

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 875**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08759218 .4**
96 Fecha de presentación: **12.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2129391**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.2009**

54 Título: **Método de diagnóstico**

30 Prioridad:
12.06.2007 GB 0711327

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2012

73 Titular/es:
HANSA MEDICAL AB
P.O. BOX 785
220 07 LUND, SE

72 Inventor/es:
BJORCK, Lars;
CHRISTENSSON, Bertil;
HERWALD, Heiko;
LINDER, Adam y
AKESSON, Per

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 380 875 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

Método de diagnóstico.

Campo de la invención

5 La invención se refiere al diagnóstico de la susceptibilidad a y a la prevención del desarrollo de una septicemia grave.

Antecedentes de la invención

10 La septicemia es una respuesta inflamatoria sistémica a una infección, que causa insuficiencia orgánica y muerte en casos graves. Es una causa cada vez más común de morbilidad y mortalidad, particularmente en personas mayores, individuos inmunocomprometidos y críticamente enfermos. Se ha descrito que la septicemia es la causa más común de muerte en la unidad de cuidados intensivos no coronarios (Bone RC et al; Chest. 1992 Jun; 101 (6): 1644-55). Se produce en el 1-2% de todas las hospitalizaciones, y las tasas de mortalidad varían del 20% para septicemia al 40% para septicemia grave, hasta >60% para el choque séptico (una subcategoría de la septicemia grave) (Leibovici; Ann Intern Med 1991; 114(8): 703, Martin et al; N Engl J Med. 17 abr 2003; 348(16): 1546-54).

La definición clínica de septicemia es la presencia de dos o más de las condiciones siguientes:

- 15 (1) fiebre (temperatura >38°C) o hipotermia (temperatura <36°C);
 (2) frecuencia cardíaca >90 latidos por minuto;
 (3) frecuencia respiratoria >20 respiraciones por minuto o PaCO₂ <32 mm Hg; y
 (4) recuento de glóbulos blancos >12 (x 10⁹ células/l) o <4 (x 10⁹ células/l),

al mismo tiempo que una enfermedad confirmada o sospechada.

20 Las condiciones (1) a (4) se conocen como los criterios del SIRS (Síndrome de Respuesta Inflamatoria Grave) (Bone RC et al; Chest. 1992 Jun; 101 (6): 1644-55) y son una norma internacional reconocida para el diagnóstico de una inflamación grave. Un individuo que presente dos o más de los criterios del SIRS sin una infección confirmada o sospechada se clasifica como que tiene un SIRS no asociado a infección.

25 La definición clínica de septicemia grave es septicemia, como se ha definido anteriormente, asociada con una hipotensión inducida por septicemia, disfunción orgánica o anomalías de la perfusión. La hipotensión inducida por septicemia se define como una presión arterial sistólica de <90 mm Hg o una reducción de <40 mm Hg desde la medida basal en ausencia de otras causas de hipotensión. Las anomalías de la perfusión pueden incluir, pero sin limitación, hipoperfusión, acidosis láctica, oliguria o una alteración aguda en el estado mental. La septicemia grave incluye como subcategoría el estado de choque séptico. Este estado está definido específicamente por la presencia
 30 de hipotensión inducida por septicemia a pesar de una reanimación con fluidos adecuada, junto con la presencia de anomalías de la perfusión. Los individuos que están recibiendo agentes inotrópicos o vasopresores pueden no estar hipotensos en el momento en que se miden las anomalías de la perfusión.

35 Para el tratamiento de la septicemia grave, el diagnóstico antes del inicio de los síntomas más graves (hipotensión, disfunción orgánica o hipoperfusión) con la instauración de un tratamiento adecuado es de suma importancia para un desenlace exitoso (Rivers E et al. N Engl J Med 2001; 345(19): 1368-77). Por ejemplo, Kumar et al demostraron que la mortalidad estaba correlacionada con el número de horas pasadas desde el inicio de la hipotensión inducida por septicemia antes de que se administrara el primer tratamiento (Kumar et al. Crit Care Med 2006; 34(6): 1589-96). Es necesario un marcador biológico o clínico fiable para determinar tan pronto como sea posible si un individuo está en riesgo de desarrollar una septicemia grave para minimizar el retraso antes de la instauración del tratamiento.

40 Sumario de la invención

La proteína de unión a heparina (HBP, CAP37, Azurocidina) es un homólogo de serina proteasa inactivo de 37 kDa glicosilado, de cadena sencilla y cargado negativamente que presenta una identidad de secuencia del 44% con la elastasa de neutrófilos humana. La estructura tridimensional de la HBP se ha publicado (Iversen et al Nat Struct Biol. 1997 Abr; 4(4): 265-8). Está contenida en los gránulos azurófilos de los neutrófilos humanos (Lindmark et al, J Leukoc Biol 1999; 66(4): 634-43). Es una proteína multifuncional que se ha demostrado que induce filtraciones vasculares por alteración del equilibrio de Ca²⁺ del citoesqueleto de los vasos sanguíneos (Gautam et al, Nature Medicine 2001; 7(10): 1123-7). La proteína M de los estreptococos de grupo A (GAS) en complejo con el fibrinógeno se ha demostrado que induce la liberación de HBP por estimulación del receptor de integrina B2 de los neutrófilos (Herwald et al, Cell 2004; 116(3): 367-79). El LPS también puede inducir la liberación de HBP mediante un mecanismo desconocido (Rasmussen et al, FEBS Lett 1996; 390 (1): 109 12). La secuencia de HBP está disponible públicamente (por ejemplo, como nº de acceso del NCBI NP_001691 REGIