



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 923**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/76** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05727482 .1**  
96 Fecha de presentación : **31.03.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1744160**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2007**

54 Título: **Uso de adiponectina como marcador en la predicción de infección postoperatoria.**

30 Prioridad: **31.03.2004 JP 2004-134823**  
**31.03.2004 JP 2004-134824**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.10.2011**

73 Titular/es: **Kazuhisa Maeda**  
**2-4-33, Hagoromo**  
**Takaishi-shi, Osaka 592-0002, JP**  
**Hiroshi Yamamoto**

72 Inventor/es: **Maeda, Kazuhisa y**  
**Yamamoto, Hiroshi**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 365 923 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de adiponectina como marcador en la predicción de infección postoperatoria

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para la predicción de infección postoperatoria usando adiponectina como un marcador.

10 **Antecedentes de la técnica**

Con los aumentos en la proporción de población con obesidad en los últimos años, el tratamiento peri operatorio de pacientes con obesidad se considera que se ha vuelto más importante en el campo de la cirugía. Además de la dificultad para realizar una operación en sí misma, la obesidad con frecuencia se complica con el denominado síndrome metabólico tal como, aterosclerosis, hipertensión y diabetes mellitus y tiene posibilidades altas de complicaciones incluyendo infección postoperatoria. Por lo tanto, se piensa que la obesidad es un factor de riesgo importante en las operaciones. Sin embargo, las influencias sobre el estrés quirúrgico en pacientes que tienen un riesgo de este tipo y el riesgo de complicaciones postoperatorias no podían convertirse previamente en números. Se conoce que la adiponectina muestra niveles bajos en pacientes con síndrome de factor de riesgo múltiple incluyendo pacientes con obesidad. La medición de adiponectina peri operatoria puede determinar las influencias sobre la cirugía de pacientes con síndrome de factor de riesgo múltiple.

Por otra parte, la invasión operatoria excesiva en el período peri operatorio algunas veces da resultados lamentables en el paciente. La forma de controlar la generación de citoquinas inflamatorias excesivas en una etapa temprana después de la cirugía es importante para prevenir la aparición de complicaciones postoperatorias, particularmente infección postoperatoria. Aunque recientemente se ha comenzado mediante la introducción de la medición inmediata de citoquinas en sangre en el tratamiento postoperatorio, puede ser importante para un método para el control de citoquinas controlar únicamente la reacción excesiva y mantener la reacción vital fundamental por sí misma. Se considera que el control más detallado de citoquinas o el tratamiento personalizado que tiene en cuenta la diferencia en la reacción de cada individuo es necesario en el futuro. Por tanto, se ha solicitado de forma contundente un marcador de estrés más práctico e infalible.

Además, los estudios sobre endotoxina se han conducido de forma activa en estudios en el campo biológico y tratamientos y estudios en el campo médico de los últimos años. Se ha dado atención particularmente a la activación del sistema inmune y la acción de estímulos para la producción de citoquinas. Estas acciones tienen una implicación marcada directamente en enfermedades tales como sepsis, insuficiencia hepática, insuficiencia respiratoria, DIC e insuficiencia orgánica múltiple (MOF) y ha existido un interés considerable en las medidas frente a las mismas durante mucho tiempo. Además, se ha revelado recientemente que la estimulación de endotoxina crónica y las citoquinas incluyendo TNF- $\alpha$  inducidas por esta estimulación están implicadas en las afecciones de enfermedades médicas incluyendo hígado graso y enfermedad intestinal inflamatoria.

