenamiento incluye clase a : sujetos que no desarrollan sepsis, y clase b : sujetos que desarrollan sepsis, un clasificador de agrupamiento ideal agrupará la población en dos grupos, con un grupo que representa únicamente la clase a y el otro grupo que representa únicamente la clase b .

El agrupamiento se describe en las páginas 211-256 de Duda y Hart, *Pattern Classification and Scene Analysis*, 1973, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, (de aquí en adelante "Duda 1973"). Según lo que se describe en la Sección 6.7 de Duda 1973, el problema de agrupamiento se describe como uno de encontrar agrupamientos naturales en un conjunto de datos. Para identificar los agrupamientos naturales, se tratan dos temas. Primero, se determina una forma de medir la similitud (o disimilitud) entre dos muestras. Esta métrica (medición de similitud) se utiliza para asegurar que las muestras en un agrupamiento son más similares una con otra que lo que lo son con las muestras en otros agrupamientos. Segundo, se determina un mecanismo para dividir los datos en grupos mediante la utilización de la medición de similitud.

Las mediciones de similitud se debaten en la Sección 6.7 de Duda 1973, donde se establece que una manera de comenzar una investigación de agrupamiento es definir una función distancia y computar la matriz de distancias entre todos los pares de muestras en un conjunto de datos. Si la distancia es una buena medición de similitud, después la distancia entre las muestras en el mismo grupo será significativamente menor que la distancia entre las muestras en diferentes grupos. Sin embargo, según lo que se establece en la página 215 de Duda 1973, el agrupamiento no requiere el uso de una métrica de distancia. Por ejemplo, puede utilizarse una función de similitud no métrica $s(x, x')$ para comparar dos vectores x y x' . Convencionalmente, $s(x, x')$ es una función simétrica cuyo valor es grande cuando x y x' son algo "similares". Se proporciona un ejemplo de una función de similitud no métrica $s(x, x')$ en la página 216 de Duda 1973.

Una vez que un método para medir "similitud" o "disimilitud" entre puntos en un conjunto de datos ha sido seleccionado, el agrupamiento requiere una función de criterio que mida la calidad de agrupamiento de cualquier división de los datos. Las divisiones del conjunto de datos que extrema la función de criterio se utilizan para agrupar los datos. Véase la página 217 de Duda 1973. As funciones de criterio se debaten en la Sección 6.8 de Duda 1973.

Más recientemente, se ha publicado Duda et al., *Pattern Classification*, 2° edición, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York. Las páginas 537-563 describen el agrupamiento en detalle. Más información sobre técnicas de agrupamiento pueden encontrarse en Kaufman and Rousseeuw, 1990, *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis*, Wiley, Nueva York, NY; Everitt, 1993, *Cluster analysis* (3d ed.), Wiley, Nueva York, NY; y Backer, 1995, *Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. Las técnicas de agrupamiento ejemplares particulares que pueden utilizarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agrupamiento jerárquico (agrupamiento aglomerativo mediante la utilización del algoritmo vecino más próximo, algoritmo vecino más lejano, el algoritmo de conexión promedio, el algoritmo centroide, o el algoritmo de suma de cuadrados), agrupamiento k -media, algoritmo de agrupamiento k -medias difuso, y agrupamiento de Jarvis-Patrick.

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) se ha propuesto para analizar los datos de expresión génica. Más en general, PCA puede utilizarse para analizar los datos de valor de característica de los biomarcadores de la presente invención para construir una regla de decisión que discrimine convertidores de no convertidores. El análisis de componentes principales es una técnica clásica para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos al transformar los datos en un nuevo conjunto de variable (componentes principales) que resumen las características de los datos. Véase, por ejemplo, Jolliffe, 1986, *principle component analysis*, Springer, Nueva York. El análisis de

componentes principales también se describe en Draghici, 2003, Data Analysis Tools for DNA Microarrays, Chapman & Hall/CRC. Lo que sigue son los ejemplos no restrictivos del análisis de componentes principales.

Los componentes principales (PCs) no son correlacionados y están ordenados de manera tal que el k th PC posee la k th varianza más grande entre los PCs. El k th PC puede interpretarse como la dirección que maximiza la variación de las proyecciones de los puntos de datos de manera tal que es ortogonal al primer $k - 1$ PCs. Los primeros pocos PCs capturan la mayor parte de la variación en el conjunto de datos. En oposición, los últimos pocos PCs a menudo se supone que capturan solamente el 'ruido' residual en los datos.

PCA también puede utilizarse para crear un clasificador en conformidad con la presente invención. En dicho abordaje, los vectores para los biomarcadores selectos de la presente invención pueden construirse de la misma manera descrita para el agrupamiento más arriba. En realidad, el conjunto de vectores, donde cada vector representa los valores de características (por ejemplo, valores de abundancia) para los genes electos de un miembro particular de la población de entrenamiento, puede verse como una matriz. En algunas realizaciones, esta matriz está representada en un método de Free-Wilson de descripción binaria cualitativa de monómeros (Kubinyi, 1990, 3D QSAR in drug design theory methods and applications, Pergamon Press, Oxford, páginas 589-638), u está distribuida en un espacio máximamente comprimido mediante la utilización de PCA de manera que le primer componente principal (PC) capture la mayor cantidad de información de varianza posible, El segundo component principal (PC) capture la segunda mayor cantidad de toda la información de varianza, etcétera hasta que toda la información de varianza en la matriz haya sido considerada.

Después, se traza cada uno de los vectores (donde cada vector representa un miembro de la población de entrenamiento). Son posibles muchos diferentes tipos de planos. En algunas realizaciones, se realiza un plano de una dimensión. En este plano de una dimensión, se traza el valor para el primer principal componente de cada uno de los miembros de la población de entrenamiento. En esta forma de plano, la expectativa es que los miembros de un primer subgrupo (por ejemplo aquellos sujetos que no desarrollan sepsis en un período de tiempo determinado) se agrupen en un intervalo de valores del primer componente principal y los miembros de un segundo subgrupo (por ejemplo, aquellos sujetos que desarrollan sepsis en un período de tiempo determinado) se agruparán en un segundo intervalo de valores del primer componente principal.

En un ejemplo ideal, la población de entrenamiento comprende dos subgrupos: "sepsis" y "SIRS." El primer componente principal se computa mediante la utilización de los valores de expresión del marcador molecular para los biomarcadores selectos de la presente invención en todo el conjunto de datos de la población de entrenamiento completa. Después, cada miembro del conjunto de entrenamiento se traza como una función del valor para el primer componente principal. En este ejemplo ideal, aquellos miembros de la población de entrenamiento en la que el primer componente principal es positivo son los "respondedores" y aquellos miembros de la población de entrenamiento en los que el primer componente principal es negativo son "sujetos con sepsis."

En algunas realizaciones, los miembros de la población de entrenamiento se trazan contra más que un componente principal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los miembros de la población de entrenamiento se trazan en un plano de dos dimensiones en el que la primera dimensión es el primer componente principal y la segunda dimensión es el segundo componente principal. En dicho plano de dos dimensiones, la expectativa es que los miembros de cada subgrupo representado en la población de entrenamiento se agruparán en grupos discretos. Por ejemplo, un primer grupo de miembros en el plano de dos dimensiones representará sujetos que desarrollan sepsis en un período de tiempo dado y un segundo grupo de miembros en el plano de dos dimensiones representará sujetos que no desarrollan sepsis en un período de tiempo dado.

Análisis de vecino más próximo

Los clasificadores del vecino más próximo se basan en la memoria y no requieren que ningún clasificador sea ajustado. Dado un punto de pregunta x_0 , se identifican k puntos de entrenamiento $x(r)$, $r = 1, \dots, k$ lo más próximo en distancia a x_0 y después el punto x_0 se clasifica mediante la utilización de k vecinos más próximos. Los enlaces pueden romperse en forma aleatoria. En algunas realizaciones, la distancia de Euclidean en el espacio de características se utiliza para determinar la distancia como:

$$d_{(i)} = \|x_{(i)} - x_0\|.$$

Típicamente, cuando se utiliza el algoritmo de vecino más próximo, los datos de expresión utilizados para computar el discriminante lineal se estandarizan para que tengan media cero y varianza 1. En la presente invención, los miembros de la población de entrenamiento se dividen en forma aleatoria en un conjunto de entrenamiento y un conjunto de ensayo. Por ejemplo, en una realización, dos tercios de los miembros de la población de entrenamiento se colocan en el conjunto de entrenamiento y un tercio de los miembros de la población de entrenamiento se colocan en el conjunto de ensayo. Una combinación selecta de biomarcadores de la presente invención representa el espacio de características en el que los miembros del conjunto de ensayo son trazados. Después, se computa la capacidad del conjunto de entrenamiento de caracterizar correctamente los miembros del conjunto de ensayo. En

algunas realizaciones, el cómputo de vecino más próximo se lleva a cabo varias veces para una combinación dada de biomarcadores de la presente invención. En cada iteración del cómputo, los miembros de la población de entrenamiento son asignados aleatoriamente al conjunto de entrenamiento y el conjunto de ensayo. Después, la calidad de la combinación de biomarcadores se toma como el promedio de cada iteración del cómputo de vecino más próximo.

La regla de vecino más próximo puede depurarse para tratar temas de previos de clase desigual, costos de mala clasificación diferencial, y selección de características. Muchas de estas depuraciones incluyen alguna forma de voto de ponderación para los vecinos. Para más información acerca del análisis de vecino más próximo, véase Duda, Pattern Classification, Segunda Edición, 2001, John Wiley & Sons, Inc; y Hastie, 2001, The Elements of Statistical Learning, Springer, Nueva York.

Análisis de discriminante lineal

El análisis de discriminante lineal (LDA) intenta clasificar un sujeto en una de dos categorías en base a ciertas propiedades del objeto. En otras palabras, LDA ensaya si los atributos del objeto medidos en un experimento predicen la categorización de los objetos. LDA típicamente requiere variables independientes continuas y una variable dependiente categórica dicótoma. En la presente invención, los valores de características para las combinaciones selectas de los biomarcadores de la presente invención en todo un subconjunto de la población de entrenamiento sirve como las variables independientes continuas requeridas. El subgrupo de clasificación de rasgos de cada uno de los miembros de la población de entrenamiento sirve como la variable dependiente categórica dicótoma.

LDA solicita la combinación lineal de variables que maximiza la relación de entre la varianza del grupo y dentro de la varianza del grupo mediante la utilización de información de agrupamiento. Implícitamente, las ponderaciones lineales utilizadas por LDA dependen de cómo los valores de características de un marcador molecular en todo el conjunto de entrenamiento se separan en dos grupos (por ejemplo, un grupo a que desarrolla sepsis durante un período de tiempo definido y un grupo b que no desarrolla sepsis durante un período de tiempo definido) y cómo estos valores de características se correlacionan con los valores de características de otros biomarcadores. En algunas realizaciones, LDA se aplica a la matriz de datos de N miembros en la muestra de entrenamiento mediante K biomarcadores en una combinación de biomarcadores descrita en la presente invención. Después, se traza el discriminante lineal de cada miembro de la población de entrenamiento. Idealmente, aquellos miembros de la población de entrenamiento que representan un primer subgrupo (por ejemplo aquellos sujetos que desarrollan sepsis en un período de tiempo definido) se agruparán en un intervalo de valores discriminantes lineales (por ejemplo, negativo) y aquellos miembros de la población de entrenamiento que representan un segundo subgrupo (por ejemplo aquellos sujetos que no desarrollarán sepsis en un período de tiempo definido) se agrupará en un segundo intervalo de valores discriminantes lineales (por ejemplo, positivo). El LDA se considera más exitoso cuando la separación entre los grupos de valores discriminantes es mayor. Para más información sobre el análisis de discriminante lineal, véase Duda, Pattern Classification, Segunda Edición, 2001, John Wiley & Sons, Inc; y Hastie, 2001, The Elements of Statistical Learning, Springer, Nueva York; y Venables & Ripley, 1997, Modern Applied Statistics with s- plus, Springer, Nueva York.

Análisis de discriminante cuadrático

El análisis de discriminante cuadrático (QDA) toma los mismos parámetros de entrada y devuelve los mismos resultados que el LDA. QDA utiliza ecuaciones cuadráticas, en vez de ecuaciones lineales, para producir los resultados. LDA y QDA son intercambiables, y cual utilizar es un tema de preferencia y/o disponibilidad de software para soportar el análisis. La regresión logística toma los mismos parámetros de entrada y devuelve los mismos resultados como que LDA y QDA.

Máquina de vectores soporte

En algunas realizaciones de la presente invención, las máquinas de vectores soporte (SVMs) se utilizan para clasificar sujetos mediante la utilización de valores de características de los genes descritos en la presente invención. Las SVMs on un tipo relativamente nuevo de algoritmo de aprendizaje. Véase, por ejemplo, Cristianini y Shawe-Taylor, 2000, An Introduction to Soporte Vector Machines, Cambridge University Press, Cambridge; Boser et al., 1992, "A training algorithm for optimal margin classifiers," en Proceedings of the 5th Annual ACM Workshop on Computational Learning Theory, ACM Press, Pittsburgh, PA, páginas 142-152; Vapnik, 1998, Statistical Learning Theory, Wiley, Nueva York; Mount, 2001, Bioinformatics: sequence and genome analysis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, Duda, Pattern Classification, Segunda Edición, 2001, John Wiley & Sons, Inc.; y Hastie, 2001, The Elements of Statistical Learning, Springer, Nueva York; y Furey et al., 2000, Bioinformatics 16, 906-914. Cuando se utilizan para clasificación, las SVMs separan un conjunto dado de datos de etiquetado binario datos de entrenamiento con un hiperplano que se separa máximamente de los mismos. Para los casos en los que ninguna separación lineal es posible, las SVMs pueden funcionar en combinación con la técnica de 'kernels', que realiza automáticamente un mapeo no lineal en un espacio de características. El hiperplano encontrado por la SVM en el espacio de características corresponde a límite de decisión no lineal en el espacio de entrada.

En una metodología, cuando se utiliza una SVM, los datos de características se estandarizan para tener media cero y varianza unitaria y los miembros de una población de entrenamiento se dividen en forma aleatoria en un conjunto de entrenamiento y un conjunto de ensayo. Por ejemplo, en una realización, dos tercios de los miembros de la población de entrenamiento se colocan en el conjunto de entrenamiento y un tercio de los miembros de la población de entrenamiento se colocan en el conjunto de ensayo. Los valores de expresión para un cómputo de genes descritos en la presente invención se utilizan para entrenar la SVM. Después se determina la capacidad de una SVM entrenada para clasificar correctamente los miembros en el conjunto de ensayo. En algunas realizaciones, este cómputo se lleva a cabo varias veces para una combinación dada de marcadores moleculares. En cada iteración del cómputo, los miembros de la población de entrenamiento son asignados aleatoriamente al conjunto de entrenamiento y el conjunto de ensayo. Después, la calidad de la combinación de biomarcadores se toma como el promedio de cada iteración del cómputo de SVM.

Métodos evolucionarios

Inspirados por el proceso de evolución biológica, los métodos evolucionarios del diseño de la regla de decisión emplean búsqueda estocástica para una regla de decisión. En una perspectiva amplia, dichos métodos crean varias reglas de decisión – una población – a partir de una combinación de biomarcadores descrita en la presente invención. Cada regla de decisión varía algo de la otra. Después, las reglas de decisión obtienen una puntuación con relación a los datos de características en toda la población de entrenamiento. En analogía con la evolución biológica, la puntuación resultante (escalar) a veces se denomina la aptitud. Las reglas de decisión se marcan de acuerdo a su puntuación y las mejores reglas de decisión son retenidas (alguna parte de la población total de reglas de decisión). Nuevamente, manteniendo la terminología biológica, esto se denomina supervivencia de lo más apto. Las reglas de decisión se alteran estocásticamente en la siguiente generación – los niños o prole. Algunas reglas de decisión de la prole tendrán puntuaciones más altas que sus progenitores en la generación anterior, algunos tendrán puntuaciones más bajas. El proceso general después se repite para la generación posterior: las reglas de decisión obtienen una puntuación y las mejores se retienen, se altera en forma aleatoria para dar aún otra generación, etcétera. En parte, debido a la clasificación, cada generación posee, en promedio, una puntuación levemente más alta que la anterior. El proceso se interrumpe cuando la mejor única regla de decisión en una generación posee una puntuación que excede un valor de criterio deseado. Mas información acerca de los métodos evolucionarios se encuentra en por ejemplo, Duda, Pattern Classification, Segunda Edición, 2001, John Wiley & Sons, Inc.

Otros algoritmos de análisis de datos

Los algoritmos de análisis de datos descritos más arriba son simplemente ejemplos e los tipos de métodos que pueden utilizarse para construir una regla de decisión para discriminar convertidores de no convertidores. Además, pueden utilizarse combinaciones de las técnicas descritas más arriba. Se han descrito algunas combinaciones, tales como el uso de la combinación de árboles de decisión y amplificación. Sin embargo, muchas otras combinaciones son posibles. Además, otras técnicas en la técnica tales como Búsqueda de Proyecciones y Voto Ponderado pueden utilizarse para construir reglas de decisión.

Dispositivos para el diagnóstico o pronóstico, o monitoreo, de una afección inflamatoria sistémica

También se describen en la presente memoria dispositivos útiles para el diagnóstico, pronóstico o monitoreo de una afección inflamatoria sistémica. Algunos dispositivos comprenden una computadora que posee una unidad de procesamiento central y una memoria acoplada a la unidad de procesamiento central. La memoria almacena las instrucciones para evaluar si una o más cantidades de uno o más biomarcadores de un sujeto de ensayo en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria sistémica satisfacen un primer conjunto de valores. Satisfacer el primer conjunto de valores predice que el sujeto de ensayo es posible que desarrolle la afección inflamatoria sistémica.

La FIG. 1 detalla un sistema ejemplar que soporta la funcionalidad descrita más arriba. El sistema es preferiblemente un sistema informático 10 que posee:

- una unidad de procesamiento central 22;
- una unidad de almacenamiento no volátil principal 14, por ejemplo, un drive de disco duro, para almacenar software y datos, la unidad de almacenamiento 14 controlada por el controlador de almacenamiento 12;
- una memoria de sistema 36, preferiblemente memoria de acceso aleatorio de alta velocidad (RAM), para almacenar los programas de control del sistema, datos, y programas de aplicación, que comprende programas y datos cargados de la unidad de almacenamiento no volátil 14; la memoria del sistema 36 también puede incluir memoria de sólo lectura (ROM);
- una interfaz de usuario 32, que comprende uno o más dispositivos de entrada (por ejemplo, teclado 28) y un visualizador 26 u otro dispositivo de salida;
- una tarjeta de interfaz de red 20 para conectar a cualquier red de comunicación alámbrica o inalámbrica 34 (por ejemplo, una red de área amplia tal como Internet);

- un bus interno 30 para interconectar los elementos antes mencionados del sistema; y
- una fuente de energía 24 para impulsar los elementos antes mencionados.

La operación de la computadora 10 se controla básicamente mediante el sistema de operación 40, que es ejecutado por la unidad de procesamiento central 22. El sistema de operación 40 puede almacenarse en la memoria del sistema 36. Además del sistema de operación 40, un sistema de implementación típico la memoria 36 incluye:

- sistema de archivo 42 para controlar el acceso a diversos archivos y estructuras de datos utilizados por la presente invención;
- un conjunto de datos de entrenamiento 44 para el uso en la construcción de una o más reglas de decisión en conformidad con la presente invención;
- un módulo de algoritmo de análisis de datos 54 para procesar los datos de entrenamiento y construir reglas de decisión;
- una o más reglas de decisión 56;
- un módulo de evaluación de perfil de biomarcador 60 para determinar si una pluralidad de cantidades en un perfil de biomarcador de un sujeto de ensayo satisface un primer conjunto de valores;
- un perfil de biomarcadores de sujeto de ensayo 62 que comprende biomarcadores 64 y, para cada uno de dichos biomarcadores, cantidades 66; y
- una base de datos 68 de biomarcadores selectos de la presente invención.

