

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 009**

51 Int. Cl.:
G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08863184 .1**
96 Fecha de presentación: **18.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2223122**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2010**

54 Título: **MORFINA ENDÓGENA O UN METABOLITO DE ORIGEN NATURAL DE LA MISMA COMO MARCADOR PARA SEPTICEMIA.**

30 Prioridad:
18.12.2007 EP 07301692

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.01.2012

73 Titular/es:
**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE)
101, RUE DE TOLBIAC
75654 PARIS CEDEX 13, FR y
JUSTUS-LIEBIG UNIVERSITÄT**

72 Inventor/es:
**GOUMON, Yannick;
AUNIS, Dominique;
METZ-BOUTIGUE, Marie-Hélène;
SCHNEIDER, Francis y
WELTERS, Ingeborg**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 373 009 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

Morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma como marcador para septicemia

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para detectar septicemia en un paciente.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Una infección es la colonización perjudicial de un organismo huésped por una especie extraña. El agente infeccioso, o patógeno, interfiere en el funcionamiento normal del huésped y puede conducir a disfunción del tejido, fluido, órgano u organismo infectado, e incluso a la muerte. La infección puede estar causada por diversos patógenos, incluyendo bacterias, parásitos, hongos, virus, priones y viroides.

15 El diagnóstico de una enfermedad infecciosa puede implicar la identificación del agente infeccioso, directa o indirectamente.

20 La identificación directa de un patógeno puede llevarse a cabo después de un cultivo microbiano. Una muestra tomada de tejido o fluido potencialmente afectado por la enfermedad se somete a un ensayo en busca de la presencia de un agente infeccioso capaz de desarrollarse en un medio de cultivo específico. Por ejemplo, la mayoría de las bacterias patógenas se cultivan fácilmente en placas de agar con nutrientes en las que formarán colonias. El tamaño, el color, la geometría y la forma de una colonia son características de la especie bacteriana, su composición genética específica (su cepa) y el entorno que soporta su crecimiento. Otros ingredientes se añaden a menudo a la placa para facilitar la identificación. Las placas pueden contener sustancias que permiten el crecimiento de algunas bacterias y no de otras, o que cambian de color en respuesta a ciertas bacterias y no a otras. También puede utilizarse un cultivo microbiano en la identificación de virus: siendo el medio, en este caso, células que se desarrollaron en cultivo que el virus puede infectar, y a continuación alterar o matar. En el caso de la identificación viral, una región de células muertas resulta del desarrollo viral, y se denomina una "placa". Los parásitos eucariotas también pueden desarrollarse en cultivo como medio de identificación de un agente particular.

30 La identificación directa de agentes infecciosos también puede depender de ensayos bioquímicos tales como la detección de productos metabólicos o enzimáticos característicos de un agente infeccioso particular. Por ejemplo, en el caso de infección del torrente sanguíneo por bacterias, pueden secretarse toxinas bacterianas al torrente sanguíneo y medirse fácilmente.

35 Los métodos de inmunodiagnóstico son ensayos altamente sensibles, específicos y a menudo extremadamente rápidos utilizados para identificar microorganismos. Estos ensayos se basan en la capacidad de un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno. Al antígeno, habitualmente una proteína o carbohidrato sintetizado por un agente infeccioso, se le une el anticuerpo. Esta unión activa, a continuación, una cadena de sucesos que pueden ser visiblemente obvios de diversas maneras, dependiendo del ensayo.

40 También pueden utilizarse métodos basados en PCR para detectar un patógeno si se conoce el genoma del patógeno. Pueden generarse cebadores específicos que reconocen una región genómica específica del patógeno y amplifican esta región a partir de una muestra obtenida de un paciente.

45 La identificación indirecta de un patógeno puede llevarse a cabo detectando, en una muestra obtenida de un paciente, una molécula que es inducida específicamente por el patógeno. Por ejemplo, muchas enfermedades infecciosas se diagnostican por la presencia de anticuerpos específicos contra el patógeno en el torrente sanguíneo del paciente.

50 Una manera alternativa de detectar una infección que no requiere la identificación del propio patógeno es detectar la respuesta del organismo a la infección. De hecho, la infección del torrente sanguíneo habitualmente da como resultado una respuesta inflamatoria, como es el caso en septicemia. La septicemia es un síndrome inducido por infección caracterizado por un estado inflamatorio generalizado y representa una complicación frecuente en el paciente quirúrgico (Tsiotou y otros, 2005).

55 La evaluación de la septicemia depende de diversos parámetros de laboratorio y parámetros hemodinámicos. Sin embargo, los cambios de la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca y respiratoria y el número de leucocitos (los criterios "SIRS") no son lo bastante específicos para identificar pacientes infectados. Entre muchos parámetros biológicos, la medición de lactato, saturación venosa central de oxígeno (ScvO₂), proteína C reactiva (CRP) y procalcitonina (PCT) son de particular interés, (véase Spapen y otros 2006 para una revisión). El documento de patente de Estados Unidos No. 5.639.617 describe la cuantificación de PCT para evaluar el desarrollo de septicemia. Bensousan y otros (Bensousan y otros, 1996) identifican CRP, PCT e interleuquina 6 (IL6) como biomarcadores en el diagnóstico de septicemia.