Aunque se han desarrollado varias técnicas previamente como técnicas para neutralización o eliminación de endotoxinas, se han señalado sus propios problemas. Por ejemplo, la terapia de reemplazo de globulina que usa inmunoglobulina anti-polisacárido de núcleo de LPS no tiene un efecto preventivo suficiente sobre la infección y la mejora en el índice de mortalidad atribuido a choque. La terapia de anticuerpo monoclonal frente a lípido A tampoco es suficiente para la mejora en el índice de mortalidad atribuido a choque. Con avances en terapia de péptido antibacteriano (péptido CAP18) encontrados a partir de neutrófilos humanos y además en el análisis de señales a través de un receptor específico de endotoxina (TLR), se ha esperado la posibilidad de anticuerpos anti-TLR como fármacos terapéuticos para choque de endotoxina. Sin embargo, ninguno de ellos ha conducido a una aplicación clínica. Además, una columna con polimixina B adsorbida, lo único que se usa clínicamente, emplea la circulación extracorpórea y como tal, presenta problemas asociados con rentabilidad, plaquetas en sangre disminuidas y así sucesivamente. Adicionalmente, no estaba claro si la columna mejora la citoquinemia, que básicamente constituye la sepsis. Como se ha descrito anteriormente, las técnicas convencionales no son eficaces como técnicas para la neutralización de endotoxinas. Por tanto, la mejora y desarrollo de las mismas se ha demandado de forma contundente.

En su estudio, Keller *et al.* midieron los niveles de adiponectina, TNF- $\alpha$  e IL-6 en ser humano sano después de un bolo intravenoso de endotoxina y en sujetos inyectados con solución salina. Observaron que el descanso en un estado de ayuno viene seguido de una disminución en los niveles en plasma de adiponectina y que esta disminución no se observa en sujetos que reciben endotoxina (Keller P, Moller K, Krabbe KS, Pedersen BK (2003) Circulating adiponectin levels Turing human endotoxaemia. Clin. Exp. Immunol. 134: 107-110).

Tanowitz *et al.* informaron que la infección aguda *in vivo* con *Trypanosoma cruzi* estaba asociada con una disminución significativa de los niveles en suero de adiponectina (Tanowitz HB, Mukherjee S, Zhao D, Braunstein VB, Combs TP, Scherer P (2003) American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 69 (3, Suppl.): 289).

## Sumario de la invención

La invención en su forma más amplia se define mediante las reivindicaciones independientes 1 y 5; las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes 2-4, 6 y 7:

- 5 1. Un método *in vitro* para la predicción de infección postoperatoria en seres humanos que comprende la medición del nivel de adiponectina en la sangre antes y después de la operación y el cálculo de una proporción del nivel de adiponectina después de la operación al nivel de adiponectina antes de la operación.
- 10 2. El método para la predicción de infección postoperatoria en seres humanos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la operación es un tratamiento de trasplante.
- 15 3. El método para la predicción de infección postoperatoria en seres humanos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la infección está implicada en sepsis, hipercitoquinemia o insuficiencia orgánica múltiple.
- 20 4. Un método para medir estrés quirúrgico en un paciente con síndrome metabólico usando el método para la predicción de infección postoperatoria en seres humanos de acuerdo con la reivindicación 1.
- 25 5. Uso de adiponectina como un marcador en la predicción de infección postoperatoria en seres humanos.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la adiponectina se usa como un marcador para sepsis, hipercitoquinemia o insuficiencia orgánica múltiple.
7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en el que un nivel de adiponectina disminuido en sangre después en comparación con antes de la operación es un marcador de infección.

## Breve descripción de los dibujos

30 [Figura 1] La Figura 1 muestra un resultado del cálculo de un valor promedio de la concentración de adiponectina en sangre después de cirugía y la desviación típica y es un gráfico que muestra que el nivel de adiponectina en sangre está disminuido debido a invasión operatoria;

35 [Figura 2] La Figura 2 es un gráfico que muestra un resultado de la comparación entre un grupo con infección (grupo positivo para el nivel de SLP en sangre) y un grupo negativo 10 días después de la cirugía. El gráfico muestra que el nivel de adiponectina está reducido significativamente en el grupo positivo a SLP después de la cirugía en comparación con antes de la cirugía; y

40 [Figura 3] La Figura 3 es un gráfico que muestra que una concentración fisiológica de adiponectina neutraliza una concentración baja de LPS y endotoxina.