Según lo que se ilustra en la FIG. 1, la computadora 10 comprende módulos de programa de software y estructuras de datos. Las estructuras de datos almacenadas en la computadora 10 pueden incluir conjunto de datos de entrenamiento 44, reglas de decisión 56, perfil de biomarcador del sujeto de ensayo 62, y/o base de datos de biomarcadores 68. Cada una de estas estructuras de datos puede comprender cualquier forma de sistema de almacenamiento de datos que incluye, pero sin limitarse a, un ASCII plano o archivo binario, una hoja de cálculo de Excel, una base de datos relacional (SQL), o una base de datos de procesamiento analítico en línea (OLAP) (MDX y/o variantes de la misma). EN algunas realizaciones específicas, dichas estructuras de datos son cada una en forma de una o más bases de datos que incluyen estructura jerárquica (por ejemplo, un esquema estrella). En algunas realizaciones, dichas estructuras de datos son cada una en forma de bases de datos que no poseen jerarquía explícita (por ejemplo, tablas de dimensión que no están dispuestas en forma jerárquica).

En algunas realizaciones, cada una de las estructuras de datos almacenadas o accesibles al sistema 10 son estructuras de datos únicas. En otras realizaciones, dichas estructuras de datos en realidad comprenden una pluralidad de estructuras de datos (por ejemplo, bases de datos, archivos) que pueden o no estar albergados por la misma computadora 10. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el conjunto de datos de entrenamiento 44 comprende una pluralidad de hojas de cálculo de Excel que son almacenadas en la computadora 10 y/o en computadoras que son direccionables por computadora 10 en toda la red de área amplia 34. En otro ejemplo, el conjunto de datos de entrenamiento 44 comprende una base de datos que está almacenada en la computadora 10 o está distribuida en toda una o más computadoras que son direccionables por computadora 10 en toda la red de área amplia 34.

Se apreciará que muchos de los módulos y estructuras de datos ilustrados en la FIG. 1 pueden ubicarse en una o más computadoras remotas. Por ejemplo, algunas realizaciones de la presente aplicación son implementaciones tipo servicio en red. En dichas realizaciones, el módulo de evaluación del perfil de biomarcador 60 y/o otros módulos pueden residir en una computadora cliente que está en comunicación con la computadora 10 a través de la red 34. En algunas realizaciones, por ejemplo, el módulo de evaluación de perfil de biomarcador 60 puede ser una página web interactiva.

En algunas realizaciones, el conjunto de datos de entrenamiento 44, reglas de decisión 56, y/o base de datos de biomarcador 68 ilustrados en la Figura 1 están en una única computadora (computadora 10) y en otras realizaciones uno o más de dichas estructuras de datos y módulo son albergados por una o más computadoras remotas (no mostradas). Cualquier disposición de las estructuras de datos y módulos de software en una o más computadoras está dentro del alcance de la presente invención siempre que estas estructuras de datos y módulos de software sean direccionables respecto uno de otro en toda una red o mediante medios electrónicos. De ese modo, la presente invención abarca completamente un amplio arreglo de sistemas de computadora.

EJEMPLOS

6.1 Ejemplo 1: Análisis de metabolitos séricos de Pacientes con Sepsis y SIRS

Los Ejemplos 1 y 2 demuestran la utilidad de los biomarcadores de la invención para el diagnóstico y pronóstico de

sepsis y SIRS. Los perfiles de biomarcador de referencia se establecieron para dos poblaciones de pacientes voluntarios.

Poblaciones de pacientes

- 5 Los pacientes se dividieron en dos poblaciones. La primera población ("el grupo con SIRS") representa los pacientes que desarrollaron SIRS y que ingresaron en el presente estudio el "Día 1" pero que no progresaron a sepsis durante su estadía en el hospital. La segunda población ("el grupo con sepsis") representa los pacientes que del mismo modo desarrollaron SIRS e ingresaron en el presente estudio el Día 1 pero que progresaron a sepsis típicamente al menos varios días después de ingresar al estudio.

Recolección de muestras

- 10 Las muestras sanguíneas fueron tomadas aproximadamente cada 24 horas de cada grupo de estudio. La sospecha clínica de sepsis en el grupo con sepsis se produjo en la "hora 0." Las muestras fueron tomadas en la "hora - 12 horas", "hora -36 horas" y " hora -60 horas" anterior al día of sospecha clínica de la aparición de sepsis en el grupo con sepsis. Es decir, la muestras del grupo con sepsis incluyeron aquellas tomadas en el día de ingreso en el estudio (Día 1), 60 horas previo a la sospecha clínica de sepsis (hora -60 horas), 36 horas previo a la sospecha clínica de sepsis (hora -36 horas), y en el día de la sospecha clínica de la aparición de sepsis (hora -12 horas).

Preparación de las muestras

- 20 A 200 PL de metanol enfriado con hielo (almacenado a -20 C) se añadió 20 PL de plasma humano. La mezcla después se sometió a vórtex durante 60 segundos antes de que se incubara a 4°C durante 20 minutos para ayudar a la precipitación de proteínas plasmáticas. La mezcla después se centrifugó a 13k rpm durante 10 minutos a 4°C hasta proteínas pellet. El sobrenadante (100 PL) que contenía metabolitos después se transfirió a un tubo Eppendorf y se evacuó para secar mediante Speed-Vac. Para el análisis de espectrometría de masa (MS), los metabolitos se prepararon con dilución final de 1:50 con respecto al plasma original en metanol al 50% y ácido fórmico al 0,5% en agua desionizada con 200 nM de reserpina como un control interno.

Espectrometría de masa de los metabolitos

- 25 El análisis de MS de los extractos de metabolitos séricos se llevó a cabo en un sistema Qstar XL MS/MS (Applied Biosystems). La muestra se vertió en MS por el Nanomate (Advion Bioscience), un sistema de nano electropulverización automatizado. La electropulverización se llevó a cabo en voltaje de pulverización de 1.5 kV y presión de pulverización de 0.15 psi. El espectro de MS se acumuló durante 3 minutos con masa sobre carga (M/Z) que variaba de 100 a 1200 Dalton.

30 6.2 Ejemplo 2: Diagnóstico y pronóstico de Sepsis y SIRS con el biomarcador 496.3 o biomarcador 518.3 de la invención

Este Ejemplo proporciona estudios en el transcurso de tiempo de los biomarcadores 496.3 y 518.3 y demuestra su utilidad para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de sepsis y SIRS. El biomarcador 496.3 es 11-O-palmitoil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfolina, y el biomarcador 518.3 es la sal de odio de 1-O-palmitoil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfolina.

- 35 Se extrajo sangre diariamente de los pacientes reclutados en este estudio hasta 13 días desde el día de ingreso en ICU según lo que se describe en el Ejemplo 1. Las concentraciones relativas de los biomarcadores de metabolitos divulgados en la patente se midieron con ESI-MS después de la extracción con metanol frío, también según lo que se describe en el Ejemplo 1.

- 40 Las FIGS. 2 y 3 proporcionan cambios de concentración relativa de los biomarcadores 496.3 y 518.3 en un periodo de 13 días para el paciente con sepsis M113 y el paciente con SIRS M245.

Tal como puede observarse en la FIG. 2, la concentración de biomarcador 496.3 del paciente M245 con SIRS gradualmente aumenta del día 1 al día 13, lo que indica una recuperación gradual del paciente con SIRS de un trauma de choque inicial.

- 45 Por otro lado, la concentración del mismo biomarcador del paciente con sepsis gradualmente disminuye hasta dos días después del diagnóstico clínico de sepsis en el día 12. También se muestra en la FIG. 2, hay una repentina caída de la concentración del biomarcador 518.3 entre el día 5 y el día 7 para el paciente con sepsis M113, que indica un inicio o empeoramiento de la infección sistémica.

- 50 Tal como puede observarse en la FIG. 3, la concentración del biomarcador 518.3 del paciente M245 con SIRS gradualmente aumenta del día 1 al día 13, lo que indica una recuperación gradual del paciente con SIRS de un trauma de choque inicial.

Por otro lado, la concentración del mismo biomarcador del paciente con sepsis gradualmente disminuye hasta los dos días después del diagnóstico clínico de sepsis en el día 12. También se muestra en la FIG. 3, hay una caída

repentina de la concentración del biomarcador 518.3 entre el día 6 y el día 7 para el paciente con sepsis M113, lo que indica un comienzo o empeoramiento de la infección sistémica.

De ese modo, es posible diagnosticar la aparición de sepsis para el paciente M113 entre el día 6 y el día 7, que es aproximadamente cuatro días antes de que se produzcan los síntomas clínicos. El paciente con sepsis M113 sufrió un choque séptico el día 12 antes de la recuperación eventual el día 13, según lo indicado por la recuperación de los biomarcadores 496.3 y 518.3 (véanse las FIGS. 2 y 3).

Un diagnóstico temprano de sepsis entre el día 6 y el día 7 acompañado por una intervención profiláctica o terapéutica temprana podría haber salvado al paciente del choque séptico, junto con todos los costos asociados al tratamiento de choque séptico.

Según lo que se demuestra más arriba, la cantidad de biomarcadores 496.3 y 518.3 fueron útiles para el diagnóstico y monitoreo de SIRS en pacientes M245 (véanse los días 1-13) y M113 (véanse los días 1-6). Además, los biomarcadores 496.3 y 518.3 también fueron útiles para el diagnóstico o pronóstico de la conversión a sepsis y choque séptico en el paciente M113 (véanse los días 6-12) y el monitoreo de la recuperación de la misma (véanse los días 12-13).

6.3 Ejemplo 3: Identificación de los biomarcadores mediante MS/MS

Los biomarcadores en general se identificaron al llevar a cabo MS tándem en las señales pico de MS de las muestras plasmáticas. Las señales pico de MS/MS después se asignaron a los fragmentos correspondientes del biomarcador propuesto. Los biomarcadores finalmente fueron confirmados mediante espectro de MS/MS de los compuestos comprados comercialmente.

Tabla 1. MS/MS de 496.3 (1-O- palmitoil -2- liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina)

Pico iónico (Dalton)	Fragmentos asignados
496,34	Ion de molécula progenitora (MH ⁺)
478,33	MH ⁺ - H ₂ O
313,27	MH ⁺ - Fosforilcolina
184,07	Fosforilcolina
104,11	Colina

Tabla 2. MS/MS of 524.3 (1- (1-O-estearoil -2-lyso-*sn*-glicero-3-fosfocolina)

Pico iónico (Dalton)	Fragmentos asignados
524,37	Ion de molécula progenitora (MH ⁺)
506,35	MH ⁺ - H ₂ O
341,02	MH ⁺ - Fosforilcolina
184,07	Fosforilcolina
104,11	Colina

6.4 Ejemplo 4: desempeño de cuadrados mínimos de 1-O-palmitoil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina como un diagnóstico para Sepsis mediante la utilización de análisis de cuadrados mínimos

Este ejemplo demuestra que tan bien se desempeñan los ensayos en base al marcador 1-O-*palmitoil*-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina para el diagnóstico de sepsis. En estos ensayos ejemplares, los ajustes de curva de cuadrados mínimos se utilizan para modelar los datos y diagnosticar la inminencia de sepsis. El desempeño de los modelos demuestra la utilidad de los métodos de la invención para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de las afecciones inflamatorias sistémicas en sujetos.

Los ensayos evaluaron dos características en el sujeto, 1-O-*palmitoil*-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina con un peso molecular aparente de 496,3 y la sal de sodio correspondientes con un peso molecular aparente de 518,3.

Había 55 pacientes totales, de los que 23 eran 23 pacientes con SIRS y 32 eran pacientes con sepsis. Las Tablas 4-1 y 4-2 más abajo proporcionan distribuciones de la raza, sexo, edad, y estado séptico para estas muestras.

Tabla 4-1

Estado	Sexo	Afroamericano	Caucásico	Otro
SIRS	Mujer	0	5	0
	Hombre	6	10	2
Sepsis	Mujer	0	11	0
	Hombre	5	16	0

Tabla 4-2

Grupo	Mínimo	Media	Mediana	Desv. Est.	Máximo
SIRS	18	52,5	57	19.4	84
Sepsis	19	40,7	40	18.4	79

Los pacientes obtuvieron una puntuación en puntos de tiempo en base a la inminencia de sepsis. Los pacientes con SIRS obtuvieron una puntuación de 0. En la fecha de ingreso, los pacientes con sepsis obtuvieron una puntuación de 1. Dos días previo a la aparición de sepsis, los pacientes obtuvieron una puntuación de 2. Un día previo a la aparición de sepsis los pacientes obtuvieron una puntuación de 3. Inmediatamente previo a la aparición de sepsis, los pacientes obtuvieron una puntuación de 4.

Las características "retrasadas" se construyeron a partir de las características para cada paciente en su transcurso del tiempo. Los datos con Retraso 0 para un paciente dado en un tiempo dado son los datos de ese paciente en ese tiempo solamente. Los datos con Retraso 1 para ese paciente en ese tiempo son los datos con Retraso 0, así como los datos del punto de tiempo previo para ese paciente. De manera similar, los datos con Retraso 2 para ese paciente en ese tiempo son los datos disponibles de ese paciente en ese tiempo así como los dos puntos de tiempo previos.

Una consecuencia de construir retrasos mayores que 0 es que los datos para los pacientes en puntos de tiempo tempranos son incompletos, ya que los datos retrasados no están disponibles. Estos casos son descartados del análisis. Por ello los datos con retraso 0 son completos, los datos con retraso 1 no poseen ningún caso del primer punto de tiempo disponible, y los datos con retraso 2 no tienen ningún caso del primer y segundo punto de tiempo disponible. Retrasos más altos producen más información por paciente en un tiempo dado, pero menos casos para entrenar. Por supuesto, cuanto mayor es el retraso, mayor es el tiempo antes de que una predicción pueda realizarse, aunque esa predicción puede ser más exacta finalmente.

Se ajustaron múltiples modelos de regresión lineal, al variar las características incluidas así como los parámetros de complejidad de modelo, mediante la utilización de la rutina de optimización SPSA (aproximación estocástica por perturbación simultánea). Para múltiples modelos de regresión, no está disponible ningún parámetro de complejidad. Los modelos se seleccionaron para optimizar la pérdida de error cuadrado medio.

Un plan de modelo con una pequeña pérdida esperada en general dará mejores resultados del paciente (llamadas más exactas, llamadas más tempranas, etc.) que un plan de modelo con una alta pérdida esperada. Sin embargo, la misma pérdida no nos dice que pacientes serán llamados, o cuándo. Para evaluar esto, se lleva a cabo la validación cruzada con el plan de modelo identificado. Los pacientes se dividen en K grupos (típicamente 10), cada uno de tamaño similar y con un número similar de paciente sépticos y con SIRS.

(Todos los datos de un paciente dado son asignados al mismo grupo.) Se ajusta un modelo de acuerdo al plan, excluyendo cada grupo por vez. El modelo ajustado después se aplica a los datos del paciente excluidos en cada punto de tiempo, y se calculan los valores SI previstos. Después, se aplica una secuencia de umbrales a cada valor SI previsto. Para cada umbral, después podemos determinar si el valor SI previsto de un paciente alguna vez excedió el umbral, y si lo hizo, cuándo. Los resultados previstos de todos los pacientes después se ensamblan para formar estimaciones de sensibilidad y especificidad conjunta para todos los umbrales.

6.4.1. Resultados de Retraso 0

Las características seleccionadas por el modelo mejor estimado incluyen características con ponderaciones moleculares aparentes de 496,3 y 518,3. Según lo que se muestra en el Ejemplo 3 más arriba, estas características corresponden al marcador 1-O-palmitoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfolina y la correspondiente sal de sodio.

Se estima que la iteración 1000 tiene el mejor desempeño. Las características y complejidad de modelo seleccionados en esta iteración se estiman para producir la pérdida 1.4482. Este plan de modelo se evaluó con 10 veces la validación cruzada. La FIG. 4-1 ilustra la sensibilidad y especificidad que se obtendría con respecto a los pacientes en su transcurso de tiempo completo. La Tabla 4-3 presenta los datos de los puntos seleccionados. La

Tabla 4-4 resume los índices de tiempo estimados de la primer llamada de sepsis inminente, para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad, alta concordancia total, y alta especificidad, respectivamente.

La Tabla 4-3 proporciona la sensibilidad estimada y especificidad para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad (umbral más bajo), alta especificidad (umbral más alto), y alta concordancia total.

5

Tabla 4-3

Umbral	Sensibilidad	Especificidad
1,329	96,88	13,04
1,7107	75	52,17
2,1145	6,25	91,3

La Tabla 4-4 proporciona la distribución estimada de los tiempos de la primera llamada de inminencia de sepsis para los umbrales seleccionados que dan alta sensibilidad, alta concordancia, y alta especificidad, respectivamente. El Día 1 es el día de ingreso, el Día 2 es el siguiente día ensayado, etc. "I" indica ninguna llamada de inminencia de sepsis durante el transcurso del estudio.

10

Tabla 4-4

Día de estudio:		1	2	3	4	I
Sensibilidad	Sepsis	28	2	0	1	1
	SIRS	19	1	0	0	3
Concordancia	Sepsis	10	4	5	5	8
	SIRS	7	1	0	3	12
Especificidad	Sepsis	0	0	0	2	30
	SIRS	0	0	1	1	21

La FIG. 4-2 ilustra la evolución de los parámetros de inclusión de características durante la optimización. Si bien la última iteración es típicamente la mejor, el proceso es aleatorio y se estima la mejor iteración; en este caso, se estima que la iteración 1000 es la mejor.

6.4.2. Resultados de Retraso 1

15 Las características seleccionadas por el mejor modelo estimado incluyen características con ponderaciones moleculares aparentes de 496,3 y 518,3. Según lo que se muestra en el Ejemplo 3 más arriba, estas características corresponden al marcador 1-O-palmitoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfolina y la correspondiente sal de sodio.

20 La iteración 1000 se estima que tiene el mejor desempeño. Las características y complejidad de modelo seleccionados en esta iteración se estiman para producir la pérdida 1,4638. Este plan de modelo se evaluó con 10 veces la validación cruzada. La FIG. 4-3 ilustra la sensibilidad y especificidad que se obtendría con respecto a los pacientes en su transcurso de tiempo completo. La Tabla 4-5 presenta los datos de los puntos seleccionados. La Tabla 4-6 resume los índices de tiempo estimados de la primera llamada de sepsis inminente, para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad, alta concordancia total, y alta especificidad, respectivamente.

25 La Tabla 4-5 proporciona sensibilidad estimada y especificidad para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad (umbral más bajo), alta especificidad (umbral más alto), y alta concordancia total.

Tabla 4-5

Umbral	Sensibilidad	Especificidad
1,7107	90,62	30,43
2,1145	75	65,22
2,2587	62,5	91,3

La Tabla 4-6 proporciona la distribución estimada de los tiempos de la primera llamada de inminencia de sepsis para los umbrales seleccionados que dan alta sensibilidad, alta concordancia, y alta especificidad, respectivamente. El Día 1 es el día de ingreso, el Día 2 es el siguiente día ensayado, etc. "I" indica ninguna llamada de inminencia de sepsis durante el transcurso del estudio.

5

Tabla 4-6

Día de estudio:		1	2	3	4	I
Sensibilidad	Sepsis	0	21	4	4	3
	SIRS	0	5	3	8	7
Concordancia	Sepsis	0	8	10	6	8
	SIRS	0	1	0	7	15
Especificidad	Sepsis	0	5	8	7	12
	SIRS	0	0	0	2	21

Las FIGS. 4-4 y 4-5 ilustran la evolución de los parámetros de inclusión de características durante la optimización. Si bien la última iteración es típicamente la mejor, el proceso es aleatorio y así estimamos la mejor iteración; en este caso, se estima que la iteración 1000 es la mejor.

6.4.3. Resultados de Retraso 2

10 Las características seleccionadas por el mejor modelo estimado incluyen características con ponderaciones moleculares aparentes de 496,3 y 518,3. Según lo que se muestra en el Ejemplo 3 más arriba, estas características corresponden al marcador 1-*O*-palmitoil-2-liso-*sn*-glicerol-3-fosfolina y la correspondiente sal de sodio.

15 La iteración 1000 se estima que tiene el mejor desempeño. Las características y complejidad de modelo seleccionados en esta iteración se estiman para producir la pérdida de 1,6208. Este plan de modelo se evaluó con 10 veces la validación cruzada. La FIG. 4-6 ilustra la sensibilidad y especificidad que se obtendría con respecto a los pacientes en su transcurso de tiempo completo. La Tabla 4-7 presenta los datos de los puntos seleccionados. La Tabla 4-8 resume los índices de tiempo estimados de la primera llamada de sepsis inminente, para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad, alta concordancia total, y alta especificidad, respectivamente.

20 La Tabla 4-7 proporciona a sensibilidad estimada y especificidad para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad (umbral más bajo), alta especificidad (umbral más alto), y alta concordancia total.