El documento de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2004/0180396 da a conocer la utilización de otras pro-hormonas peptídicas como biomarcadores en el diagnóstico de septicemia.

5 Hasta la fecha, el diagnóstico de septicemia depende de un panel de parámetros, cuya determinación es costosa y requiere tiempo. Además, si la septicemia está acompañada por signos clínicos y de laboratorio de inflamación sistémica, los pacientes con inflamación causada por causas no infecciosas también pueden presentar signos y síntomas similares (Reinhart y otros 2006).

10 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de desarrollar un método preciso y específico para diagnosticar septicemia que sea independiente del agente infeccioso.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

15 Para satisfacer esta necesidad, se describe un método para detectar septicemia en un paciente, comprendiendo dicho método detectar morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

20 La presente invención también se refiere a un método para detectar septicemia en un paciente, comprendiendo dicho método medir la concentración de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

La presente invención también se refiere a la utilización de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma como marcador de septicemia en un paciente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones:

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "infección" se refiere al proceso patológico causado por la invasión de tejido o fluido o una cavidad corporal normalmente estéril por microorganismos patógenos o potencialmente patógenos.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "infección del torrente sanguíneo" se refiere a una enfermedad en la que el agente infeccioso está presente en el torrente sanguíneo del paciente.

40 Tal como se utilizan en el presente documento, las expresiones "septicemia", "septicemia grave" y "choque séptico" se utilizan para identificar todo el proceso de la respuesta clínica a la infección. Los pacientes con septicemia presentan pruebas de infección y manifestaciones clínicas de inflamación. Los pacientes con septicemia grave desarrollan hipoperfusión con disfunción orgánica. El choque séptico se manifiesta mediante hipoperfusión e hipotensión persistente.

45 La expresión "morfina endógena" tal como se utiliza en el presente documento tiene su significado general en la técnica (véase, por ejemplo, Stefano y otros, 2000). La morfina endógena y metabolitos de origen natural de la misma se identificaron en numerosos tejidos de mamífero (Goumon y otros, 2005; Goumon y otros, 2006). Los ejemplos de metabolitos de origen natural de morfina son morfina-6-glucurónido (M6G) y morfina-3-glucurónido (M3G).

En una realización preferente de la presente invención, "un metabolito de origen natural de morfina" es M6G.

50 La expresión "anticuerpo anti-morfina" se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce a la morfina o un metabolito de origen natural de la misma.

55 La expresión anticuerpo "anti-CRP" se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce a la proteína C reactiva (CRP).

La expresión anticuerpo "anti-procalcitonina" se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce a la procalcitonina.

60 El término "paciente" tal como se utiliza en el presente documento indica un mamífero tal como un roedor, un felino, un cánido y un primate. Preferentemente, un paciente según la presente invención es un ser humano.

Métodos y kits de diagnóstico:

65 La presente invención se refiere a un método para detectar septicemia en un paciente, comprendiendo dicho método detectar morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

La presente invención se refiere a un método para detectar septicemia en un paciente, comprendiendo dicho método medir la concentración de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

5 Los ejemplos de muestras biológicas adecuadas para el método de la presente invención incluyen, aunque no se limitan a los mismos, sangre completa, suero, plasma, orina, saliva y líquido cefalorraquídeo. Habitualmente, la muestra biológica es sangre completa, suero, plasma u orina. Habitualmente, la muestra biológica es suero.

10 Tal como apreciará el experto en la materia, cuando el método comprende la detección de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en una muestra biológica, la muestra biológica será aquella que está desprovista de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en condiciones normales, es decir, en un paciente que no padece infección.

15 Tal como apreciará el experto en la materia, si el paciente ha recibido un tratamiento que comprende morfina o una molécula que puede metabolizarse a morfina, tal como codeína, esto puede complicar la determinación de la concentración de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma. En una realización preferente de la presente invención, el paciente no ha sido tratado con ninguna morfina exógena ni molécula que pueda ser metabolizada por el paciente a morfina, tal como codeína.

20 Una vez que la muestra biológica del paciente está preparada, la concentración de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma puede medirse mediante cualquier método conocido en la técnica.

25 En una realización particular, dichos métodos comprenden poner en contacto a la muestra biológica con un socio de unión capaz de interactuar de forma selectiva con morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma presente en la muestra biológica. El socio de unión puede ser un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal. En otra realización, el socio de unión puede ser un aptámero.

30 Los anticuerpos policlonales de la presente invención o un fragmento de los mismos pueden generarse según métodos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Diversos adyuvantes conocidos en la técnica pueden utilizarse para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles para poner en práctica la presente invención pueden ser policlonales, los anticuerpos monoclonales son preferentes.