## Mejor modo para realizar la invención

45 La adiponectina es un factor endocrino específico de tejido adiposo clonado por el inventor en el Instituto para la Biología Molecular y Celular, Universidad de Osaka (Maeda K *et al.*; Biochem Biophys Res Commun 221 (2): 286-9, 1996). Se ha revelado que su concentración en sangre está disminuida en individuos obesos y que incluso en el mismo grado de obesidad, la adiponectina en sangre está disminuida en enfermedades ateroscleróticas tales como infarto de miocardio y angina de pecho y en diabetes mellitus (Maeda K *et al.*: Annual Review 2004, Internal Secretion, Metabolism, p15-19). Por tanto, la adiponectina también se considera que es eficaz para comprender el estado general antes y después de la cirugía en pacientes con el denominado síndrome metabólico tal como diabetes mellitus, hipertensión e hiperlipidemia.

55 Los presentes inventores han observado recientemente que la adiponectina directamente tiene la acción de inhibir la actividad de endotoxina. La sangre después de la cirugía contiene endotoxina en una concentración relativamente elevada. Esto conduce a una concentración disminuida de adiponectina que tiene la función de inhibir la activación de esta endotoxina. Esto se considera que es debido a que la adiponectina se consume como un neutralizador endógeno que actúa sobre la endotoxina o porque la concentración de adiponectina está disminuida como un resultado de la hipercitoquinemia provocada por endotoxina o infección. Por tanto, es aún más útil para el control de la condición física prestar atención a esta adiponectina en la supervisión de invasión postoperatoria.

60 La endotoxina es un componente celular bacteriano Gram-negativo que tiene diversas bioactividades. Clínicamente, la sepsis (endotoxemia) es bastante difícil de tratar y muestra tasa de mortalidad elevada debido a que aún está ausente una terapia eficaz para la enfermedad. Recientemente, los presentes inventores han creado un modelo de peritonitis de rata y medido la adiponectina, endotoxina y TNF- $\alpha$  en sangre. Como resultado, los presentes inventores han observado que la endotoxina y el TNF- $\alpha$  en sangre están aumentados en este modelo de peritonitis en comparación con un grupo de control, mientras que la adiponectina en sangre está disminuida significativamente en el mismo y se encuentra en una relación de imagen especular con TNF- $\alpha$ . Esto indica la posibilidad de que la

adiponectina se consume como un neutralizador endógeno que actúa sobre la endotoxina en peritonitis, que es hiperendotoxemia. Debido a que la inhibición mutua de adiponectina y una citoquina inflamatoria TNF- $\alpha$  se ha informado *in vitro*, esta disminución en la adiponectina puede ser una reacción indirecta asociada con el aumento de TNF- $\alpha$  activado por endotoxina. En cualquier caso, la adiponectina o un potenciador de la producción de adiponectina pueden ser capaces de convertirse en un avance importante en sepsis difícil de tratar.

La sangre después de la cirugía, particularmente después de la cirugía abdominal, se considera que contiene endotoxina en una concentración relativamente elevada. Los presentes inventores han medido los niveles de adiponectina en sangre antes y después de la cirugía abdominal y han observado que el nivel de adiponectina en sangre está disminuido después de la cirugía en comparación con antes de la cirugía y que el índice de esta disminución es elevado en casos complicados con enfermedad de infección postoperatoria. La medición de los niveles de adiponectina antes y después de la cirugía puede determinar el grado de estrés quirúrgico y puede proporcionar la predicción de infección postoperatoria. Aunque se ha usado frecuentemente CRP clínicamente hasta ahora como un marcador para la reacción inflamatoria aguda postoperatoria, este marcador difícilmente puede reflejar cambios de inflamación real en tiempo real. Parece ser aún más útil para el tratamiento postoperatorio compuesto principalmente de medidas frente a la infección prestar atención no sólo a los comportamientos de citoquinas inflamatorias y CRP sino más bien al comportamiento de adiponectina que sirve como una citoquina antiinflamatoria durante la inflamación aguda incluyendo invasión postoperatoria. Esta técnica es útil para una ruta clínica que se ha introducido recientemente a nivel nacional en aquellos pacientes que pueden saber cuáles son sus propios programas de tratamiento o en qué etapa se encuentra el tratamiento. Simultáneamente, este método se espera de forma marcada como una técnica que tiene un gran impacto sobre la medicina integral y la economía médica. También es posible usar adiponectina para determinar un ciclo terapéutico para la prevención de infección postoperatoria, como en el caso de la consideración del cambio de una subclase postoperatoria en una trayectoria clínica.