Tabla 4-7

Umbral	Sensibilidad	Especificidad
1,7107	90,62	26,09
2,3465	68,75	69,57
2,5329	59,38	91,3

25 La Tabla 4-8 proporciona la distribución estimada de los tiempos de la primera llamada de inminencia de sepsis para los umbrales seleccionados que dan alta sensibilidad, alta concordancia, y alta especificidad, respectivamente. El Día 1 es el día de ingreso, el Día 2 es el siguiente día ensayado, etc. "I" indica ninguna llamada de inminencia de sepsis durante el transcurso del estudio.

Tabla 4-8

Día de estudio:		1	2	3	4	I
Sensibilidad	Sepsis	0	0	24	5	3
	SIRS	0	0	8	9	6
Concordancia	Sepsis	0	0	19	3	10
	SIRS	0	0	0	7	16
Especificidad	Sepsis	0	0	11	8	13
	SIRS	0	0	0	2	21

Las FIGS. 4-7 a 4-9 ilustran la evolución de los parámetros de inclusión de características durante la optimización. Si bien la última iteración es típicamente la mejor, el proceso es aleatorio y así estimamos la mejor iteración; en este caso, se estima que la iteración 1000 es la mejor.

6.5 Ejemplo 5: Desempeño de 1-O-palmitoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina como un diagnóstico de Sepsis mediante la utilización de análisis de red neuronal

Este ejemplo demuestra que tan bien se desempeñan los ensayos en base al marcador 1-O-palmitoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina para el diagnóstico de sepsis. En estos ensayos ejemplares, los ajustes de la curva de la red neuronal se utilizan para modelar los datos diagnosticar inminencia de sepsis. El desempeño de los modelos demuestra la utilidad de los métodos de la invención para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de las afecciones inflamatorias sistémicas en sujetos.

Estos ensayos evaluaron dos características en los sujetos, 1-O-palmitoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina con un peso molecular aparente de 496,3 y la correspondiente sal de sodio con un peso molecular aparente de 518,3.

Había 55 pacientes en total, de los que 23 eran 23 pacientes con SIRS y 32 eran pacientes con sepsis. Las Tablas 5-1 y 5-2 más abajo proporcionan las distribuciones de la raza, sexo, edad, y estado séptico para estas muestras.

Tabla 5-1

Estado	Sexo	Afroamericano	Caucásico	Otro
SIRS	Mujer	0	5	0
	Hombre	6	10	2
Sepsis	Mujer	0	11	0
	Hombre	5	16	0

Tabla 5-2

Grupo	Mínimo	Medio	Mediana	Desv. Est.	Máximo
SIRS	18	52,5	57	19,4	84
Sepsis	19	40,7	40	18,4	79

Los pacientes obtuvieron una puntuación en los puntos de tiempo en base a la inminencia de sepsis ("SI"). Los pacientes con SIRS obtuvieron una puntuación de 0. En la fecha de ingreso, los pacientes con sepsis obtuvieron una puntuación de 1. Dos días previo a la aparición de sepsis, los pacientes obtuvieron una puntuación de 2. Un día previo a la aparición de sepsis los pacientes obtuvieron una puntuación de 3. Inmediatamente previo a la aparición de sepsis, los pacientes obtuvieron una puntuación de 4.

Las características "Retrasadas" se construyeron a partir de las características para cada paciente en su transcurso de tiempo. Los datos con Retraso 0 para un paciente dado en un tiempo dado son los datos de ese paciente en ese tiempo solamente. Los datos con Retraso 1 para ese paciente en ese tiempo son los datos de retraso 0, así como los datos del punto de tiempo previo para ese paciente. De manera similar, los datos con Retraso 2 para ese paciente en ese tiempo son los datos disponibles de ese paciente en ese tiempo así como los dos puntos de tiempo previos.

Una consecuencia de construir retrasos mayores que 0 es que los datos para los pacientes en los puntos de tiempo tempranos son incompletos, ya que los datos retrasados no están disponibles. Estos casos son descartados del análisis. Por ello los datos con retraso 0 son completos, los datos con retraso 1 no poseen ningún caso del primer punto de tiempo disponible, y los datos con retraso 2 no tienen ningún caso del primer y segundo punto de tiempo disponible. Retrasos más altos producen más información por paciente en un tiempo dado, pero menos casos para entrenar. Por supuesto, cuanto mayor es el retraso, mayor es el tiempo antes de que una predicción pueda realizarse, aunque esa predicción puede ser más exacta finalmente.

Muchos modelos de red neuronal fueron ajustados al variar las características incluidas así como los parámetros de complejidad de modelo, mediante la utilización de la rutina de optimización SPSA (aproximación estocástica por perturbación simultánea). Para los modelos de red neuronal, la complejidad está regida por el número de nodos ocultos y disminución de la ponderación. Se seleccionaron los modelos para optimizar la pérdida por error cuadrático medio.

Un plan de modelo con una pérdida esperada en general dará mejores resultados del paciente (llamadas más exactas, llamadas tempranas, etc.) que un plan de modelo con una alta pérdida esperada. Sin embargo, la misma pérdida no nos dice que pacientes serán llamados, o cuando. Para evaluar esto, se lleva a cabo la validación cruzada con el plan de modelo identificado. Los pacientes se dividen en K grupos (típicamente 10), cada uno de tamaño similar y con un número similar de paciente sépticos y con SIRS. (Todos los datos de un paciente dado son asignados al mismo grupo.) Se ajusta un modelo de acuerdo al plan, excluyendo cada grupo por vez. El modelo ajustado después se aplica a los datos del paciente excluidos en cada punto de tiempo, y se calculan los valores SI previstos. Después, se aplica una secuencia de umbrales a cada valor SI previsto. Para cada umbral, después podemos determinar si el valor SI previsto de un paciente alguna vez excedió el umbral, y si lo hizo, cuando. Los resultados previstos de todos los pacientes después se ensamblan para formar estimaciones de sensibilidad y especificidad conjuntas para todos los umbrales.

6.5.1. Resultados de Retraso 0

Las características seleccionadas por el mejor modelo estimado incluyen las características con ponderaciones moleculares aparentes de 496,3 y 518,3. Según lo que se muestra en el Ejemplo 3 más arriba, estas características corresponden al marcador 1-O-palmitoil-2-liso-*sn*-glicerol-3-fosfolina y la correspondiente sal de sodio. Los parámetros de complejidad del modelo identificados son 5 nodos ocultos y la disminución de la ponderación de 0.3003.

La iteración 1000 se estima que tiene el mejor desempeño. Las características y complejidad de modelo seleccionados en esta iteración se estiman para producir la pérdida de 1,3537. Este plan de modelo se evaluó con 10 veces la validación cruzada. La FIG. 5-1 ilustra la sensibilidad y especificidad que se obtendría con respecto a los pacientes en su transcurso de tiempo completo. La Tabla 5-3 presenta los datos de los puntos seleccionados. La Tabla 5-4 resume los índices de tiempo estimados de la primer llamada de sepsis inminente, para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad, alta concordancia total, y alta especificidad, respectivamente.

La Tabla 5-3 proporciona sensibilidad estimada y especificidad para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad (umbral más bajo), alta especificidad (umbral más alto), y alta concordancia total.

Tabla 5-3

Umbral	Sensibilidad	Especificidad
1,1336	96,88	4,35
2,0036	68,75	69,57
2,5551	37,5	91,3

La Tabla 5-4 proporciona la distribución estimada de los tiempos de la primera llamada de inminencia de sepsis para los umbrales seleccionados que dan alta sensibilidad, alta concordancia, y alta especificidad, respectivamente. El Día 1 es el día de ingreso, el Día 2 es el siguiente día ensayado, etc. "I" indica ninguna llamada de inminencia de sepsis durante el transcurso del estudio.

Tabla 5-4

Día de estudio:		1	2	3	4	I
Sensibilidad	Sepsis	21	6	3	1	1
	SIRS	17	2	0	3	1
Concordancia	Sepsis	5	2	9	6	10
	SIRS	3	1	0	3	16
Especificidad	Sepsis	1	0	4	7	20
	SIRS	0	1	0	1	21

La FIG. 5-2 ilustra la evolución de los parámetros de inclusión de características durante la optimización. Si bien la última iteración es típicamente la mejor, el proceso es aleatorio y se estima la mejor iteración; en este caso, se estima que la iteración 1000 es la mejor.

6.5.2. Resultados del Retraso 1

Las características seleccionadas por el mejor modelo estimado incluyen las características con ponderaciones moleculares aparentes de 496,3 y 518,3. Según lo que se muestra en el Ejemplo 3 más arriba, estas características corresponden al marcador 1-O-palmitoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfolina y la correspondiente sal de sodio. Los parámetros de complejidad del modelo identificados son 4 nodos ocultos y la disminución de ponderación de 1,0563:

La iteración 847 se estima que tiene el mejor desempeño. Las características y complejidad de modelo seleccionados en esta iteración se estiman para producir la pérdida de 1,3603. Este plan de modelo se evaluó con 10 veces la validación cruzada. La FIG. 5-3 ilustra la sensibilidad y especificidad que se obtendría con respecto a los pacientes en su transcurso de tiempo completo. La Tabla 5-5 presenta los datos de los puntos seleccionados. La Tabla 5-6 resume los índices de tiempo estimados de la primera llamada de sepsis inminente, para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad, alta concordancia total, y alta especificidad, respectivamente.

La Tabla 5-5 proporciona sensibilidad estimada y especificidad para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad (umbral más bajo), alta especificidad (umbral más alto), y alta concordancia total.

Tabla 5-5

Umbral	Sensibilidad	Especificidad
1,3215	90,62	26,09
2,1481	68,75	69,57
2,5311	59,38	91,3

La Tabla 5-6 proporciona la distribución estimada de los tiempos de la primera llamada de inminencia de sepsis para los umbrales seleccionados que dan alta sensibilidad, alta concordancia, y alta especificidad, respectivamente. El Día 1 es día de ingreso, el Día 2 es el siguiente día ensayado, etc. "I" indica ninguna llamada de inminencia de sepsis durante el transcurso del estudio.

Tabla 5-6

Día de estudio:		1	2	3	4	I
Sensibilidad	Sepsis	0	21	3	5	3
	SIRS	0	6	2	9	6
Concordancia	Sepsis	0	10	9	3	10
	SIRS	0	1	0	6	16
Especificidad	Sepsis	0	7	5	7	13
	SIRS	0	0	0	2	21

Las FIGS. 5-4 a 5-5 ilustran la evolución de los parámetros de inclusión de características durante la optimización. Si bien la última iteración es típicamente la mejor, el proceso es aleatorio y así estimamos la mejor iteración; en este caso, se estima que la iteración 847 es la mejor.

6.5.3. Resultados de Retraso 2

Las características seleccionadas por el mejor modelo estimado incluyen características con ponderaciones moleculares aparentes de 496,3 y 518,3. Según lo que se muestra en el Ejemplo 3 más arriba, estas características corresponden al marcador 1-O-palmitoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfolina y la correspondiente sal de sodio. Los parámetros de complejidad del modelo identificados son 3 nodos ocultos y la disminución de ponderación de 1,6457.

La iteración 1000 se estima que tiene el mejor desempeño. Las características y complejidad de modelo seleccionados en esta iteración se estiman para producir la pérdida de 1,5287. Este plan de modelo se evaluó con 10 veces la validación cruzada. La FIG. 5-6 ilustra la sensibilidad y especificidad que se obtendría con respecto a los pacientes en su transcurso de tiempo completo. La Tabla 5-7 presenta los datos de los puntos seleccionados. La Tabla 5-8 resume los índices de tiempo estimados de la primera llamada de sepsis inminente, para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad, alta concordancia total, y alta especificidad, respectivamente.

La Tabla 5-7 proporciona sensibilidad estimada y especificidad para los umbrales seleccionados para alta sensibilidad (umbral más bajo), alta especificidad (umbral más alto), y alta concordancia total.

Tabla 5-7

Umbral	Sensibilidad	Especificidad
1,0748	90,62	13,04
2,1886	68,75	65,22
2,6667	62,5	91,3

La Tabla 5-8 proporciona la distribución estimada de los tiempos de la primera llamada de inminencia de sepsis para los umbrales seleccionados que dan alta sensibilidad, alta concordancia, y alta especificidad, respectivamente. El Día 1 es el día de ingreso, el Día 2 es el siguiente día ensayado, etc. "I" indica ninguna llamada de inminencia de sepsis durante el transcurso del estudio.

Tabla 5-8

Día de estudio:		1	2	3	4	I
Sensibilidad	Sepsis	0	0	27	2	3
	SIRS	0	0	11	9	3

Tabla 5-8 (continuación)

Día de estudio:		1	2	3	4	I
Concordancia	Sepsis	0	0	19	3	10
	SIRS	0	0	2	6	15
Especificidad	Sepsis	0	0	13	7	12
	SIRS	0	0	0	2	21

Las FIGS. 5-7 a 5-9 ilustran la evolución de los parámetros de inclusión de características durante la optimización. Si bien la última iteración es típicamente mejor, el proceso es aleatorio y así estimamos la mejor iteración; en este caso, se estima que la iteración 1000 es la mejor.

6.6 Ejemplo 6: Ensayo enzimático colorímetro para la determinación de Lisofosfatidilcolina total

Poblaciones de pacientes

Los pacientes se dividieron en dos poblaciones. La primera población ("el grupo con SIRS") representa los pacientes que desarrollaron SIRS y que ingresaron en el presente estudio el "Día 1" pero que no progresaron a sepsis durante su estadía en el hospital. La segunda población ("el grupo con sepsis") representa los pacientes que del mismo modo desarrollaron SIRS e ingresaron en el presente estudio el Día 1 pero que progresaron a sepsis típicamente al menos varios días después de ingresar al estudio. [0362] Recolección de muestras

Las muestras sanguíneas fueron tomadas aproximadamente cada 24 horas de cada grupo de estudio. La sospecha clínica de sepsis en el grupo con sepsis se produjo a la "tiempo 0." Las muestras fueron tomadas a las "tiempo de 12 horas", "tiempo de 36 horas" y "tiempo de 60 horas" anterior al día de la sospecha clínica de la aparición de sepsis en el grupo con sepsis. Es decir, las muestras del grupo con sepsis incluyeron aquellas tomadas el día de ingreso en el estudio (Día 1), 60 horas previo a la sospecha clínica de sepsis (tiempo 60 horas), 36 horas previo a la sospecha clínica de sepsis (tiempo 36 horas), y el día de la sospecha clínica de la aparición de sepsis (tiempo 12 horas).

Fuentes de reactivos

La lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5) se obtuvo de Asachi Chemical Co. (Tokio, Japón). La glicerofosforilcolina fosfodiesterasa (GPCP; EC 3.1.4.2), colina oxidasa (COD; EC 1.1.3.17), peroxidasa (EC 1.11.1.7), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina dehidrato de sodio (TOOS) y 4-aminoantipirina se compraron en Aldrich (Milwaukee, WI). 1-palmitoil- 2-hidroxi-fosfatidilcolina se obtuvo en Avanti Polar- Lipids Inc. (Alabaster, AL). 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina se obtuvo en Invitrogen (Carlsbad, CA).

Mecanismo

En el mecanismo de ensayo que se muestra en el Esquema 1 (FIG. 6), una molécula de lisofosfatidilcolina (LPC)

puede pasar a través de una serie de reacciones enzimáticas para producir dos moléculas de peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno resultante puede oxidar 4-aminoantipirina en presencia de sal de N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina dehidrato sodio (TOOS) para producir una tintura de quinoneimina. La intensidad de absorbancia de la quinoneimina puede medirse en la longitud de onda de 590 nm.r

5 Reactivos

El reactivo A comprende Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), Triton X-100 al 0,01%, calcio cloruro 1 mM, TOOS 3 mM (N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina, sal de sodio, dihidrato), 10 K Unidades/L de peroxidasa, 0,1 K Unidades/L GPCP de (glicero fosforilcolina fosfodiesterasa), y 10 K Unidades/L de COD (colina oxidasa). El reactivo B comprende Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), Triton X-100 al 0,01%, 4-aminoantipirina 5 mM y 30 K Unidades/L de lisofosfolipasa.

Ensayo enzimático colorimétrico LPC

Una muestra plasmática de 8 µl se preincubó con 240 µl de reactivo A durante 5 minutos a 37°C, y la absorbancia entre 570 nm (longitud de onda primaria) y 700 nm (longitud de onda secundaria) se midió en un lector de placa (Perkin Elmer Victor3). La reacción se comenzó por adición de 80 µl de reactivo B. Después de 5 minutos, se midió la absorbancia entre 570 nm y 700 nm. La concentración de LPC total se determinó con la ayuda de una curva de calibración de la dilución secuencial de 500 µmol/L de 1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilcolina.

Resultados

Muestra	Rep1 (absorbancia)	Rep2 (absorbancia)	Media (absorbancia)
STD1: 600 µM	0,449	0,445	0,447
STD2: 400 µM	0,336	0,334	0,335
STD3: 200 µM	0,169	0,233	0,201
STD6: 0 µM	0,071	0,116	0,094
Sujeto saludable	0,231	0,223	0,228
Paciente 113 D10 (sepsis)	0,081	0,078	0,080
Paciente 237 D09 (SIRS)	0,165	0,193	0,179

Según lo que se muestra en la tabla más arriba, un paciente con sepsis y un paciente con SIRS poseen concentraciones inferiores de LPC en comparación con un sujeto saludable normal. La concentración de LPC en el paciente con sepsis además está disminuida en comparación con el paciente con SIRS. Ambas diferencias se observaron en un conjunto de muestras más grande.

6.7 Ejemplo 7: Ensayo enzimático fluorescente para la determinación de LPC total

Poblaciones de pacientes

Los pacientes se dividieron en dos poblaciones. La primer población ("el grupo con SIRS") representa los pacientes que desarrollaron SIRS y que ingresaron al presente estudio el "Día 1" pero que no progresaron a sepsis durante su estadía en el hospital. La segunda población ("el grupo con sepsis") representa los pacientes que del mismo modo desarrollaron SIRS e ingresaron en el presente estudio el Día 1 pero que progresaron a sepsis típicamente al menos varios días después de ingresar al estudio.

Recolección de muestras

Las muestras sanguíneas fueron tomadas aproximadamente cada 24 horas de cada grupos de estudio. La sospecha clínica de sepsis en el grupo con sepsis se produjo en "tiempo 0." Las muestras fueron tomadas en "tiempo de 12 horas", "tiempo de 36 horas" y " tiempo de 60 horas" anterior al día de la sospecha clínica de la aparición de sepsis en el grupo con sepsis. Es decir, las muestras del grupo con sepsis incluyeron aquellas tomadas el día de ingreso en el estudio (Día 1), 60 horas previo a la sospecha clínica de sepsis (tiempo de 60 horas), 36 horas previo a la sospecha clínica de sepsis (tiempo de 36 horas), y el día de la sospecha clínica de la aparición de sepsis (tiempo de 12 horas).

Fuentes de reactivos

La lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5) se obtuvo en Asachi Chemical Co. (Tokio, Japón). La glicero fosforilcolina fosfodiesterasa (GPCP; EC 3.1.4.2), colina oxidasa (COD; EC 1.1.3.17), peroxidasa (EC 1.11.1.7), N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina dehidrato de sodio (TOOS) y 4-aminoantipirina se compraron en Aldrich

(Milwaukee, WI). La 1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilcolina se obtuvo en Avanti Polar- Lípidos Inc. (Alabaster, AL). La 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina se obtuvo en Invitrogen (Carlsbad, CA).

Mecanismo

- 5 Similar al ensayo enzimático colorimétrico, una molécula de LPC puede producir a través de una serie de reacciones enzimáticas dos moléculas de peróxido de hidrógeno (Esquema 1; véase la FIG. 6). El resultante después puede oxidar 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina y forma un producto fluorescente, 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona. La intensidad fluorescente de 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona puede medirse en 590 nm con una longitud de onda de excitación de aproximadamente 530nm.