35 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención o un fragmento de los mismos pueden prepararse y aislarse utilizando cualquier técnica que posibilite la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, aunque no se limitan a las mismas, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica del hibridoma de células B humanas (Cote y otros, 1983); y la técnica de hibridoma de EBV (Cole y otros 1985). Por ejemplo, el documento TW 526269 da a conocer anticuerpos monoclonales contra morfina. Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase por ejemplo la patente de Estados Unidos No. 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos anti-morfina, de cadena sencilla. Los anticuerpos útiles para poner en práctica la presente invención también incluyen fragmentos anti-morfina incluyendo, aunque sin limitarse a, fragmentos F(ab')₂, que pueden generarse mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir la rápida identificación de fragmentos que tienen la especificidad para morfina deseada. Por ejemplo, puede utilizarse la presentación en fagos de anticuerpos. En dicho método, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o Fab se expresan en la superficie de un bacteriófago adecuado, por ejemplo M13. En resumen, células esplénicas de un huésped adecuado, por ejemplo de ratón, que ha sido inmunizado con una proteína se extirpan. Las regiones codificantes de las cadenas VL y VH se obtienen de esas células que producen el anticuerpo deseado contra la proteína. Estas regiones codificantes se fusionan a continuación a un extremo de una secuencia del fago. Una vez que el fago se ha insertado en un portador adecuado, por ejemplo bacterias, el fago presenta el fragmento de anticuerpo. La presentación en fagos de anticuerpos también puede proporcionarse mediante métodos combinatorios conocidos por los expertos en la materia. Los fragmentos de anticuerpo presentados por un fago pueden utilizarse a continuación como parte de un inmunoensayo.

60 En otra realización, el socio de unión puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente a cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden aislarse a través de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en el documento Tuerk C. 1997. La biblioteca de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, finalmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, utilidades y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en el documento Jayasena S. D., 1999. Los aptámeros peptídicos comprenden regiones

variables de anticuerpos restringidas conformacionalmente presentadas por una proteína plataforma, tal como Tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan entre bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas y otros, 1996). La solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003/0224435 da a conocer la utilización de aptámeros para la detección y cuantificación de diversos fármacos, incluyendo morfina, en una muestra biológica.

Los socios de unión de la presente invención tales como anticuerpos o aptámeros, pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una enzima capaz de producir un producto coloreado, una molécula radiactiva o cualesquiera otras marcas conocidas en la técnica. En la técnica se conocen marcas que generalmente proporcionan (directa o indirectamente) una señal.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "marcado", con respecto al anticuerpo, pretende abarcar el marcado directo del anticuerpo o aptámero acoplado (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o Indocianina (Cy5), al anticuerpo o aptámero, así como el marcado indirecto de la sonda o anticuerpo (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, HRP) mediante reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero de la presente invención puede marcarse con una molécula radiactiva mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo las moléculas radiactivas incluyen, aunque no se limitan a las mismas, un átomo radiactivo para estudios escintigráficos tal como I123, I124, In111, Re186, Re188.

Los ensayos mencionados anteriormente generalmente implican la unión del socio de unión (es decir, anticuerpo o aptámero) en un soporte sólido. Los soportes sólidos que pueden utilizarse en la puesta en práctica de la presente invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microvaloración); cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o pocillos de microvaloración); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microvaloración); fluoruro de polivinilidina; papel diazotizado; membranas de nylon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles y similares.

Más particularmente, puede utilizarse un método ELISA, en el que los pocillos de una placa de microvaloración están recubiertos con una serie de anticuerpos anti-morfina. Una muestra biológica que contiene o de la que se sospecha que contiene morfina o un metabolito de origen natural de la misma se añade a continuación a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la placa o placas pueden lavarse para eliminar restos no unidos y puede añadirse una molécula de unión secundaria marcada de forma que pueda detectarse. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de la muestra capturada, la placa se lava y la presencia de la molécula de unión secundaria se detecta utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Un método alternativo a ELISA implica la adición de una muestra biológica que contiene o de la que se sospecha que contiene morfina o un metabolito de origen natural de la misma a los pocillos recubiertos además de una cantidad conocida de morfina o metabolito de la misma marcado. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno y la competencia entre moléculas de origen natural marcadas y no marcadas, la placa o placas pueden lavarse para eliminar los restos no unidos. La intensidad de la marca obtenida mediante la unión de, por ejemplo morfina o metabolito de la misma conjugado a HRP, se detecta utilizando métodos bien conocidos en la técnica. En esta configuración, que es más sensible que el ELISA común, la disminución de la marca está en relación con la cantidad de moléculas naturales presentes en la muestra. En el caso de morfina conjugada a HRP, la adición de un sustrato de HRP permitirá la detección. La detección de color se utiliza habitualmente pero necesita un tiempo de incubación, mientras que sustancias alternativas obtenidas de luminol permiten una detección directa (sin tiempo de incubación) y altamente sensible.