La significancia de la medición de adiponectina peri operatoria se resume como se ha descrito más adelante. En este contexto, el término "peri operatorio (periodo)" significa un periodo antes, durante y después de una operación o cirugía.

(1) Se puede evaluar el riesgo de síndrome metabólico que no se ha convertido previamente en números.

(2) La disminución en el nivel de adiponectina en sangre después de la cirugía que refleja estrés quirúrgico y un aumento en la citoquina inflamatoria TNF- $\alpha$  después de la cirugía sirve como un índice de estrés quirúrgico.

(3) La infección postoperatoria se puede pronosticar con un gráfico de correlación del nivel de SLP en sangre y adiponectina a los 10 días después de la cirugía.

En este contexto, con respecto a (3), la administración preventiva de agentes antimicrobianos después de la cirugía está básicamente limitada al día de la cirugía y al día siguiente en Europa y América, mientras que con frecuencia se administran durante varios días en Japón. Cuando se sospecha que el paciente tiene infección, se necesitan varios días para obtener el resultado del cultivo bacteriano, durante los cuales con frecuencia se continúa la administración de agentes antimicrobianos. Actualmente, varios hospitales universitarios han iniciado ensayos clínicos a gran escala para determinar si un nivel de SLP medido al día siguiente de la cirugía se puede usar como un índice para la presencia o ausencia de continuación de administración de agentes antimicrobianos durante los días posteriores. El uso de SLP, como se ha descrito anteriormente, apenas se ha iniciado en la predicción de infección postoperatoria.

Esta vez se ha demostrado que el nivel de SLP en sangre 10 días después de la cirugía está relacionado con adiponectina y que la adiponectina que refleja estrés quirúrgico también es útil para la predicción de infección peri operatoria. Como se ha descrito anteriormente, también es posible usar la adiponectina para determinar un ciclo terapéutico para la prevención de infección postoperatoria, como en el caso de la consideración del cambio de una subclase postoperatoria en una trayectoria clínica (enfoque para control de proceso) a partir de, por ejemplo, la medición de los niveles de adiponectina antes y después de la cirugía.

La adiponectina objeto de la presente invención no está limitada particularmente por su tipo e incluye formas de proteína de longitud completa y formas de proteína globular. Adicionalmente, un animal a partir del cual se obtiene la adiponectina no está particularmente limitado. Con el propósito del tratamiento postoperatorio para un ser humano, se usa adiponectina humana como un marcador.

Un método para medir el marcador se puede llevar a cabo de acuerdo con un método convencional y los ejemplos del mismo incluyen, aunque no están limitados particularmente a, un método para realizar transferencia de western con un anticuerpo específico y un método que usa un kit de ELISA fabricado por Linco. Una muestra puede ser la misma sangre o sangre de la cual se han eliminado los componentes corpusculares sanguíneos o puede también ser un concentrado de la misma.

El control de la invasión mostrado en la presente solicitud tiene por objeto la predicción y el tratamiento temprano de infección postoperatoria.