Reactivos

- 10 El reactivo A comprende Tris- HCl 100 mM (pH 8,0), Triton X- 100 al 0,01%, cloruro de magnesio 10 mM, 0.1 K unidades/L de GPCP (glicerofosforilcolina fosfodiesterasa), 10 K unidades/L de peroxidasa, 10 K unidades/L de COD (colina oxidasa) y 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina 20 mM. El reactivo B comprende Tris- HCl 100 mM (pH 8,0), Triton X-100 al 0,01% y 30 K unidades/L de lisofosfolipasa.
- 15 240 PL del reactivo A se añadieron a cada pozo de una microplaca de 96 negra para fluorescencia. 8 PL de cada muestra y o estándares se añaden en cada pozo que contiene el reactivo A. 80 PL del reactivo B se añaden en cada pozo. La mezcla resultante se incubó durante 60 minutos o más a 37°C, se protege de la luz. La fluorescencia se lee en el lector de placa Perkin Elmer Victor 3 con una longitud de onda de excitación de 530 nm, una longitud de onda de emisión de 590 nm, energía de lámpara de 10000', y apertura de emisión "Pequeña". La LPC total se determina con la ayuda de una curva de calibración de 500 umol/L de 1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidylcolina diluidos
- 20 secuencialmente en una solución tampón que comprende Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), Triton X-100 al 0,01% y cloruro de magnesio 10 mM.

Resultados

- 25 Las concentraciones de LPC total para sujetos con sepsis 29 y 22 sujetos con SIRS el día de ingreso, los intervalos T- 60, T-36 y T-12 (el día de la sospecha clínica de la aparición de sepsis) se muestran en la FIG. 7. Tal como puede observarse en la FIG. 7, la concentración de LPC total para la mayoría de los pacientes con SIRS aumenta gradualmente desde el día de ingreso, lo que indica una recuperación gradual de cada paciente con SIRS de un trauma de choque inicial. Por otro lado, la concentración de LPC total para la mayoría de los pacientes con sepsis comienza a caer o se nivela dos días antes del día de la sospecha clínica de la aparición de sepsis (T-12).

- 30 En este conjunto de datos, el pronóstico clínico de sepsis puede realizarse de acuerdo a los métodos de la invención uno a dos días antes de la aparición de sepsis con 90% de especificidad y 60% de sensibilidad, mediante la utilización de los siguientes criterios:

- concentración de LPC (D_n) < 60 PM el día de la llamada (n día); y
- $D_n - D_{n-1} < 0$ PM (concentración de LPC bajó o se niveló).

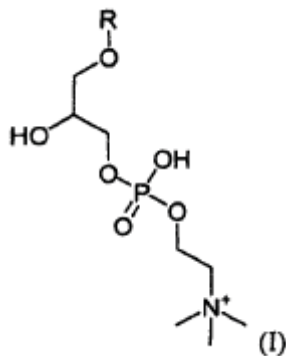
- 35 Un diagnóstico temprano de sepsis acompañado por una intervención profiláctica o terapéutica temprana podría haber salvado al paciente del choque séptico junto con todos los costos asociadas al tratamiento de choque séptico.

Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para los fines de claridad de entendimiento, será fácilmente evidente para aquellos con experiencia común en la técnica a la luz de los entrenamientos de la presente invención que ciertos cambios y modificaciones pueden realizarse a la misma sin apartarse de o alcance de las reivindicación anexadas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico o pronóstico de sepsis en un paciente que comprende la etapa de monitorear o evaluar la cantidad de lisofosfatidilcolina total en una muestra de fluido o tejido del paciente, donde el diagnóstico o pronóstico se realiza previo a la aparición de sepsis.

- 5 2. El método de la Reivindicación 1, donde la lisofosfatidilcolina es un compuesto en conformidad con la fórmula (I)



o una sal o solvato del mismo, donde R es acilo C₁₀-C₂₂.

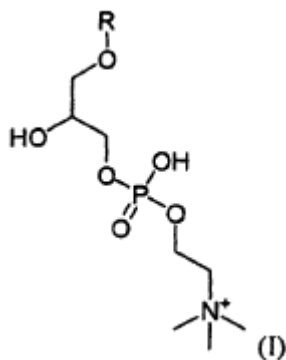
- 10 3. El método de la Reivindicación 2, donde R es acilo C₁₄-C₂₂, preferiblemente acilo C₁₆-C₂₀, más preferiblemente acilo C₁₆-C₁₈.

4. El método de la Reivindicación 1 que comprende la etapa de medir en el tiempo una pluralidad de cantidades de lisofosfatidilcolina total en la muestra de fluido o tejido del paciente.

5. El método de la Reivindicación 4 donde dicha lisofosfatidilcolina comprende 1-O-palmitoil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina y 1-O-estearoil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina.

- 15 6. El método de la Reivindicación 4 donde la lisofosfatidilcolina libre total y/o lisofosfatidilcolina unida total indica la cantidad de lisofosfatidilcolina total.

7. El método de la Reivindicación 4, donde la lisofosfatidilcolina es un compuesto en conformidad con la fórmula (I)



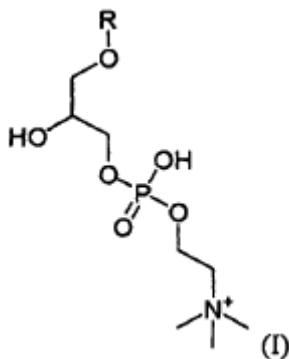
- 20 o una sal o solvato del mismo, donde R es acilo C₁₀-C₂₂.

8. El método de la Reivindicación 7 donde R es acilo C₁₄-C₂₂, preferiblemente acilo C₁₆-C₂₀, más preferiblemente acilo C₁₆-C₁₈.

9. El método de la Reivindicación 7 donde R es acilo saturado, preferiblemente acilo saturado C₁₆, o acilo saturado C₁₈.

- 25 10. El método de la Reivindicación 7 donde R es acilo C₁₆-C₁₈ no ramificado, preferiblemente palmitoil, o estearoil.

11. El método de la Reivindicación 4 o 7 donde una cantidad decreciente indica riesgo creciente de sepsis o una cantidad creciente indica riesgo decreciente de sepsis, o donde una cantidad decreciente indica diagnóstico de sepsis o una cantidad creciente indica contra diagnóstico de sepsis.
12. El método de la Reivindicación 4 o 7 donde el paciente es SIRS positivo.
- 5 13. El método de la Reivindicación 4 o 7 que adicionalmente comprende la medición de uno o más biomarcadores, donde dicho biomarcador es distinto de lisofosfatidilcolina.
14. El método de la Reivindicación 4 o 7 donde la cantidad se mide por espectrometría, cromatografía, inmunoensayo y, electroforesis o ensayo enzimático.
- 10 15. El método de la Reivindicación 4 o 7 donde el fluido o tejido es sangre, plasma, saliva, suero, esputo, orina, células, extracto celular o biopsia tisular.
16. El método de la Reivindicación 4 o 7 donde el fluido o tejido es sangre.
17. El método de la Reivindicación 1 o 2 que comprende la etapa de monitorear o evaluar una o más mediciones clínicas.
- 15 18. El método de la Reivindicación 17 donde la medición clínica es de acuerdo a un modelo de severidad clínica para sepsis, donde el modelo clínico se selecciona del grupo que consiste en la Evaluación de Salud Crónica y Fisiología Aguda, la Evaluación de Salud Crónica y Fisiología Aguda II, la Evaluación de Salud Crónica y Fisiología Aguda III, la Modelo de Predicción de Mortalidad, la puntuación de Fisiología Aguda Simplificada, la puntuación de Disfunción Múltiple de Órganos, la puntuación de Evaluación de Falla de Órganos Secuencial, la Puntuación Logística de Disfunción de Órganos, y la predisposición, infección, respuesta, y concepto de disfunción de órganos.
- 20 19. El método de la Reivindicación 1 que comprende la etapa de comparar la cantidad de lisofosfatidilcolina total en la muestra de fluido o tejido del paciente respecto de una cantidad de referencia indicativa de la cantidad de lisofosfatidilcolina total en una muestra de fluido o tejido de un individuo que tiene sepsis.
20. El método de la Reivindicación 19, donde la lisofosfatidilcolina es un compuesto en conformidad con la fórmula (I)



- 25 o una sal o solvato del mismo, donde R es acilo C₁₀-C₂₂.
21. El método de la Reivindicación 20 donde R es acilo C₁₄-C₂₂, preferiblemente acilo C₁₆-C₂₀, más preferiblemente acilo C₁₆-C₁₈.
- 30 22. El método de la Reivindicación 19 o 20 donde la diferencia entre las cantidades se correlaciona inversamente con el riesgo de sepsis.
23. El método de la Reivindicación 19 o 20 donde la cantidad de referencia es una cantidad de referencia límite.
24. El método de la Reivindicación 23, donde una cantidad menor que la cantidad de referencia límite indica el diagnóstico de sepsis.
- 35 25. El método de la Reivindicación 19 o 20 donde la cantidad se mide 12, 24, 36 o 48 horas previo a la aparición de sepsis.
26. El método de la Reivindicación 19 o 20 donde el paciente es SIRS positivo.
27. El método de la Reivindicación 26 donde el individuo es SIRS positivo.
28. El método de la Reivindicación 26 donde el individuo es sepsis positivo.

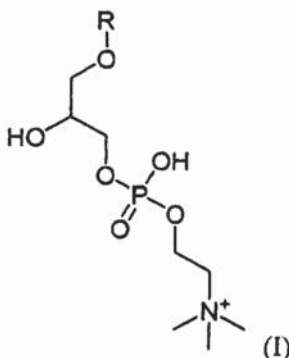
29. Un método para el diagnóstico o pronóstico de sepsis en un paciente que comprende la etapa de detectar la lisofosfatidilcolina en el paciente mediante el contacto de una muestra de fluido o tejido del paciente con:
- una enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la lisofosfatidilcolina para formar glicerofosfatidilcolina; una enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la glicerofosfatidilcolina para formar colina;
- 5 una enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la colina, agua y oxígeno para formar peróxido;
- una peroxidasa; y
- un sustrato fluorogénico de dicha peroxidasa;
- en condiciones apropiadas para la formación de un producto fluorescente donde el producto fluorescente indica la lisofosfatidilcolina;
- 10 donde el diagnóstico o pronóstico se realiza previo a la aparición de sepsis.
30. El método de la Reivindicación 29 donde dicha enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la lisofosfatidilcolina para formar glicerofosfatidilcolina es una lisofosfolipasa.
31. El método de la Reivindicación 29 donde dicha enzima o reactivo capaz de convertir la lisofosfatidilcolina en glicerofosfatidilcolina es EC 3.1.1.5.
- 15 32. El método de la Reivindicación 29 donde dicha enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la glicerofosfatidilcolina para formar colina es un glicerofosfatidilcolina diesterasa.
33. El método de la Reivindicación 29 donde dicha enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la glicerofosfatidilcolina para formar colina es EC 3.1.4.2.
- 20 34. El método de la Reivindicación 29 donde dicha enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la colina para formar peróxido es una colina oxidasa.
35. El método de la Reivindicación 29 donde dicha enzima o reactivo capaz de hacer reaccionar la colina con peróxido es EC 1.1.3.17.
36. El método de la Reivindicación 29 donde dicha peroxidasa es peroxidasa del rábano.
- 25 37. El método de la Reivindicación 29 donde dicho sustrato fluorogénico es 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina y dicho producto fluorescente es 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona.
38. El método de la reivindicación 29 donde dicho producto fluorescente es detectado por detección fluorescente.
39. El método de la Reivindicación 29 donde la muestra se pone en contacto con una lisofosfolipasa, una glicerofosfatidilcolina diesterasa, una colina oxidasa, una peroxidasa y 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina en condiciones apropiadas para la formación de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona donde 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona indica la lisofosfatidilcolina.
- 30 40. El método de la Reivindicación 29 donde la muestra se pone en contacto con EC 3.1.1.5, EC 3.1.4.2, EC 1.1.3.17, peroxidasa del rábano y 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina en condiciones apropiadas para la formación de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona donde 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona indica la lisofosfatidilcolina.
- 35 41. El método de la Reivindicación 29 donde la cantidad de producto fluorescente indica la cantidad de lisofosfatidilcolina.
42. El método de la Reivindicación 19, donde la cantidad de lisofosfatidilcolina total en la muestra de fluido o tejido del paciente es comparada con una cantidad de referencia indicativa de las cantidades de lisofosfatidilcolina total en fluidos o tejidos de una pluralidad de individuos que tienen sepsis.
- 40 43. El método de la Reivindicación 1 que comprende la etapa de comparar la cantidad de lisofosfatidilcolina total en la muestra de fluido o tejido del paciente con un estándar interno en el fluido o el tejido.
44. El método de la Reivindicación 17 donde las medición/es clínica/s se seleccionan del grupo que consiste en ritmo respiratorio, temperatura, ritmo cardíaco, recuento de glóbulos blancos en sangre, recuento de monocitos, recuento de linfocitos, recuento de granulocitos, recuento de neutrófilos, relación de neutrófilo inmaduro y neutrófilo total, recuento de plaquetas, concentración de creatinina sérica, concentración de urea, concentración de lactato, exceso bases, concentración de pO_2 y HCO_3^- .
- 45 45. El método de la Reivindicación 17 donde se monitorea o evalúa una medición clínica.

46. El método de la Reivindicación 45 donde se monitorea o evalúa el ritmo respiratorio.
47. El método de la Reivindicación 45 donde se monitorea o evalúa la temperatura.
48. El método de la Reivindicación 17 donde se monitorea o evalúa m'as que una medición clínica.
49. El método de la Reivindicación 48 donde se monitorean o evalúan el ritmo respiratorio y la temperatura.

5 50. El método de la Reivindicación 17 que además comprende monitorear o evaluar uno o más biomarcadores en la muestra de fluido o tejido del paciente, donde los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en endotoxina, ADN bacteriano, proteína C, procalcitonina, proteína de unión a LBP - LPS, productos de degradación de fibrina, antitrombina III, dímero D, HLA-DR, CD-64, E-selectina, cortisol, ACTH, CD-14, sTNF-RI, sTNF-RII, TNF, IL- 6, IL-8 y IL- 10, D-dímero, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, inhibidor-1 activador del plasminógeno, trombomodulina soluble, inhibidor de fibrinólisis activable por trombina, proteína S, antitrombina y TNF- α .

10

51. El método de la Reivindicación 1 que comprende las etapas de:
medir una pluralidad de cantidades de un compuesto en conformidad con la fórmula (I)



15 o una sal o solvato del mismo, donde R es acilo C₁₀-C₂₂, en la muestra de fluido o tejido del paciente; y medir una o más mediciones clínicas del paciente.

52. El método de la Reivindicación 51 donde la/s medición/es clínica/s se seleccionan del grupo que consiste en ritmo respiratorio, temperatura, ritmo cardíaco, recuento de glóbulos blancos en sangre, recuento de monocitos, recuento de linfocitos, recuento de granulocitos, recuento de neutrófilos, relación de neutrófilo inmaduro y neutrófilo total, recuento de plaquetas, concentración de creatinina sérica, concentración de urea, concentración de lactato, exceso de bases, concentración de pO₂ y HCO₃.

20

53. El método de la Reivindicación 51 donde se mide una medición clínica.

54. El método de la Reivindicación 53 donde se mide el ritmo respiratorio.

55. El método de la Reivindicación 53 donde se mide la temperatura.

25 56. El método de la Reivindicación 51 donde se mide más que una medición clínica.

57. El método de la Reivindicación 56 donde se miden el ritmo respiratorio y la temperatura.

58. El método de la reivindicación 17 o la Reivindicación 51 donde el paciente es SIRS negativo.

59. El método de la Reivindicación 17 o la Reivindicación 51 donde el paciente es SIRS positivo.

30 60. El método de la Reivindicación 17 o la Reivindicación 51 donde la cantidad se mide por espectrometría, cromatografía, inmunoensayo, electroforesis o ensayo enzimático.

61. El método de la Reivindicación 17 o la Reivindicación 51 donde el fluido o tejido es sangre, plasma, saliva, suero, esputo, orina, células, extracto celular o biopsia tisular.

35 62. El método de la reivindicación 51 que además comprende medir uno o más biomarcadores en la muestra de fluido o tejido del paciente, donde los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en endotoxina, ADN bacteriano, proteína C, procalcitonina, Proteína de unión a LBP - LPS, productos de degradación de fibrina, antitrombina III, dímero D, HLA-DR, CD-64, E-selectina, cortisol, ACTH, CD-14, sTNF-RI, sTNF- RII, TNF, IL-6, IL- 8 y IL- 10, D-dímero, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, inhibidor-1 activador de

plasminógeno, trombomodulina soluble, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina, proteína S, antitrombina y TNF- α