La concentración de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma puede medirse utilizando técnicas de inmunodiagnóstico convencionales, incluyendo inmunoensayos, tales como ensayos de tipo competitivo, de reacción directa o "sándwich". Dichos ensayos incluyen, aunque no se limitan a los mismos, ensayos de aglutinación; inmunoensayos marcados con enzimas y mediados por las mismas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación. Un radioinmunoensayo para detectar morfina o un metabolito de origen natural de la misma ha sido comercializado con el nombre "COAT-A-COUNT Morphine" por DPC Diagnostic. Kits de ELISA para detectar morfina o un metabolito de origen natural de la misma están disponibles en el mercado de Immalysis Corporation (Pomona, 91767. California, Estados Unidos) con la referencia 213-0192.

La medición de la concentración de morfina o un metabolito de origen natural de la misma (con o sin métodos basados en inmunoensayos) también pueden incluir separación de los compuestos: HPLC basada en la hidrofobia; cromatografía de exclusión por tamaño basada en el tamaño; y afinidad por fase sólida basada en la afinidad del compuesto por la fase sólida particular que se está utilizando. Una vez separada, la morfina o un metabolito de origen natural de la misma puede identificarse en base al "perfil de separación" conocido, por ejemplo, tiempo de retención, para ese compuesto y medirse utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos No. 4.473.640 da a conocer un método para detectar morfina que comprende hidrólisis con una beta-glucuronidasa seguida por cromatografía. Goumon y otros (2005) describen la detección de morfina o un metabolito de origen natural de la misma mediante HPLC de fase inversa.

Los compuestos separados pueden detectarse y medirse mediante, por ejemplo, un espectrómetro de masas.

Otros métodos pueden incluir la detección enzimática de morfina o un metabolito de origen natural de la misma. Por ejemplo, el documento US 5.298.414 da a conocer un método basado en la oxidación enzimática de morfina a morfinona mediante morfina deshidrogenasa, en el que la reacción enzimática está acoplada a un sensor.

En una realización, el método de la presente invención puede comprender además una etapa de comparación de la concentración de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma con un valor umbral predeterminado. Dicha comparación es indicativa de infección. La morfina endógena aumenta durante el desarrollo de infección.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a un método para detectar septicemia en un paciente, comprendiendo dicho método las etapas de:

(i) medir la concentración de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en una muestra biológica obtenida de dicho paciente,

(ii) comparar la concentración de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma medida en la etapa (i) con un valor de referencia obtenido de la concentración de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en una muestra biológica de un sujeto que no padece infección,

en el que un nivel elevado de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en la muestra biológica obtenida de dicho paciente en comparación con dicho valor de referencia indica que el paciente padece septicemia.

Por ejemplo, si la muestra biológica es suero, puede considerarse que el nivel de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en una muestra de suero es elevado cuando es superior a 0,5 ng/ml, preferentemente superior a 1 ng/ml, aún más preferentemente superior a 1,5 ng/ml.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a la utilización de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma como marcador de septicemia en un paciente.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a la utilización de un kit que detecta morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma para diagnosticar septicemia en un paciente.

Otro objetivo más de la presente invención se refiere a un kit para detectar septicemia en un paciente, que comprende un socio de unión que interactúa de forma selectiva con morfina o un metabolito de origen natural de la misma, tal como un anticuerpo anti-morfina como se ha descrito anteriormente y, como mínimo, un anticuerpo seleccionado entre el grupo que comprende un anticuerpo anti-CRP y un anticuerpo anti-PCT. El anticuerpo puede estar marcado como se ha descrito anteriormente. El kit también puede contener otros reactivos y materiales necesarios para el protocolo de detección particular envasados adecuadamente, incluyendo matrices de fase sólida, su fueran aplicables, y patrones.

El método o el kit de la presente invención también pueden utilizarse en combinación con otros métodos utilizados habitualmente para el diagnóstico de septicemia en un paciente.

Habitualmente, el método de la presente invención comprende además la etapa de detectar CRP y/o procalcitonina en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

Habitualmente, el método de la presente invención comprende además la etapa de determinar la sedimentación de eritrocitos.

Habitualmente, el método de la presente invención comprende además la etapa de determinar el número de leucocitos.

El kit contiene un anticuerpo anti-CRP y/o un anticuerpo anti-procalcitonina. Habitualmente, el kit puede permitir la detección de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma y la detección de CRP o procalcitonina en una única muestra biológica. En una realización, dicha muestra se divide en dos muestras para la detección en ensayos paralelos de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma por un lado y la detección de CRP o procalcitonina por el otro. En una realización, la muestra se utilizará para la medición múltiple de ambos marcadores en un único ensayo. En dicha realización, el kit contiene un socio de unión que interactúa de forma selectiva con morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma y un anticuerpo anti-CRP o anti-procalcitonina que están marcados de una manera que permita su detección simultánea.