Para el control de la invasión, las concentraciones de adiponectina en la sangre de un individuo que se tiene que pronosticar se pueden comparar antes y después de la cirugía. En este contexto, al menos el 10% o más, preferentemente el 20% o más, aún más preferentemente el 30% o más de aumento con respecto al valor de concentración de adiponectina en sangre antes de la cirugía deja claro que el individuo que se tiene que pronosticar es susceptible a infección y sepsis, hipercitoquinemia e insuficiencia orgánica múltiple atribuida a estrés.

[Ejemplos]

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no tiene por objeto limitarse a lo mismos de ninguna manera.

Ejemplo 1

Las concentraciones de adiponectina en sangre antes y después de cirugía en 38 casos de cirugía abdominal (19 casos de macho y 19 casos de hembra) se midieron de acuerdo con un método convencional para calcular un valor promedio de las mismas y la desviación típica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1. Esto demuestra que la concentración de adiponectina en sangre está disminuida debido a la cirugía abdominal. Las concentraciones de adiponectina en sangre antes y después de la cirugía fueron  $10 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$  y  $8,1 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente y la concentración de adiponectina después de la cirugía estaba reducida significativamente ( $p < 0,0001$ ) en comparación con antes de la cirugía.

Ejemplo 2

La proporción de la concentración de adiponectina en sangre después de la cirugía a la concentración de adiponectina en sangre antes de la cirugía (concentración de adiponectina después de la cirugía/concentración de adiponectina antes de la cirugía) en 38 casos de cirugía abdominal se calculó y se comparó entre un grupo positivo y un grupo negativo para el nivel de SLP en sangre 10 días después de la cirugía. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. La proporción fue  $0,71 \pm 0,05$  en el grupo positivo para el nivel de SLP y  $0,90 \pm 0,06$  en el grupo negativo y el grupo positivo mostró el valor significativamente bajo ( $p < 0,03$ ). Esto demuestra que la infección peri operatoria se puede pronosticar midiendo las concentraciones de adiponectina en sangre antes e inmediatamente después de la cirugía y que la proporción de la concentración de adiponectina en sangre después de la cirugía a la concentración de adiponectina en sangre antes de la cirugía es útil para la predicción de infección peri operatoria atribuida a cirugía abdominal. En este contexto, el ensayo de SLP (plasma de larvas del gusano de la seda) es un método para medir, en sangre, el valor total de  $\beta$ -glicano (obtenido de hongos) y péptidoglicano (obtenido de cocos Gram-positivos y bacilos Gram-negativos), ambos de los cuales son componentes de la pared celular bacteriana y se ha demostrado previamente que reflejan la translocación bacteriana en la sangre (Documento: Crit. Care. Med., 2002).

Ejemplo 3

Se prepararon soluciones acuosas de lipopolisacárido (lipopolisacárido obtenido de *Escherichia Coli*, 0111:B4, N° de catálogo 4391, fabricado por Sigma) (concentraciones finales: 50 ng/ml, 5 ng/ml, 500 pg/ml y 50 pg/ml) y cada alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de las mismas se mezcló con 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada o 100  $\mu\text{l}$  de una solución de 50  $\mu\text{g/ml}$  de adiponectina (adiponectina recombinante humana Techne, N° de Catálogo 21065X). Después de incubación en un baño de termostato a 37°C durante 1 hora, las concentraciones de lipopolisacárido se midieron mediante ensayo de tiempo turbidimétrico. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3. Esto demuestra que una concentración fisiológica de adiponectina neutraliza una concentración baja de LPS.

Ejemplo 4

Se midieron las concentraciones de adiponectina en sangre antes y después de la cirugía en 30 casos de cirugía abdominal (15 casos con infección postoperatoria y 15 casos sin infección postoperatoria). La proporción de la concentración de adiponectina en sangre después de la cirugía a la concentración de adiponectina en sangre antes de la cirugía fue 0,68 en los casos con infección postoperatoria y 1,00 en los casos sin infección postoperatoria y se demostró que esta proporción era significativamente elevada en los casos con infección postoperatoria. Esto demuestra que la medición de los niveles de adiponectina antes y después de cirugía puede determinar el grado de estrés quirúrgico y puede proporcionar la predicción de infección postoperatoria.