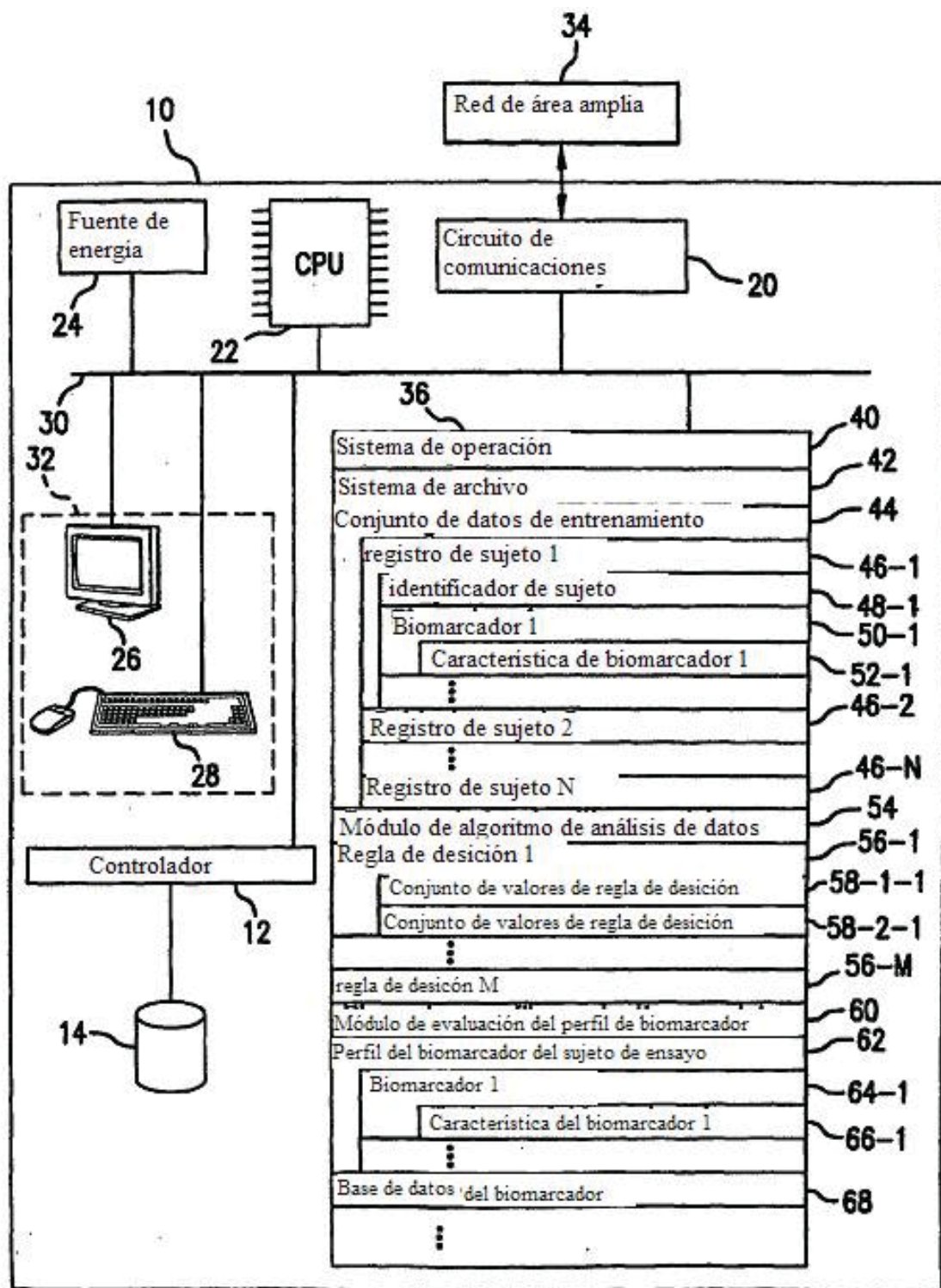


FIG. 1

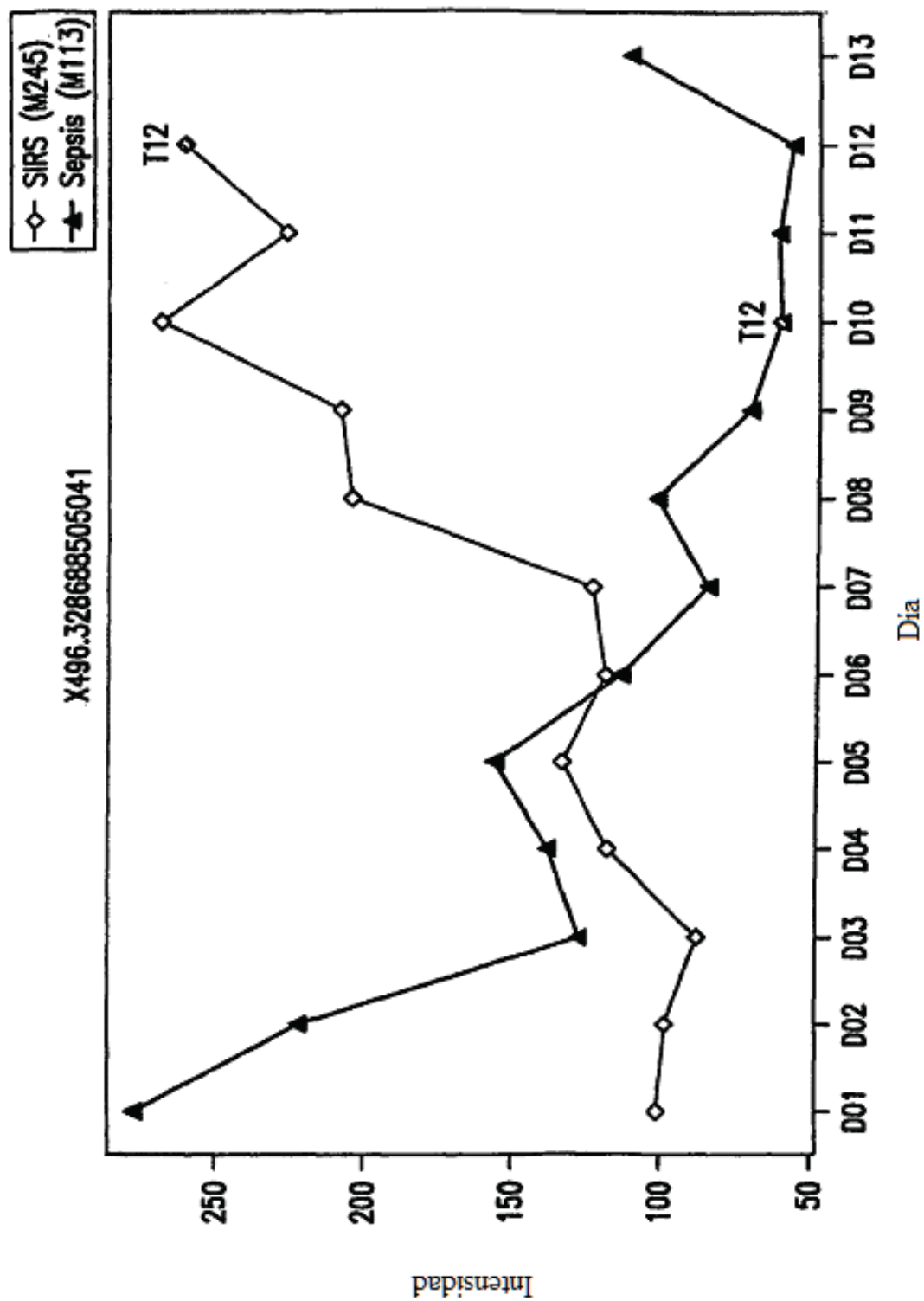


FIG.2

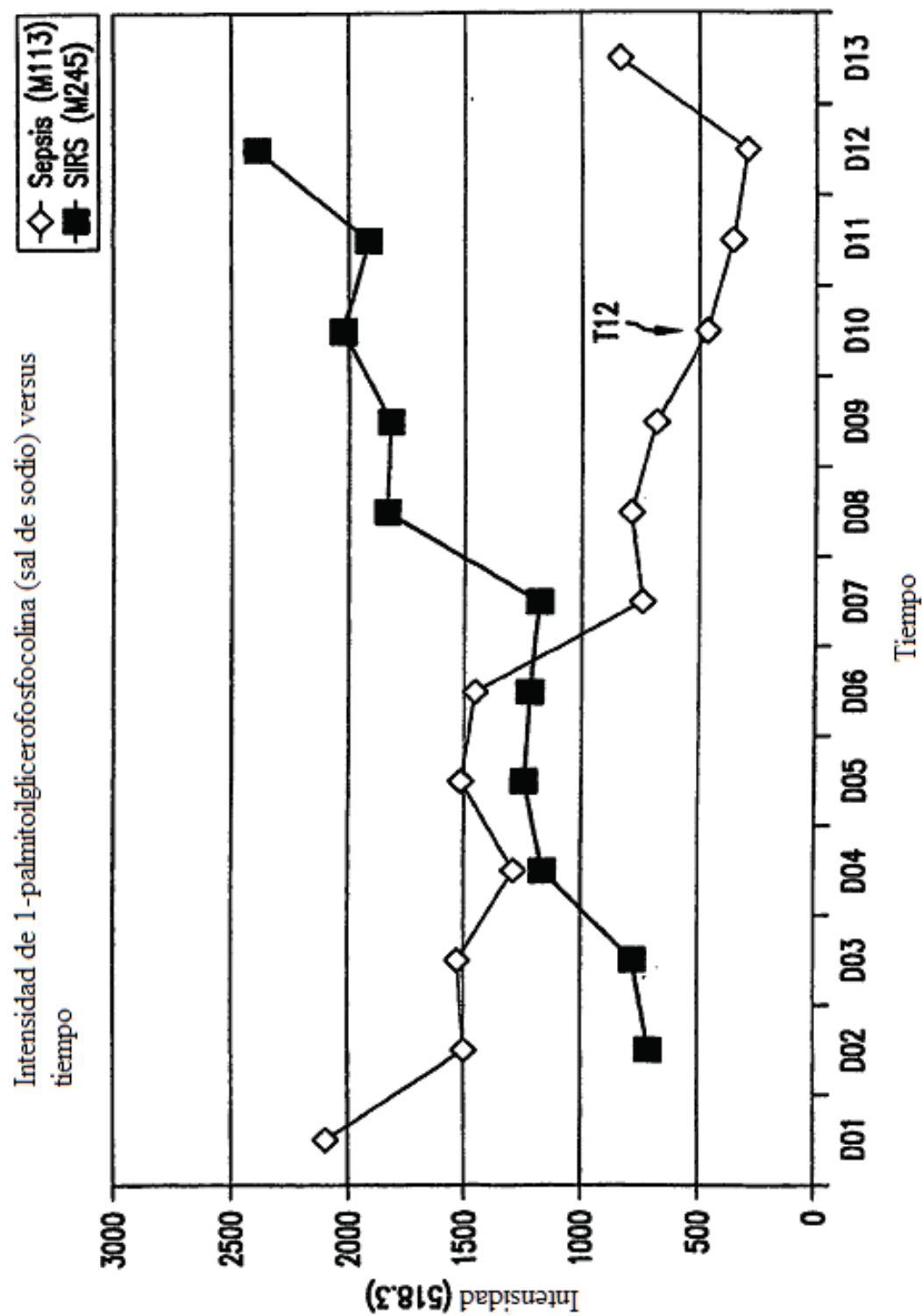


FIG.3

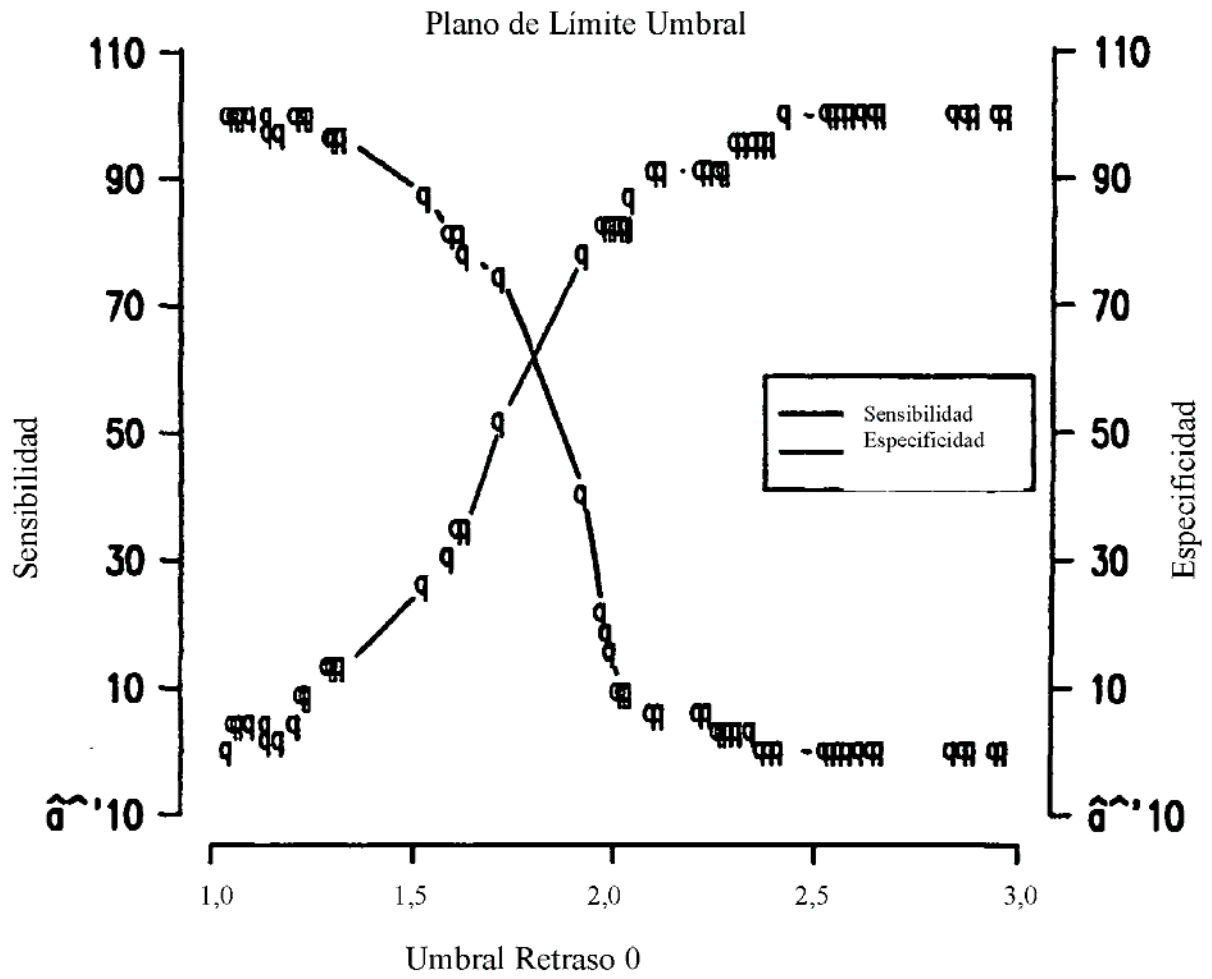


FIG.4-1

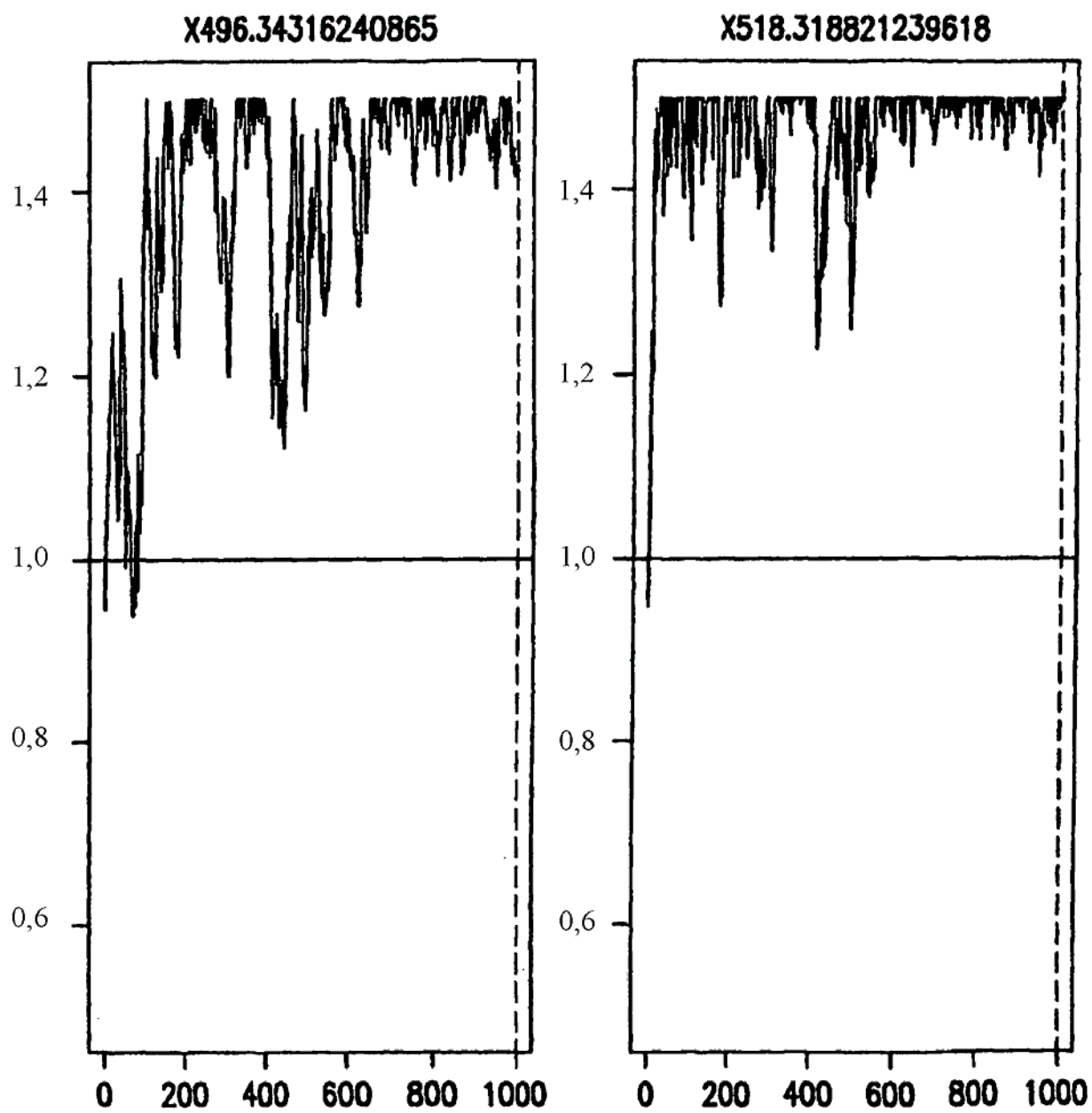


FIG.4-2

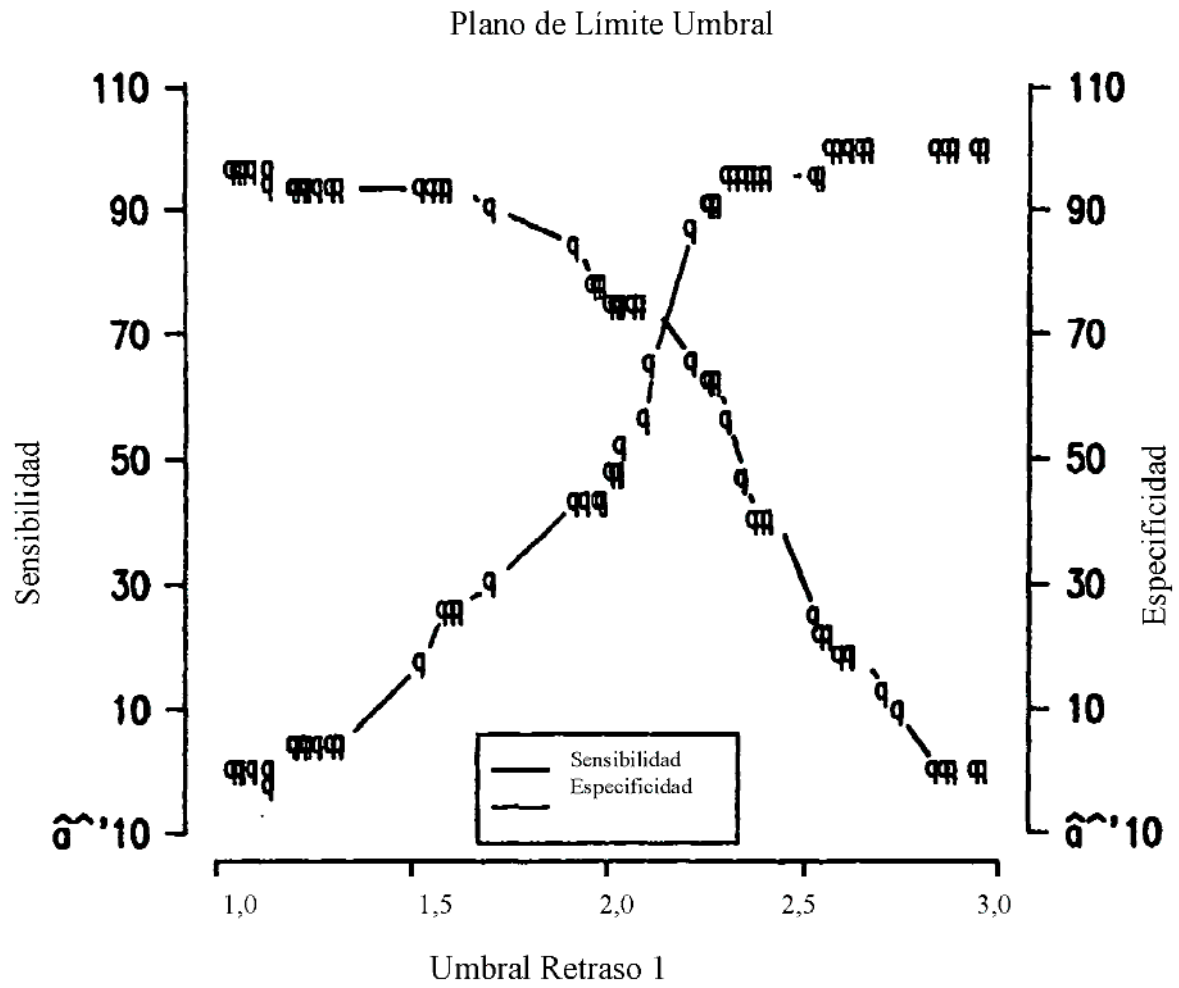


FIG.4-3

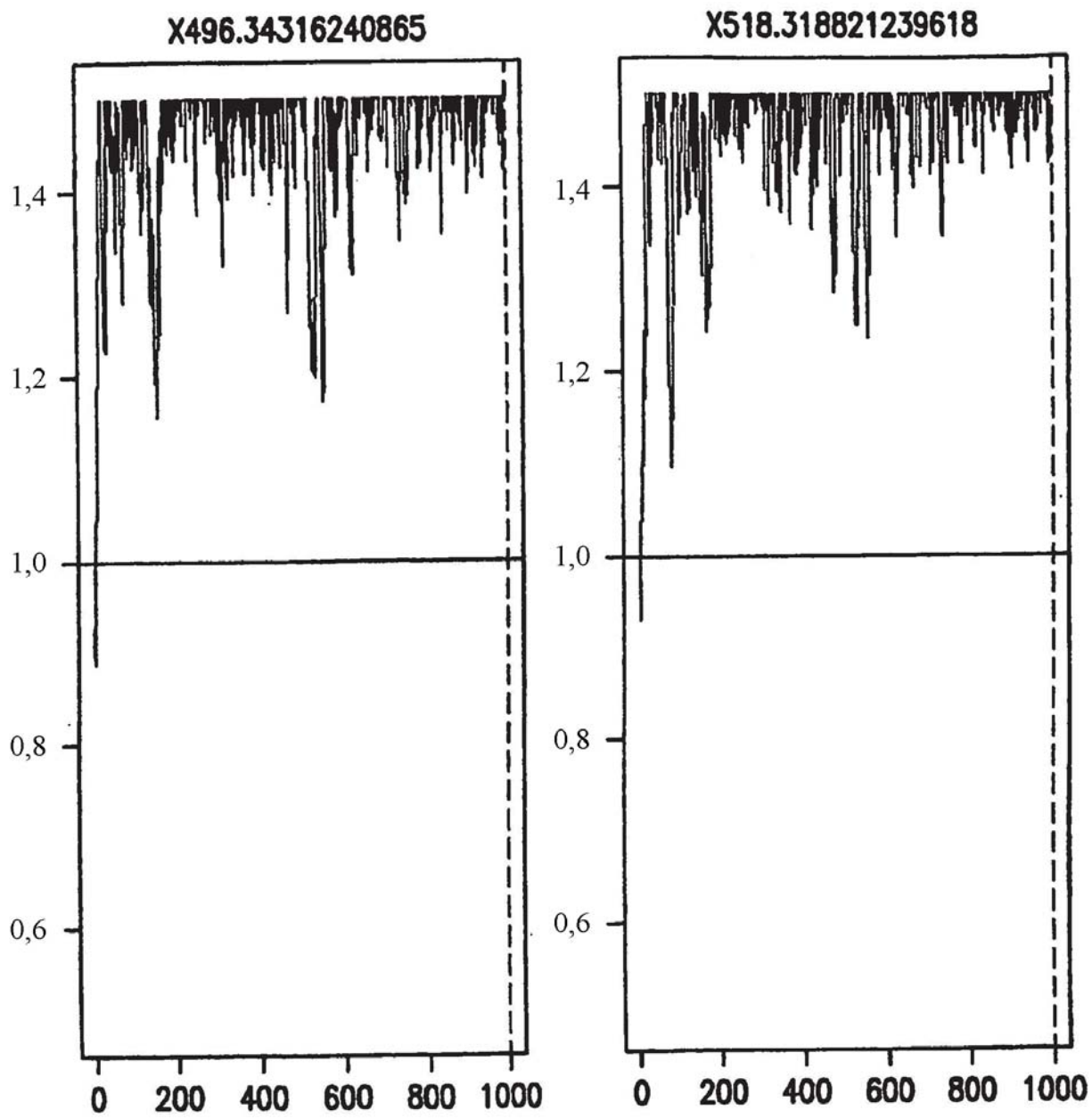


FIG.4-4

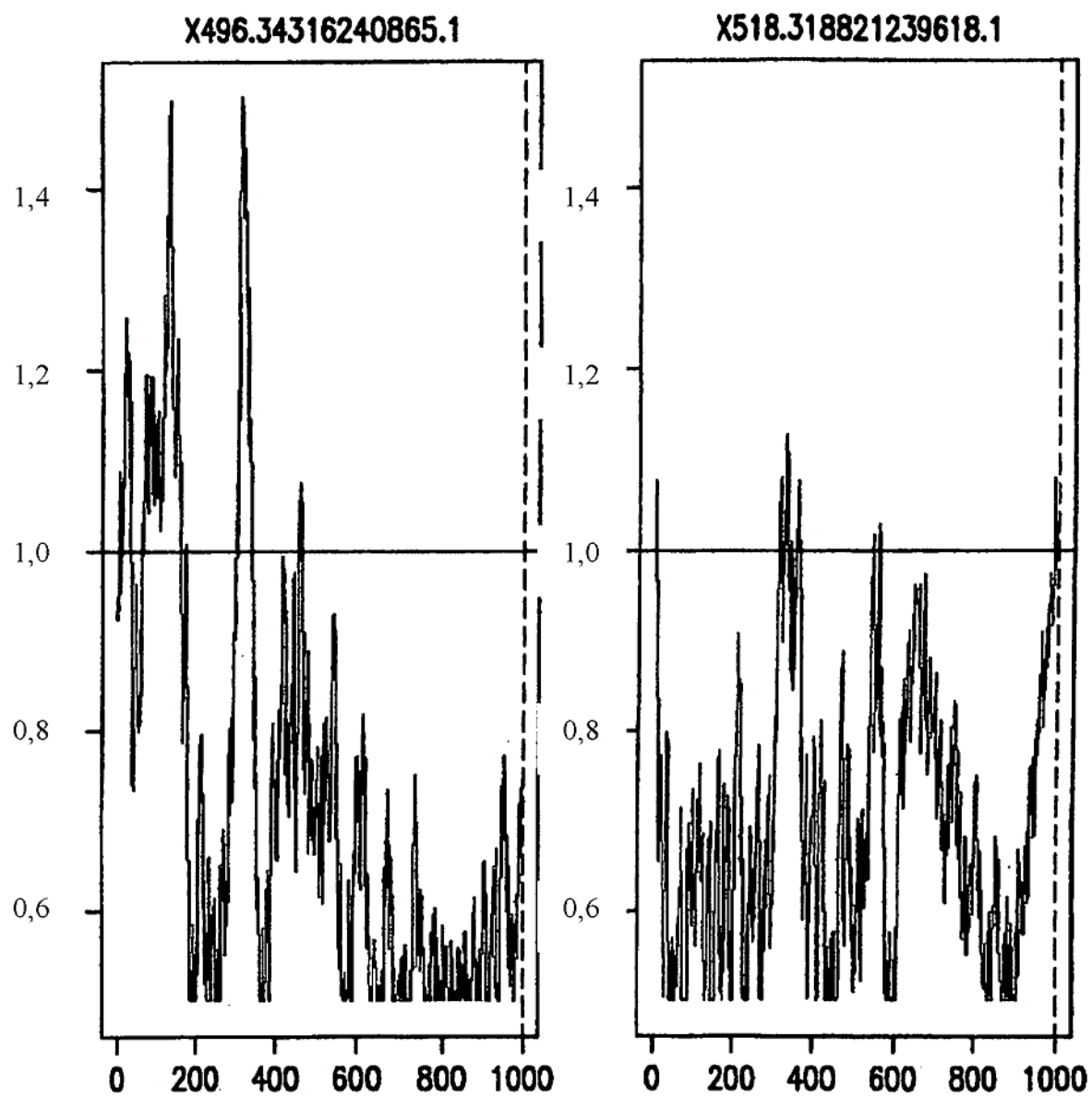


FIG.4-5

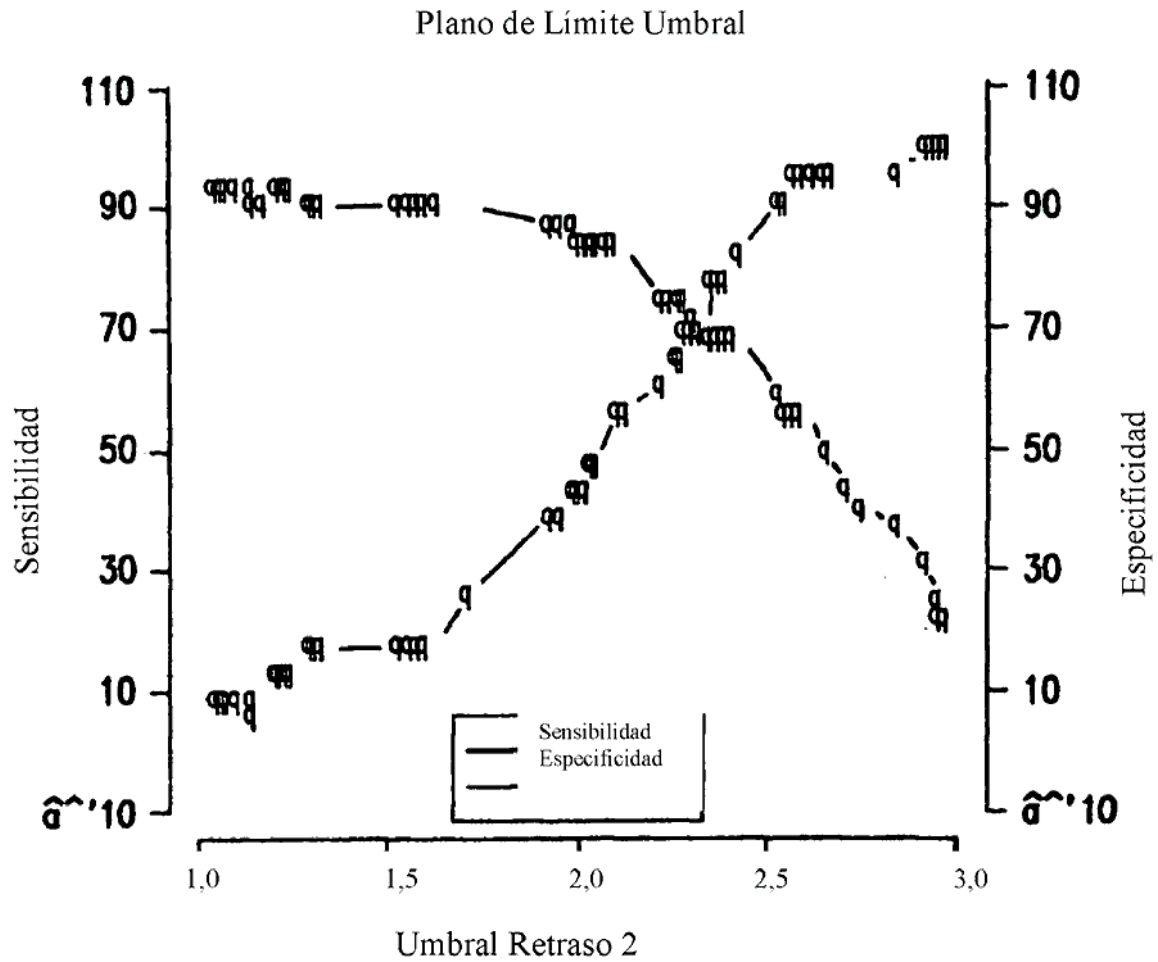


FIG.4-6

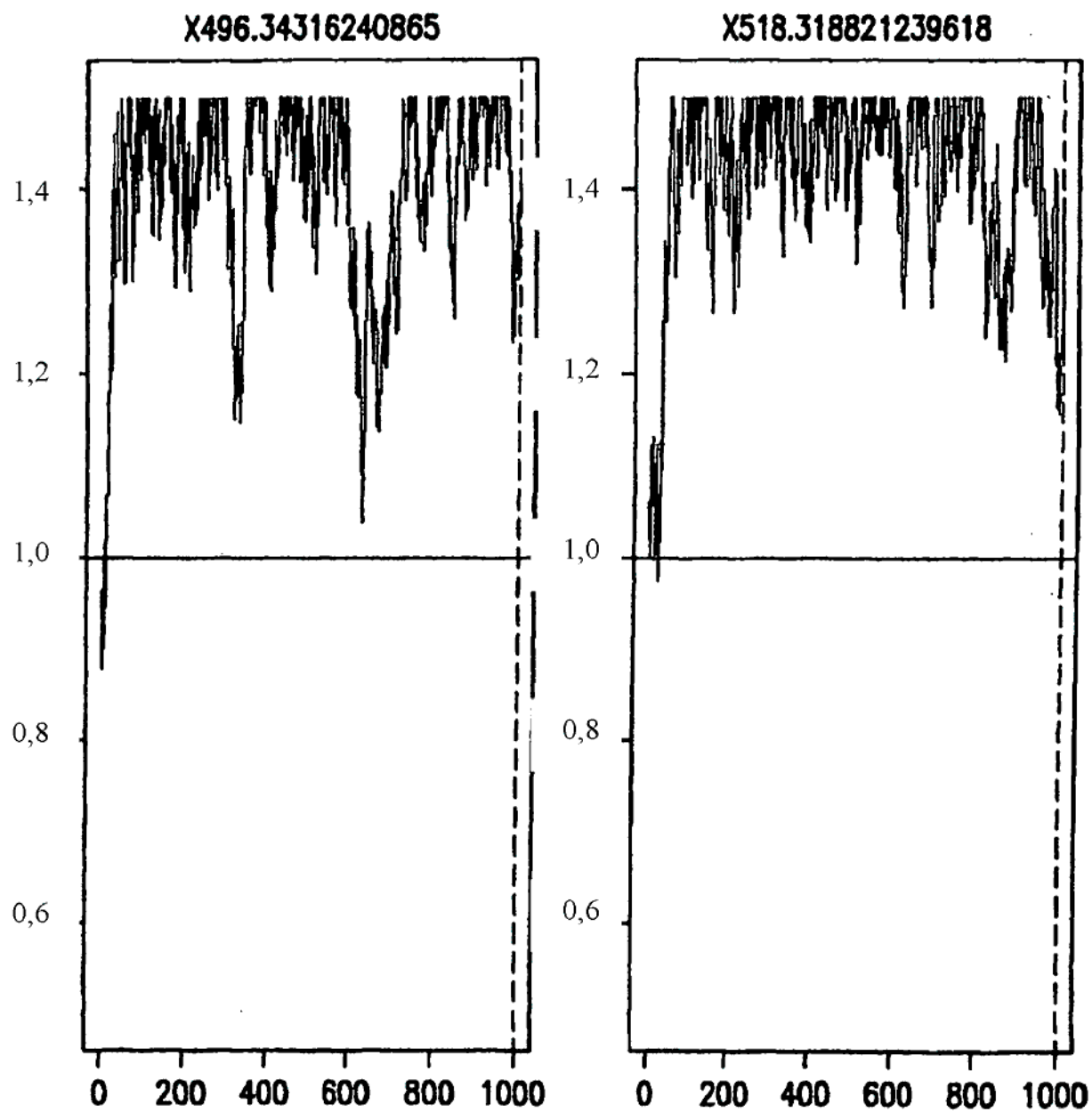