Los presentes inventores han demostrado que la morfina endógena es un marcador para septicemia, en contraste con los marcadores utilizados habitualmente que son elevados en el caso de inflamación. Los niveles de morfina

endógena aumentan después de cualquier infección, independientemente del agente infeccioso. La morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma, representa una herramienta adecuada para detectar septicemia en un paciente.

5 La presente invención se ilustrará adicionalmente en vista de las figuras y el ejemplo siguientes.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

10 La figura 1 representa la concentración de morfina endógena media \pm EEM (Error Estándar de la Media) medida en el suero de pacientes infectados y no infectados durante 3 días de monitorización. *: $p < 0,05$ en comparación con pacientes no infectados.

15 La figura 2 representa la concentración de morfina endógena media \pm EEM medida en el suero de pacientes con septicemia (S), septicemia grave/choque séptico (SS/SSH) en comparación con pacientes sanos (sin SIRS sin infección, NSNI) durante 3 días de monitorización. *: $p < 0,05$ en comparación con pacientes sanos.

20 La figura 3 representa las concentraciones de morfina endógena individual y media, medidas en el suero de pacientes con S, SS y SSH en comparación con donantes sanos (NSNI) y pacientes con SIRS. *: $p < 0,05$ en comparación con los grupos de NSNI y SIRS.

EJEMPLO

Material y métodos:

25 ***ELISA específico de morfina***

El kit de ELISA específico de morfina de Immunalysis Corporation se utilizó para la cuantificación de morfina endógena presente en extractos de secreción y tejido, así como para la determinación de los niveles de morfina endógena en plasma en pacientes con septicemia. La especificidad del ensayo para morfina endógena se confirmó ensayando una cantidad diferente de M6G, M3G y codeína (0-50 ng/ml, no se muestran los datos). Para todos los ensayos, patrones de morfina se diluyeron en el tampón apropiado. 40 μ l de sangre, medios de cultivo o suero se ensayaron por duplicado.

35 ***Preparación y población del estudio***

Este protocolo de estudio fue aprobado por nuestra junta de revisión institucional para experimentación humana; se obtuvo el consentimiento informado por escrito, antes de la inclusión, de cada participante o el representante autorizado. 100 pacientes consecutivos ingresados entre julio y septiembre de 2006 en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hospital Hautepierre (Estrasburgo, Francia) fueron considerados posibles candidatos para la inclusión. Los criterios de exclusión comprenden insuficiencia renal crónica, hepática o cardíaca anterior (Taupenot, 2003), tratamiento con esteroides en curso (Rozansky, 1994) inhibidores de la bomba de protones y un historial médico con tumores neuroendocrinos (Berruti, 2005). Los pacientes con recientes (en 1 mes) múltiples factores de estrés, tales como intervenciones quirúrgicas repetidas, fueron excluidos. Los pacientes que recibieron morfina exógena antes de la admisión o durante su estancia en la UCI también fueron excluidos.

45 ***Recogida de datos***

Los participantes (n=43) se dividieron en cinco grupo según criterios de ACCP/SCCM: pacientes sin septicemia, sin estrés (NSNI, pacientes comatosos después de auto-envenenamiento, que requieren por lo tanto ventilación mecánica transitoria; n=5), pacientes con SIRS (Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica) (paro cardíaco fuera del hospital sin ningún criterio de exclusión ni infección; n=9), pacientes infectados con criterios de septicemia (S; n=8), septicemia grave (SS; n=6) o choque séptico (SSH; n=15). Para el diagnóstico de infección, se prestó una especial atención a fiebre o hipotermia, cultivos positivos relevantes de laboratorio y examen clínico según la definición de infección específica (Levy, 2003). En pacientes con septicemia (S, SS y SSH), las fuentes de infección eran los tractos respiratorio, urinario o digestivo. Bacterias Gram negativas estaban implicadas en el 55% de los casos y bacterias Gram positivas en el 45%. Los pacientes críticamente enfermos (SIRS, SSH) eran más viejos ($p < 0,05$) que los controles sanos HC. Entre grupos de pacientes, no existían diferencias con respecto al tiempo medio inicial de primera disfunción orgánica desde la admisión o estancia media en la UCI. Los pacientes con SIRS y SSH se sometieron significativamente más a menudo a ventilación mecánica en comparación con otros pacientes críticamente enfermos ($p < 0,01$). Los pacientes con SSH tenían concentraciones significativamente mayores de biomarcadores de infección que los controles sanos ($p < 0,01$).

Análisis estadístico de los resultados de pacientes

65 Los datos se expresan como la media \pm EEM. Se utilizó SPSS para el análisis estadístico de datos no paramétricos, incluyendo tests de Mann-Whitney, análisis de Anova de una vía, test de correlación de Spearman, test exacto de

Fisher, análisis de medición repetida y comparaciones de curvas de Característica Operativa del Receptor (ROC) (se consideró que $p < 0,05$ era significativo).