**Aplicabilidad industrial**

De acuerdo con un método descrito en la presente invención, la medición de los niveles de adiponectina antes y después de la cirugía puede determinar el grado de estrés quirúrgico y puede proporcionar la predicción de infección postoperatoria. Esta técnica es útil para una trayectoria clínica que se ha introducido recientemente en muchos hospitales en el sentido de que los pacientes pueden conocer cómo están sus propios programas de tratamiento o en qué etapa está el tratamiento. Por tanto, este método se espera de forma marcada como una técnica que tiene un

gran impacto sobre, por ejemplo, la medicina integral y la economía médica. Por tanto, la presente invención es una invención bastante útil en los campos de medicina, biología y otros.

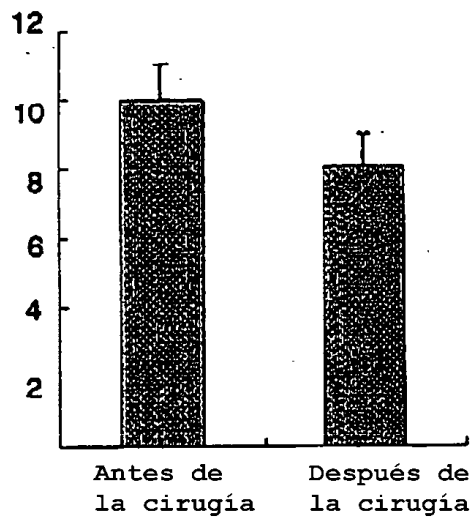
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método *in vitro* para la predicción de infección postoperatoria en seres humanos que comprende medir el nivel de adiponectina en la sangre antes y después de la operación y calcular una proporción del nivel de adiponectina después de la operación al nivel de adiponectina ante de la operación.
- 10 2. El método para la predicción de infección postoperatoria en seres humanos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la operación es un tratamiento de trasplante.
- 10 3. El método de predicción de infección postoperatoria en seres humanos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la infección está implicada en sepsis, hipercitoquinemia o insuficiencia orgánica múltiple.
- 15 4. Un método para medir estrés quirúrgico en un paciente con síndrome metabólico usando el método para la predicción de infección postoperatoria en seres humanos de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15 5. Uso de adiponectina como un marcador en la predicción de infección postoperatoria en seres humanos.
- 20 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la adiponectina se usa como un marcador para sepsis, hipercitoquinemia o insuficiencia orgánica múltiple.
- 20 7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en el que un nivel de adiponectina disminuido en sangre después en comparación con antes de la operación es un marcador de infección.

[Figura 1]

Adiponectina ( $\mu\text{g}$ )

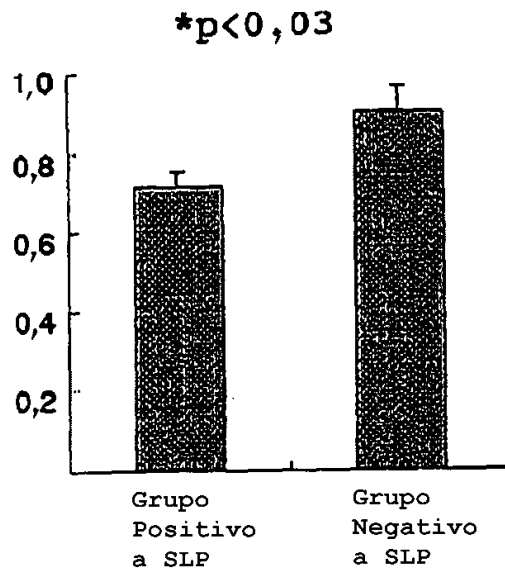
**\*p<0,0001**





[Figura 2]

Adiponectina  
(proporción de inmediatamente  
después de cirugía/antes  
de cirugía)



[Figura 3]