FIG.4-7

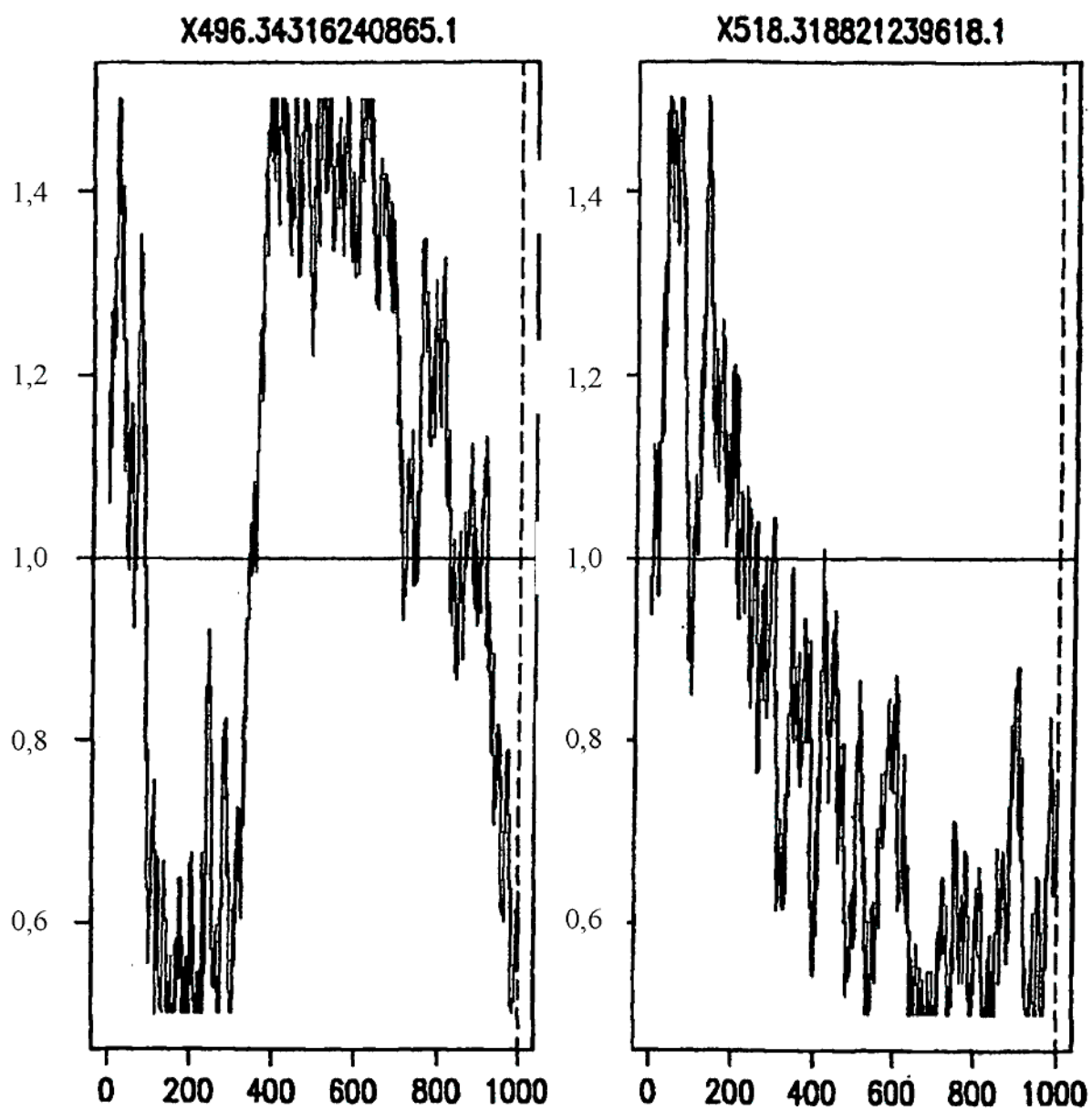


FIG.4-8

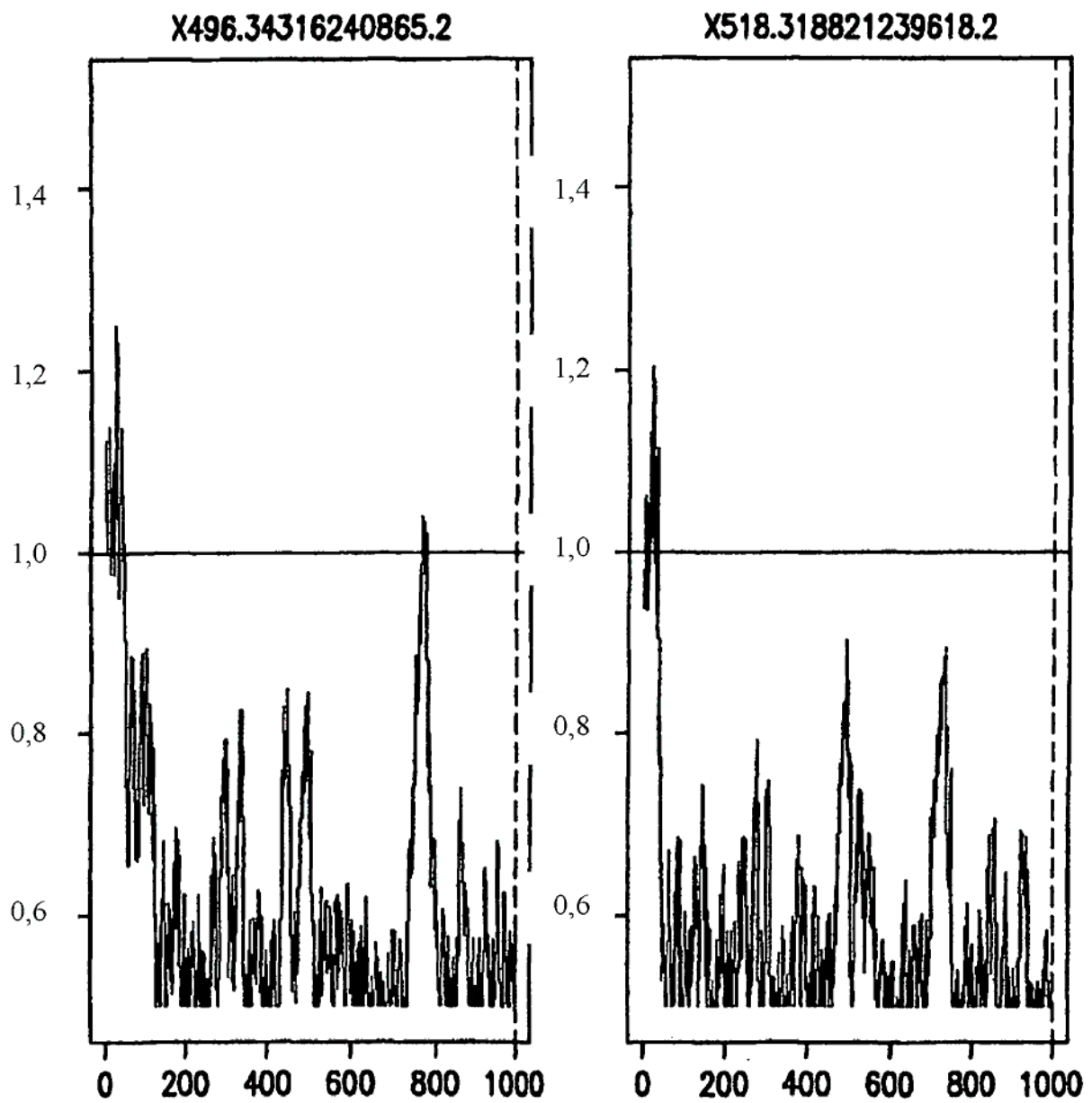


FIG.4-9

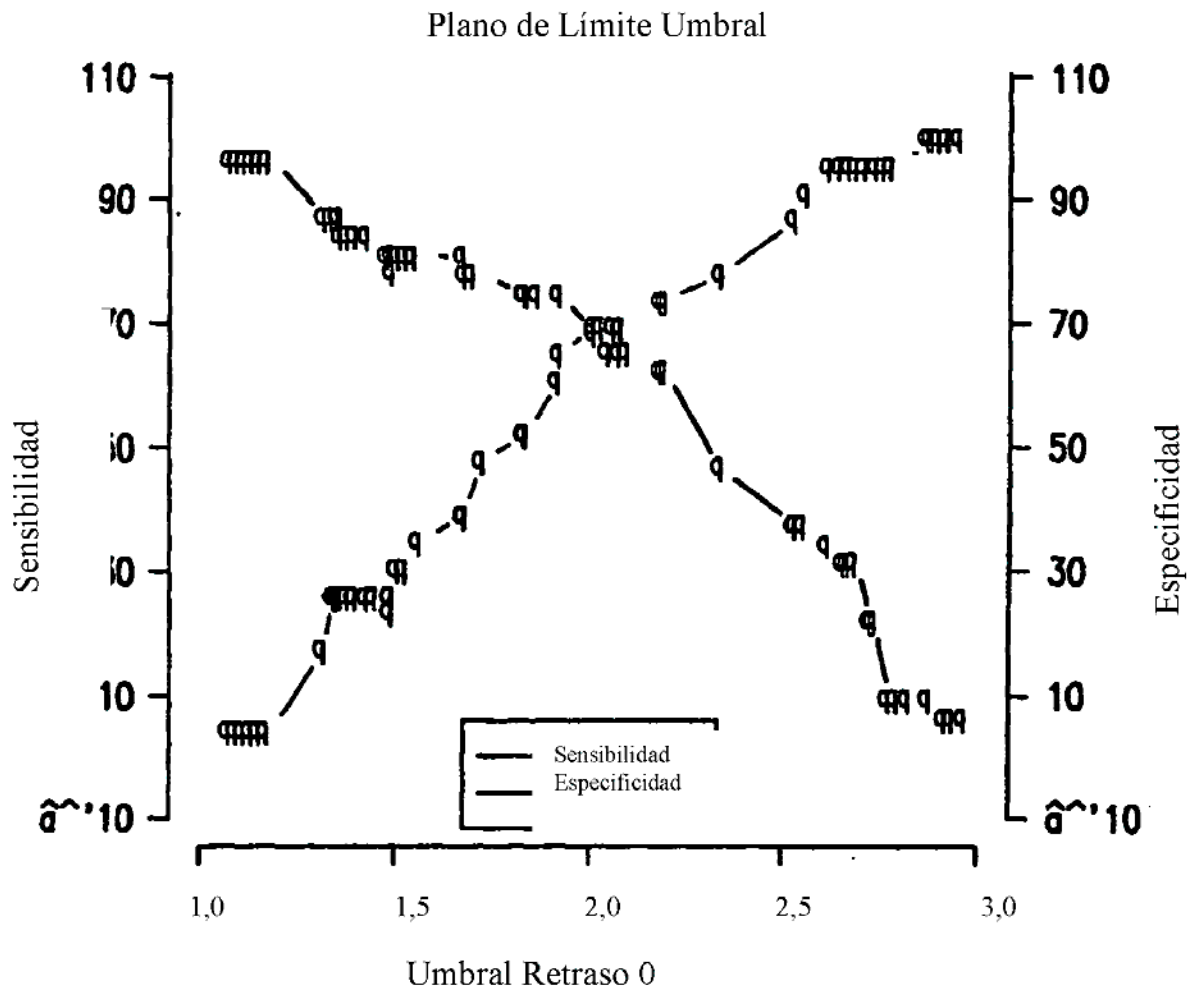


FIG.5-1

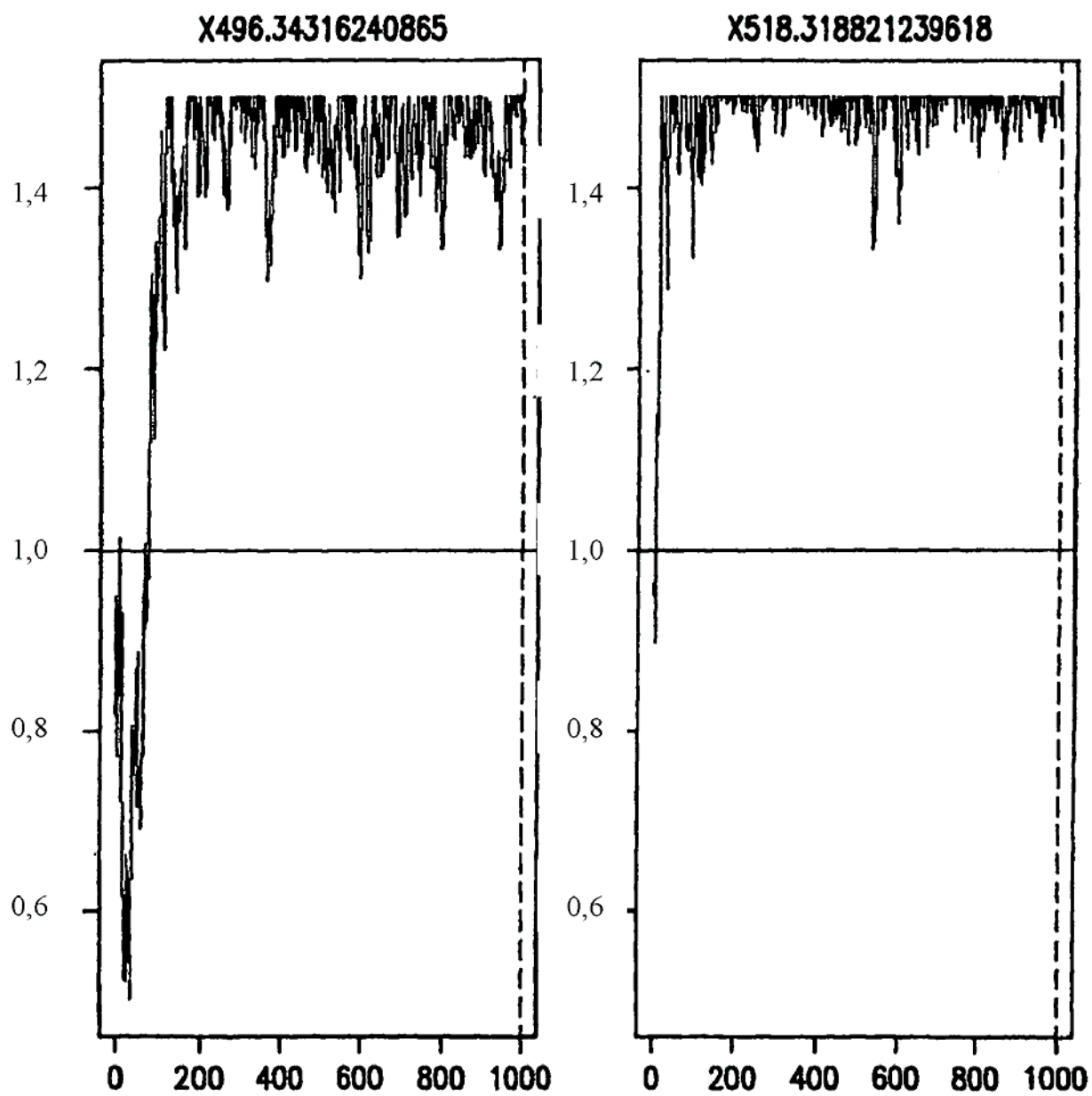


FIG.5-2

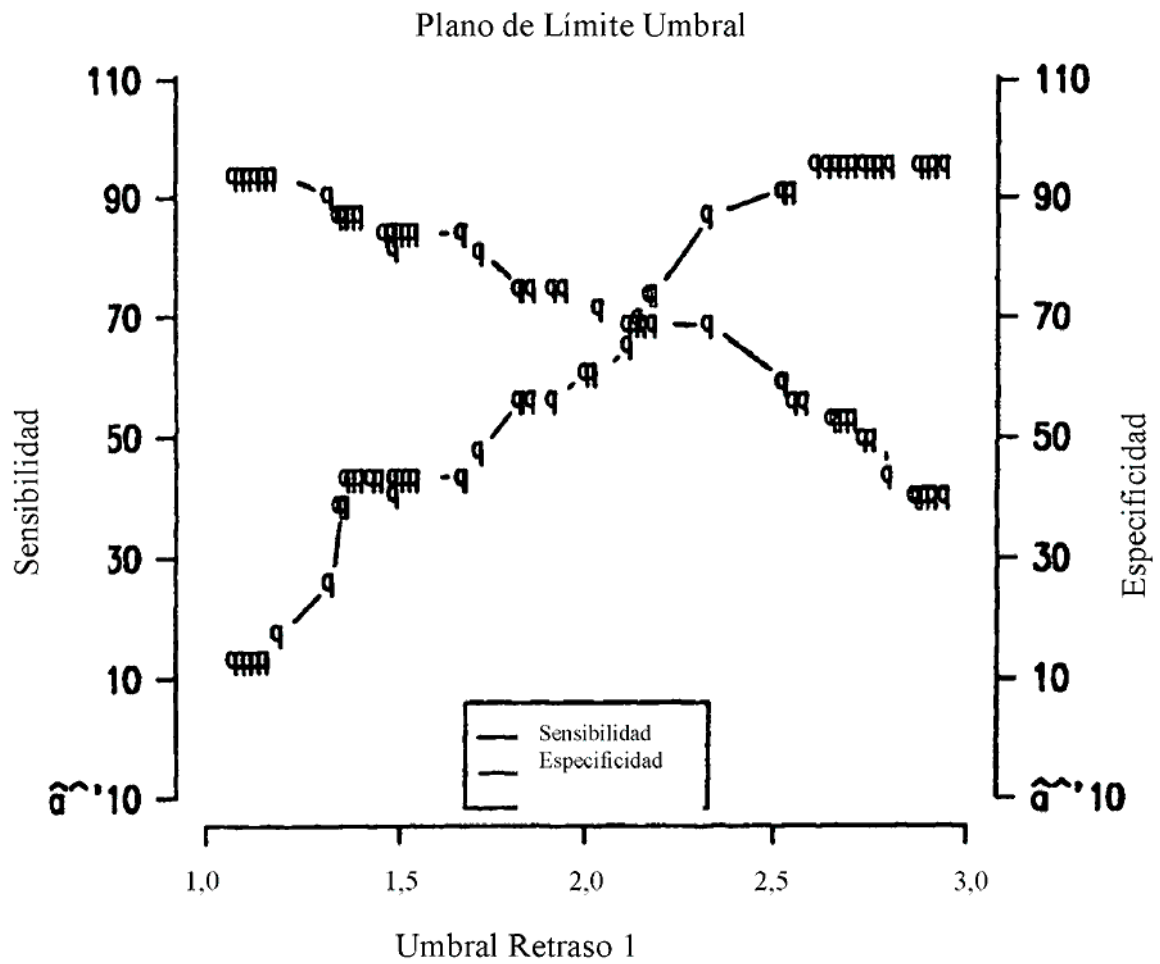


FIG.5-3

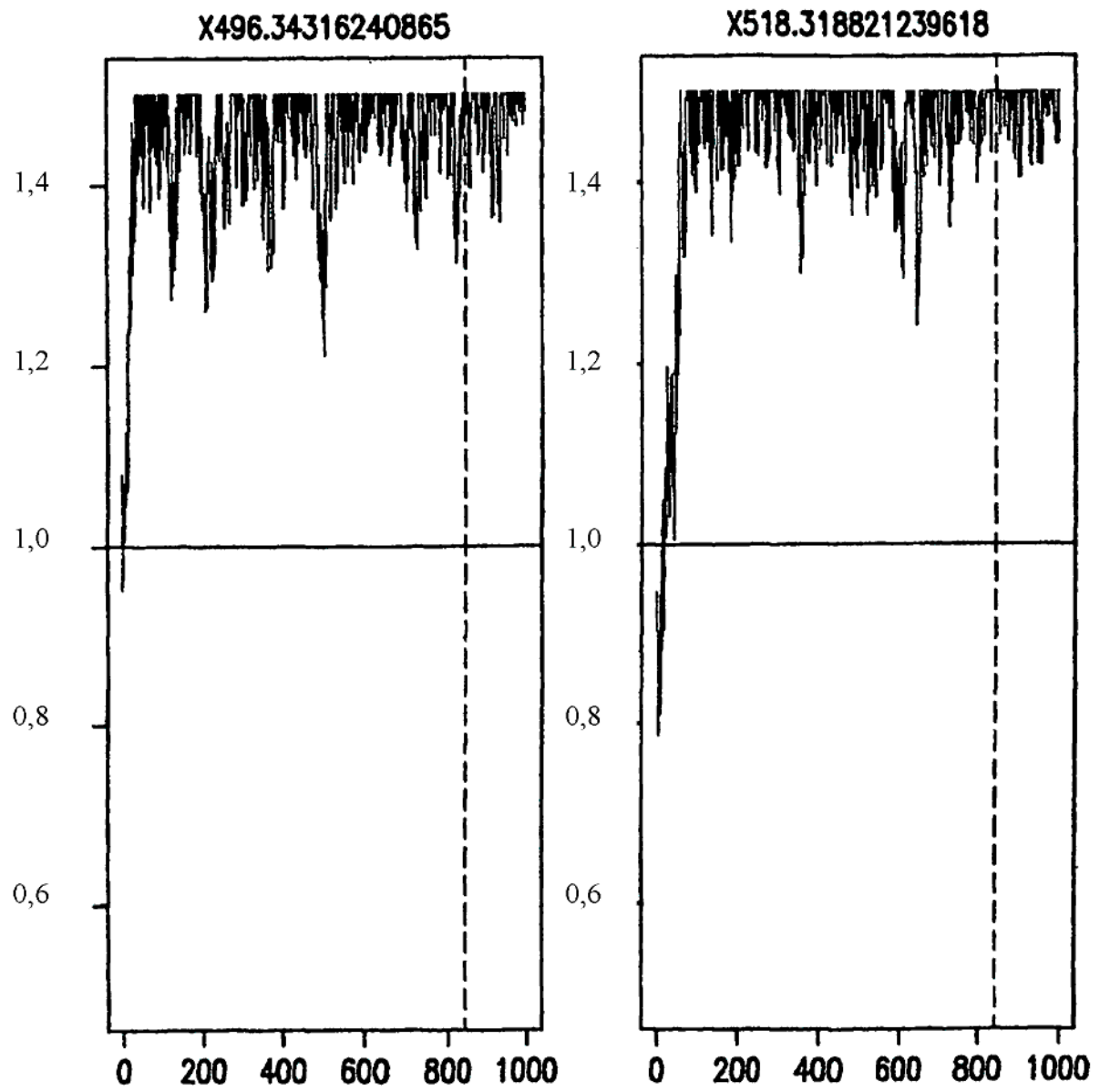


FIG.5-4

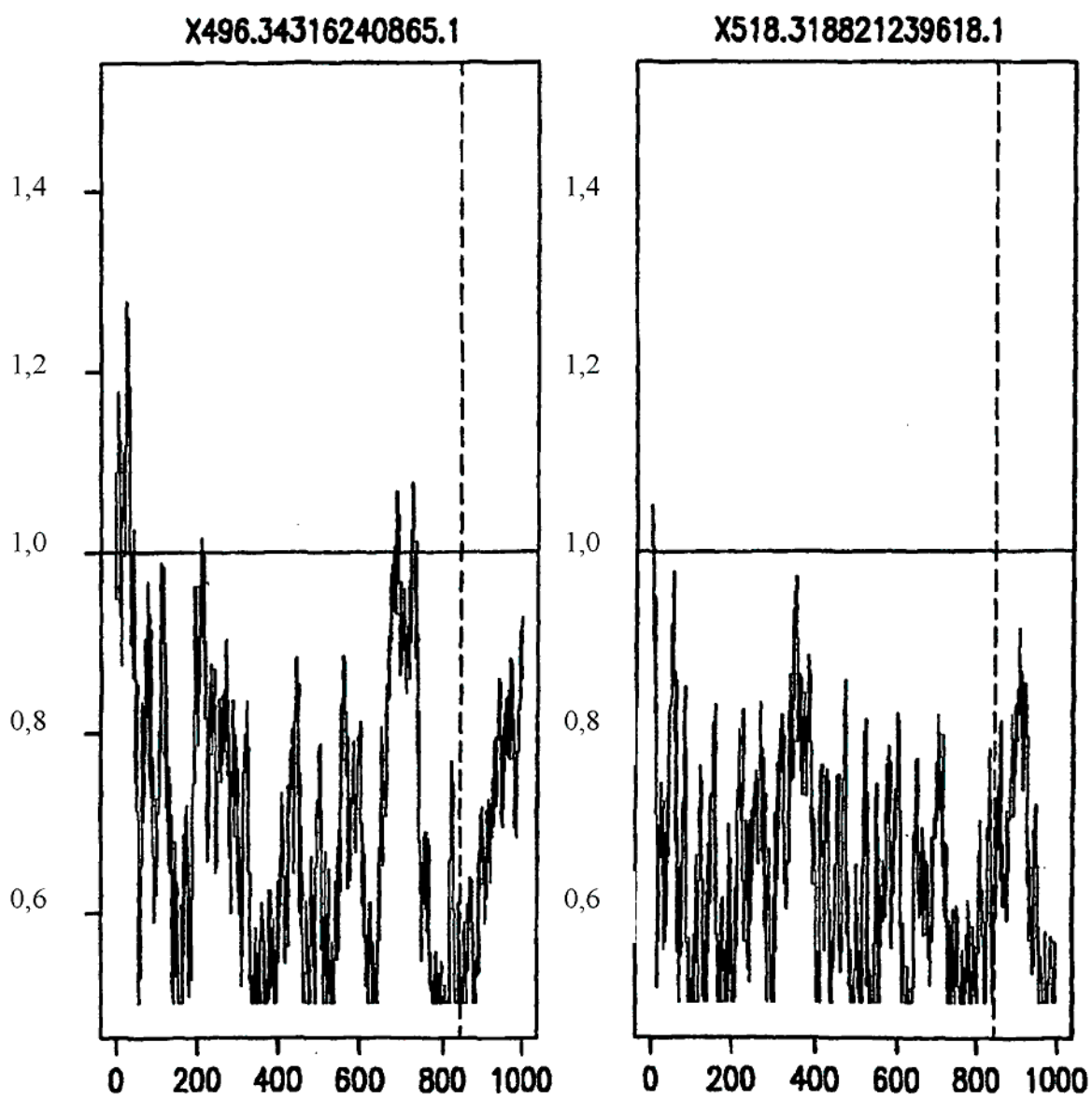


FIG.5-5

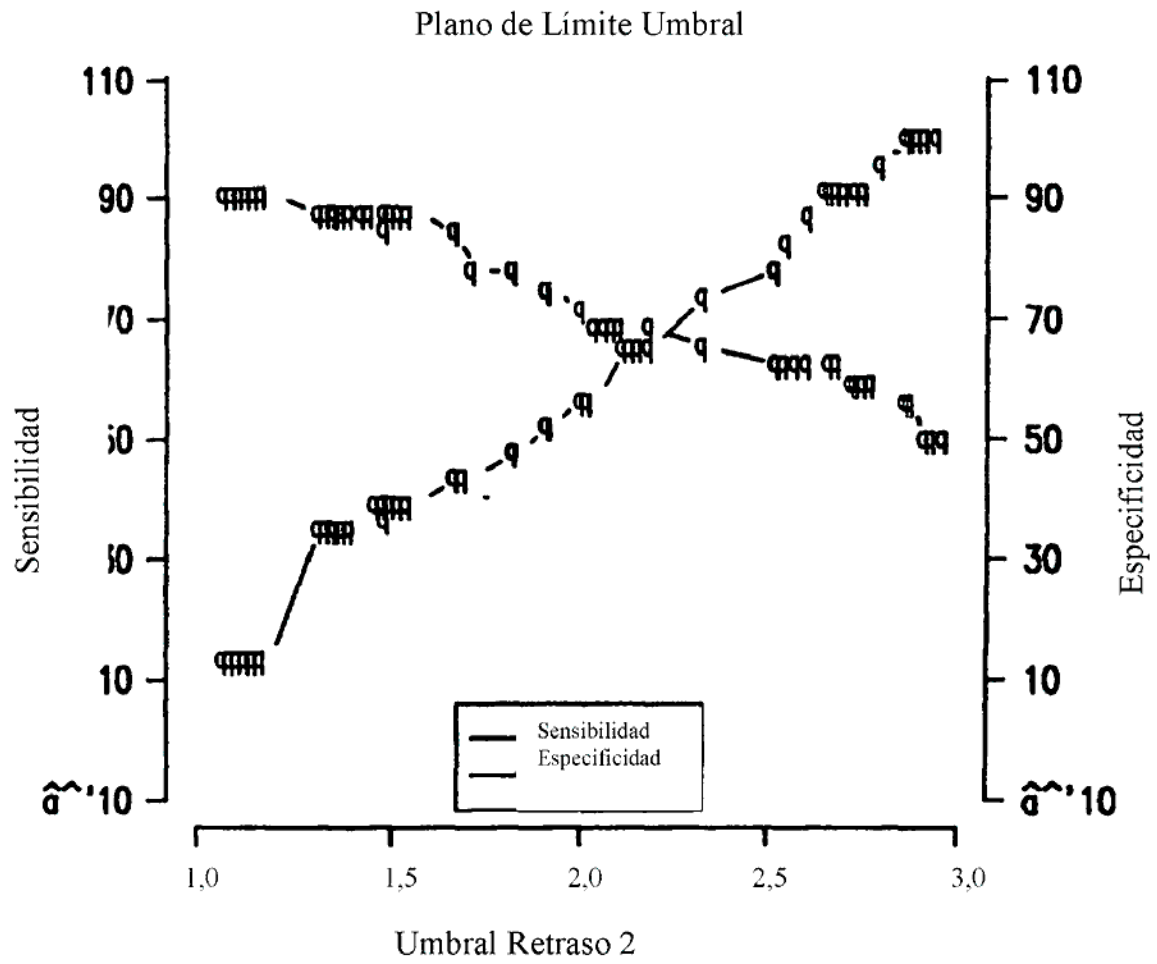


FIG.5-6

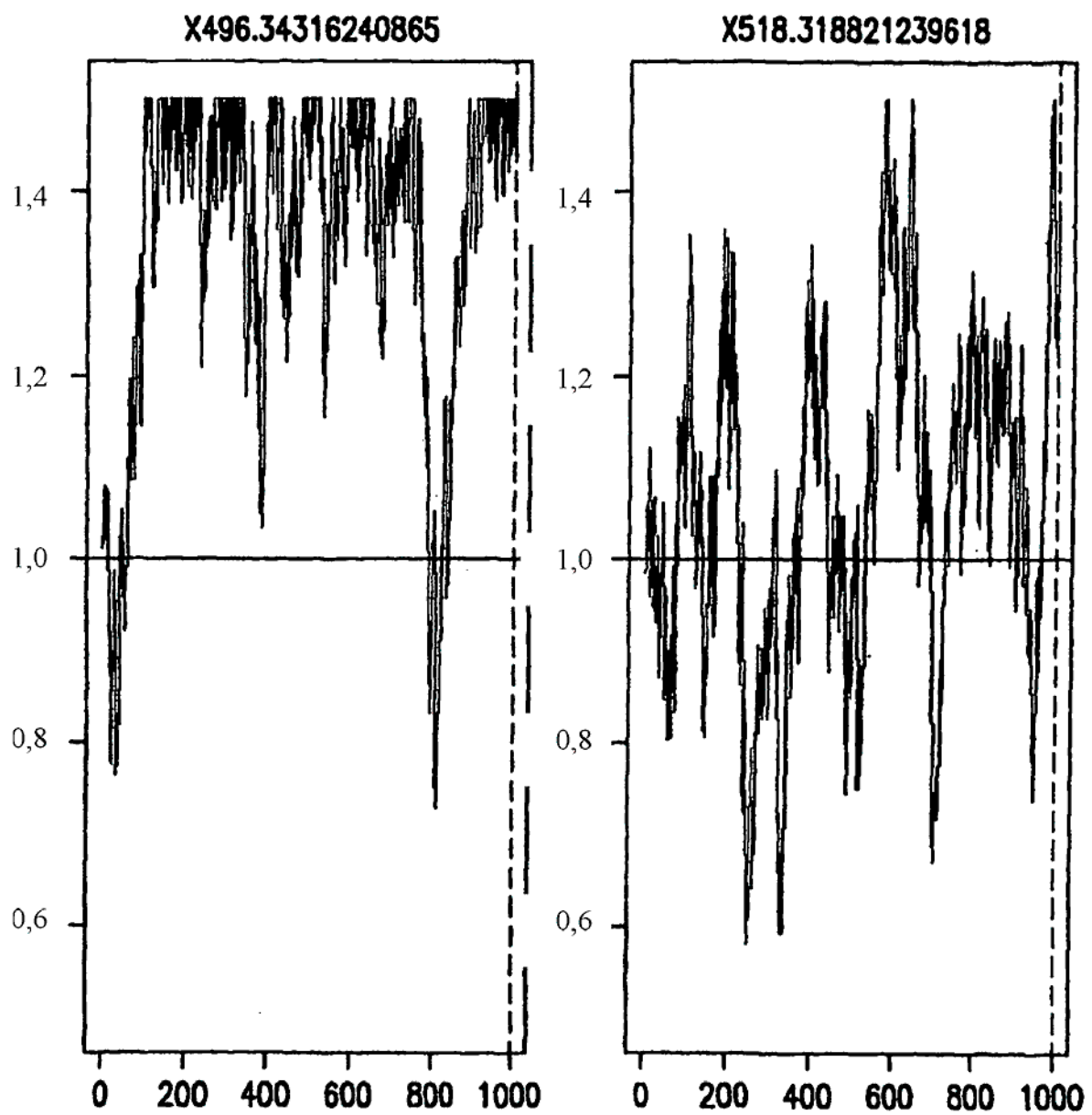


FIG.5-7