Resultados:

La cantidad circulante de morfina endógena se midió en el suero de una cohorte de pacientes de cinco grupos: pacientes sin septicemia y sin estresar (NSNI, pacientes comatosos después de auto-envenenamiento, que requieren por lo tanto ventilación mecánica transitoria), pacientes de SIRS (paro cardíaco fuera del hospital sin infección), pacientes infectados con criterios de septicemia (S), septicemia grave o choque séptico (SS y SSH respectivamente). Se utilizó ELISA específica de morfina para medir la concentración de morfina endógena presente en cada suero. Los datos se analizaron en primer lugar para determinar si existe una diferencia entre el suero de pacientes infectados y no infectados. Este análisis muestra que la concentración de morfina endógena descubierta en el suero de pacientes infectados era significativamente mayor que la concentración descubierta en pacientes no infectados (figura 1). Esta concentración era significativamente mayor durante los tres días de monitorización.

En una segunda etapa, se analizaron los datos para determinar si existe una diferencia entre donantes sanos (sin SIRS y sin infección; NSNI), y pacientes con septicemia (S) y septicemia grave/choque séptico (SS/SSH; figura 2). Este análisis reveló que las concentraciones endógenas eran significativamente mayores en pacientes con septicemia y septicemia grave/choque séptico que en donantes sanos, durante los tres días de monitorización. No se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos de septicemia y septicemia grave/choque séptico.

Para finalizar, todos los grupos se compararon conjuntamente (día 1) mostrando que las concentraciones endógenas aumentan de forma significativa solamente en pacientes con S, SS y SSH en comparación con donantes sanos (NSNI) y SIRS (figura 3).

Juntos, estos datos indican que la morfina endógena representa un marcador de septicemia.

REFERENCIAS

Berruti A, Mosca A, Tucci M, Terrone C, Torta M, Tarabuzzi R, Russo L, Cracco C, Bollito E, Scarpa RM, Angeli A, Dogliotti L. Independent prognostic role of circulating chromogranin A in prostate cancer patients with hormone-refractory disease [Papel en el pronóstico independiente de la cromogranina A circulante en pacientes con cáncer de próstata con enfermedad que no responde a hormonas]. *Endocr Relat Cancer*. Marzo de 2005; 12(1): 109-17.

Bensoussan TA, Vincent F, Assicot M, Morin JF, Leclercq B, Escudier B, Nitenberg G. Evolution des cytokines, de la procalcitonine (ProCT) et des peptides opioïde au cours d'un modèle clinique de syndrome inflammatoire (SIRS) [Evolución de las citoquinas, de la procalcitonina (ProCT) y de los péptidos opioides durante un modelo clínico de síndrome inflamatorio (SIRS)]. *Reanimation Urgences*. 1996 5(6): 749

Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R. (1996) Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2 [Selección genética de aptámeros peptídicos que reconocen e inhiben quinasa 2 dependiente de ciclina]. *Nature*, 380, 548-50.

Cote RJ, Morrissey DM, Houghton AN, Beattie EJ Jr, Oettgen HF, Old LJ. Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens [Generación de anticuerpos monoclonales humanos reactivos con antígenos celulares]. *Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos*. Abril de 1983; 80(7): 2026-30.

Goumon Y, Strub JM, Stefano GB, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Characterization of a morphine-like molecule in secretory granules of chromaffin cells. [Caracterización de una molécula similar a morfina en gránulos secretores de células cromafines] *Med Sci Monit*. 2005 11 (5): MS31-34.

Goumon Y, Muller A, Glattard E, Marban C, Gasnier C, Strub JM, Chasserot-Golaz S, Rohr O, Stefano GB, Welters I, Van Dorsselaer A, Schoentgen F, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. [Identificación de morfina-6-glucurónido en gránulos secretores de células cromafines] *JBC* 2006 281 (12): 8082-89.

Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. [Cultivos continuos de células fusionadas que secretan un anticuerpo de especificidad predefinida] *Nature*. 7 de agosto de 1975; 256(5517): 495-7.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; International Sepsis Definitions Conference. [Conferencia Internacional sobre la definición de Septicemia] 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. [Conferencia Internacional sobre la definición de Septicemia de SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS] *Intensive Care Med*. Abril de 2003; 29(4): 530-8. Publicación electrónica 28 de marzo de 2003. Revisión.

- 5 Martin GS, Mannino DM, Eaton S, y otros The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. [La epidemiología de la septicemia en los Estados Unidos de 1979 a 2000] *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-54.
- Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? [Marcadores para el diagnóstico de septicemia: ¿cuál es útil?] *Crit Care Clin* 2006 Jul 22(3): 503-19.
- 10 Rozansky DJ, Wu H, Tang K, Parmer RJ, O'Connor DT. Glucocorticoid activation of chromogranin A gene expression. Identification and characterization of a novel glucocorticoid response element. [Activación por glucocorticoides de la expresión del gen de cromogranina A. Identificación y caracterización de un nuevo elemento de respuesta a glucocorticoides] *J Clin Invest*. Diciembre de 1994; 94(6): 2357-68.
- 15 Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, y otros, Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. [Modulación inmunitaria del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) durante infección vírica] *Viral Immunol* 2005; 18: 41-78.
- Singer M, De Santis V, Vitale D y otros, Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. [El fallo multiorgánico es una respuesta metabólica adaptativa, mediada de forma endocrina, a una inflamación sistémica abrumadora] *Lancet* 2004; 364: 545-48.
- 20 Spapen HD, Hachimi-Idrissi S, Corne L, Huyghens LP. Diagnostic markers of sepsis in the emergency department. [Marcadores de diagnóstico de septicemia en el servicio de urgencias] *Acta Clin Belg* 2006, 61 (3) 138-42.
- 25 Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, Doris P, Sonetti D, Guarna M, Welters ID, Bianchi E. Endogenous morphine. [Morfina endógena] *TINS* 2000, 23(9): 436-442.
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secretogranin family. [La familia de cromogranina-secretogranina] *N Engl J Med*. 20 de marzo de 2003; 348(12): 1134-49.
- 30 Tsiotou AD, Sakorafas, GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. [Choque séptico; conceptos patogénicos actuales desde una perspectiva clínica] *Med Sci Monit* 2005; 11 (3): RA76-85.
- 35 Tuerk C, Using the SELEX combinatorial chemistry process to find high affinity nucleic acid ligands to target molecules. [Utilización del proceso de química combinatoria SELEX para descubrir ligandos de ácido nucleico de alta afinidad por moléculas diana] *Methods Mol Biol*. 1997; 67: 219-30.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para detectar septicemia en un paciente, comprendiendo dicho método detectar morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en una muestra biológica obtenida de dicho paciente
2. Método para detectar septicemia en un paciente, comprendiendo dicho método medir la concentración de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.
- 10 3. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho metabolito de origen natural de la misma es morfina-6-glucurónido (M6G).
4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre, una muestra de suero, un plasma o una muestra de orina.
- 15 5. Utilización de morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma como marcador in vitro de septicemia en un paciente.
6. Utilización de un kit que detecta morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma para el diagnóstico in vitro de septicemia en un paciente.
- 20 7. Kit que comprende un socio de unión que interactúa de forma selectiva con morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma y, como mínimo, un anticuerpo seleccionado entre el grupo que comprende un anticuerpo anti-proteína C reactiva (CRP) y un anticuerpo anti-procalcitonina.
- 25 8. Kit, según la reivindicación 7, en el que dicho socio de unión que interactúa de forma selectiva con morfina endógena o un metabolito de origen natural de la misma es un anticuerpo anti-morfina.