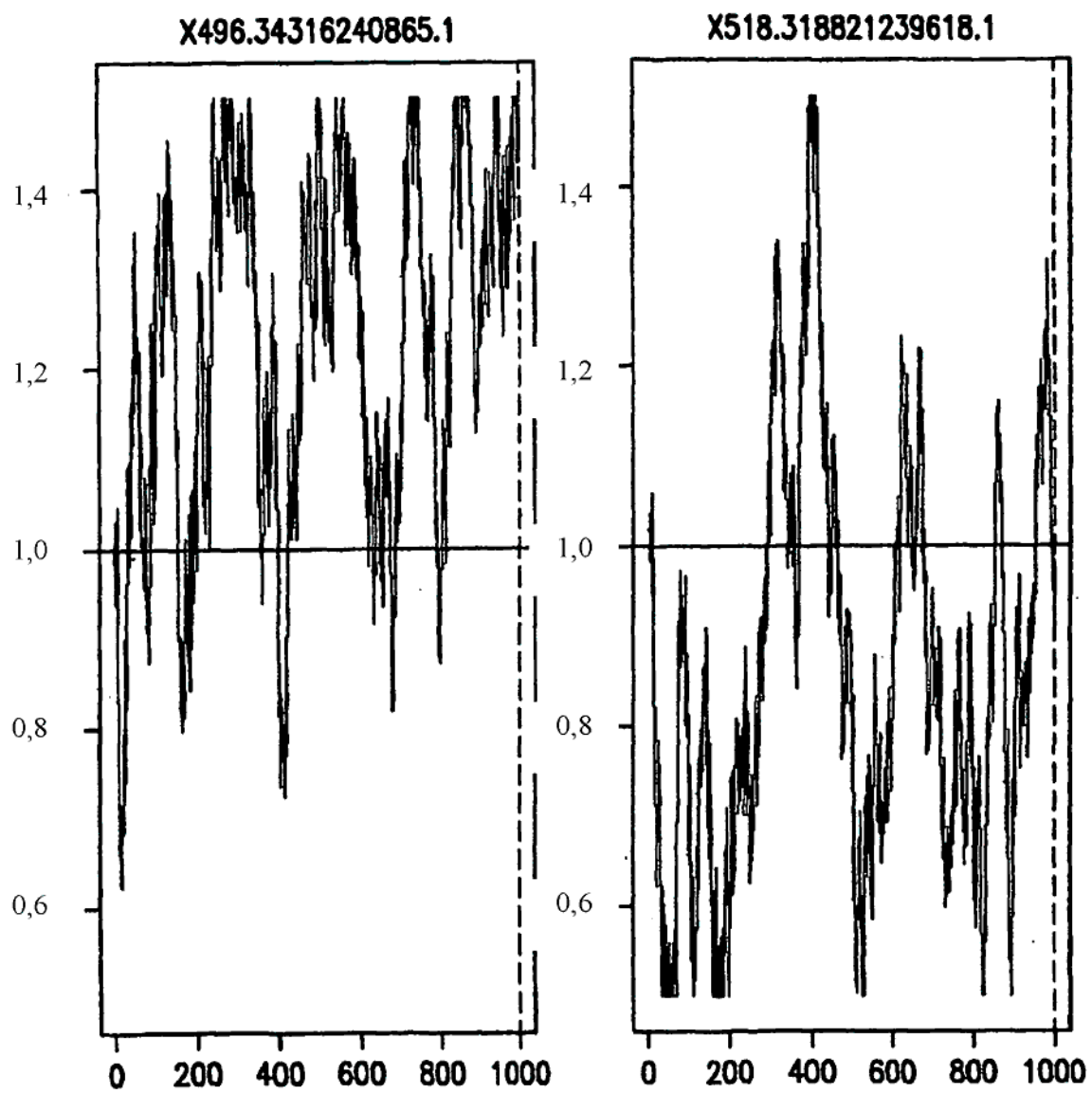


FIG.5-8

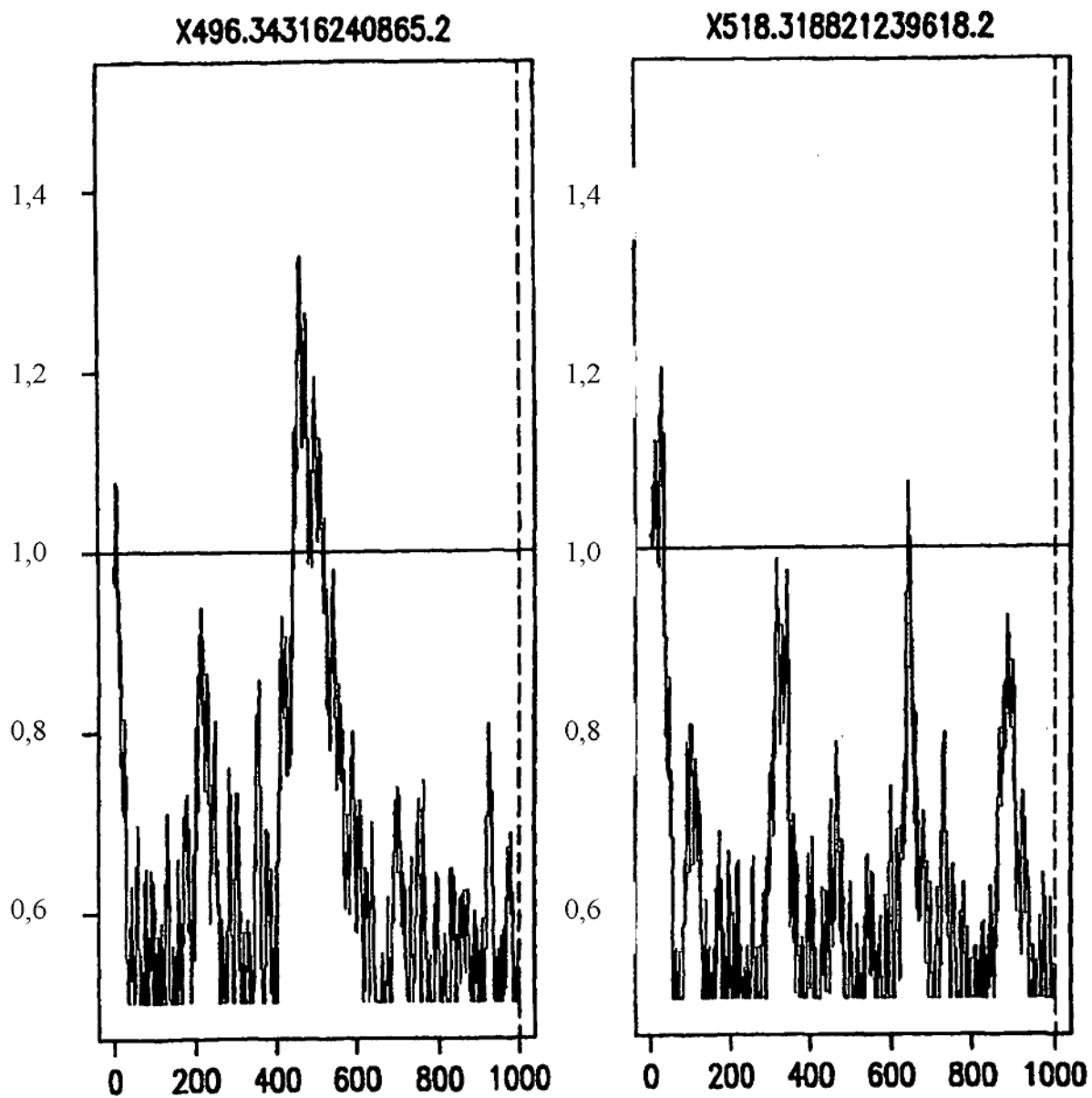


FIG.5-9

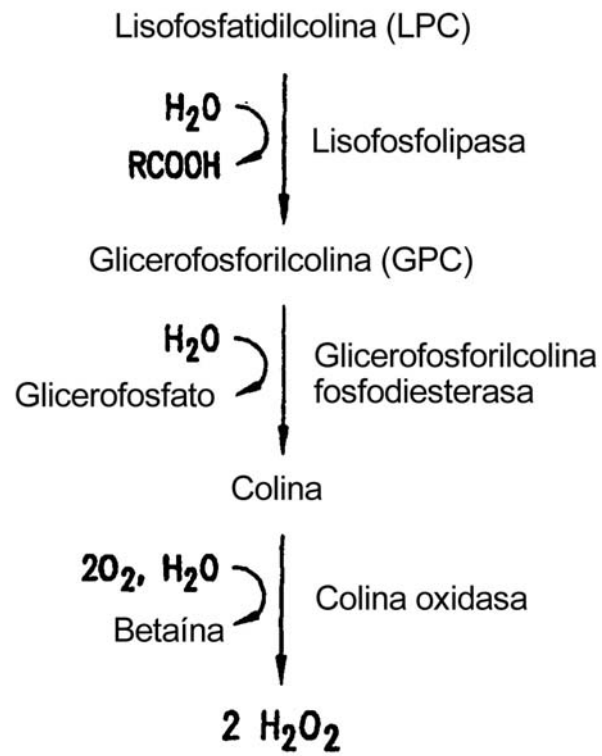
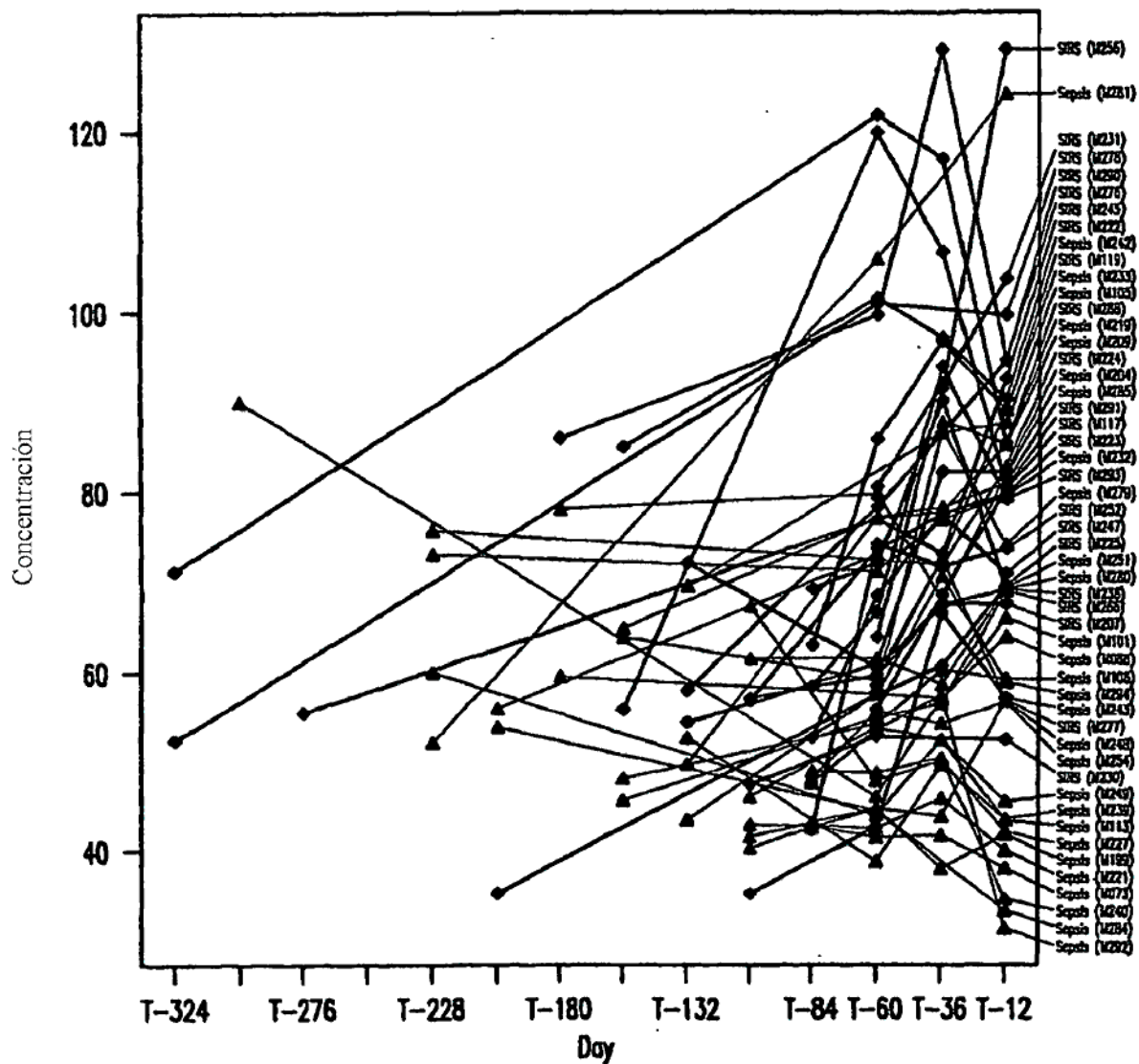


FIG.6



◆ SIRS (M256)	◆ Sepsis (M219)	◆ SIRS (M225)	◆ Sepsis (M254)
◆ Sepsis (M281)	◆ Sepsis (M209)	◆ Sepsis (M251)	◆ SIRS (M230)
◆ SIRS (M231)	◆ SIRS (M224)	◆ Sepsis (M280)	◆ Sepsis (M249)
◆ SIRS (M278)	◆ Sepsis (M204)	◆ SIRS (M236)	◆ Sepsis (M239)
◆ SIRS (M290)	◆ Sepsis (M285)	◆ SIRS (M266)	◆ Sepsis (M113)
◆ SIRS (M276)	◆ SIRS (M291)	◆ SIRS (M207)	◆ Sepsis (M227)
◆ SIRS (M245)	◆ SIRS (M117)	◆ Sepsis (M101)	◆ Sepsis (M199)
◆ SIRS (M222)	◆ SIRS (M223)	◆ Sepsis (M088)	◆ Sepsis (M221)
◆ Sepsis (M242)	◆ Sepsis (M232)	◆ Sepsis (M106)	◆ Sepsis (M073)
◆ SIRS (M119)	◆ SIRS (M293)	◆ Sepsis (M294)	◆ Sepsis (M240)
◆ Sepsis (M233)	◆ Sepsis (M279)	◆ Sepsis (M243)	◆ Sepsis (M284)
◆ Sepsis (M105)	◆ SIRS (M252)	◆ SIRS (M277)	◆ Sepsis (M292)
◆ SIRS (M288)	◆ SIRS (M247)	◆ Sepsis (M248)	

FIG.7