FIGURA 1

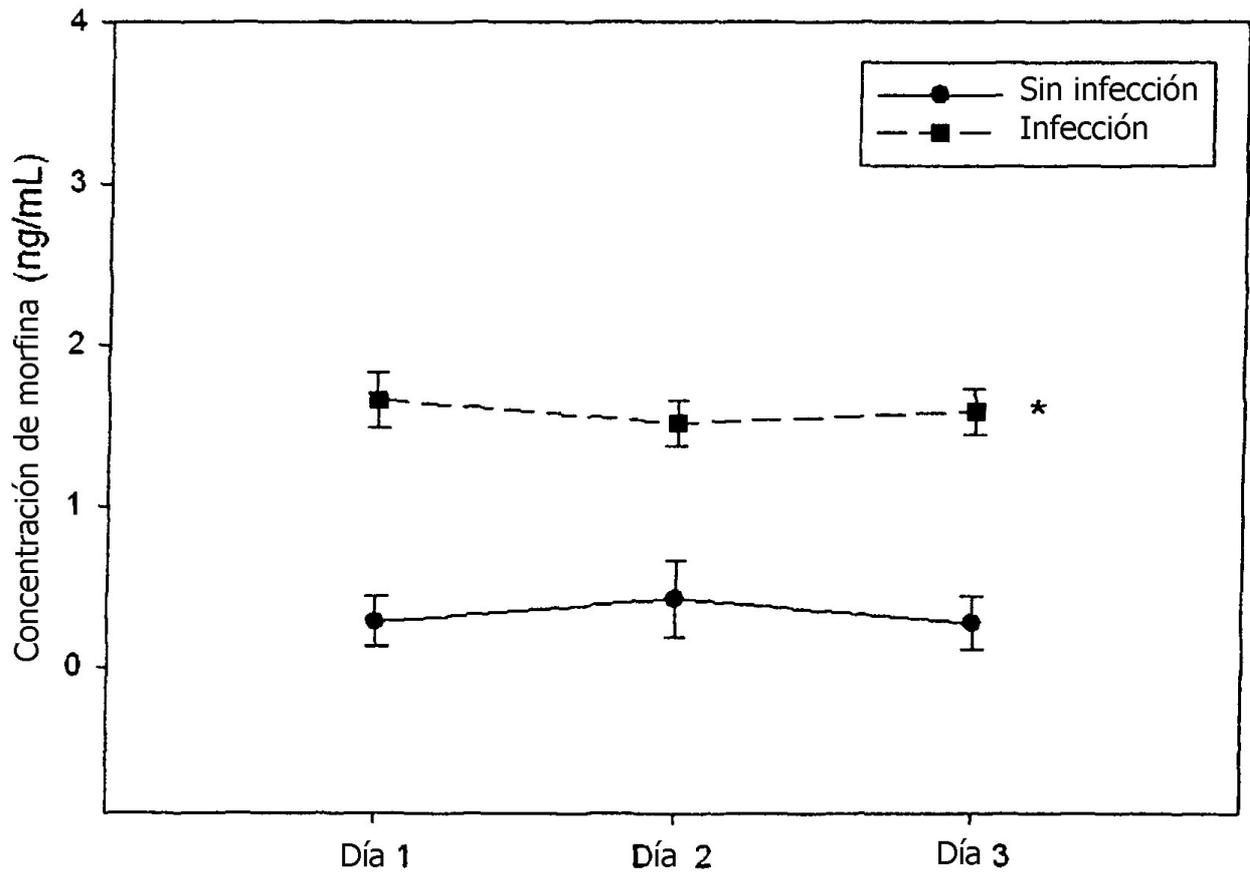


FIGURA 2

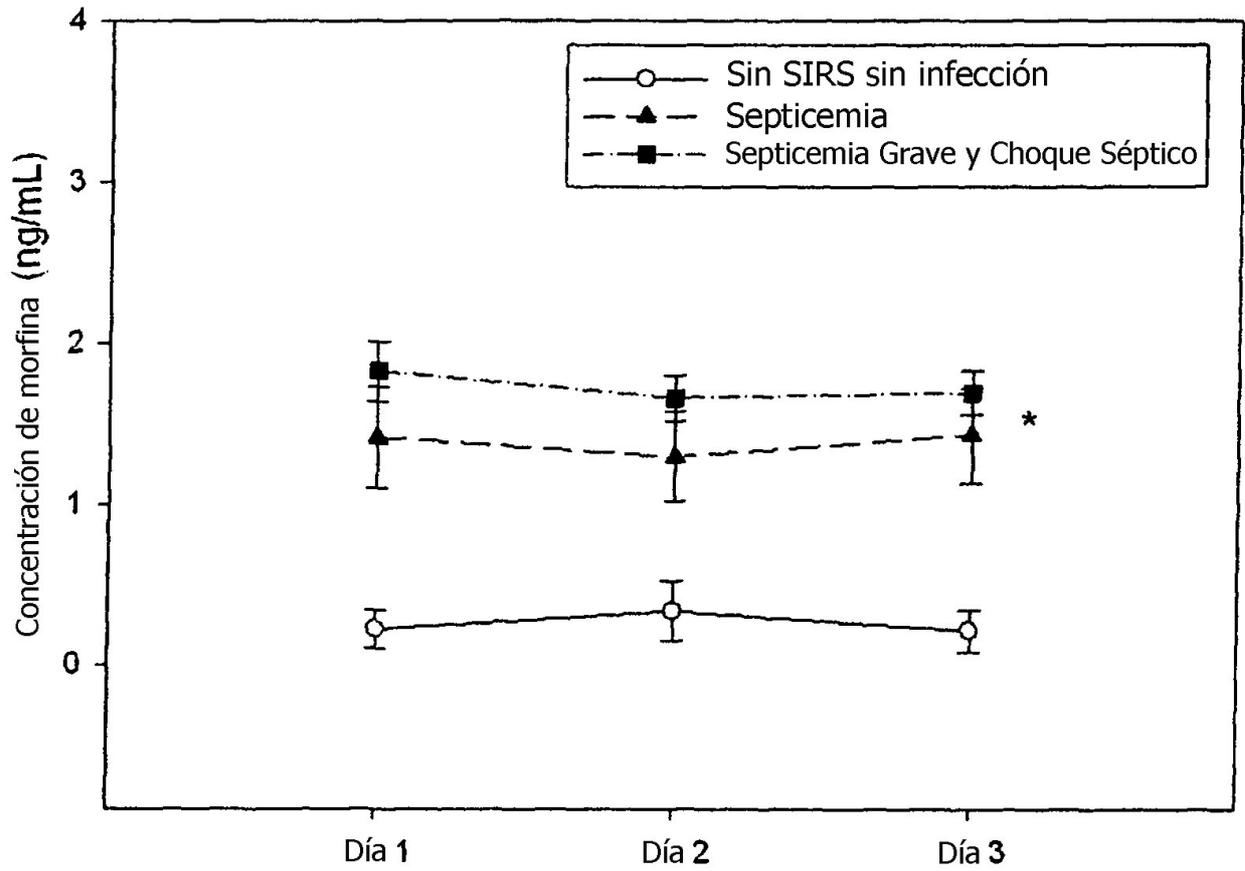


FIGURA 3

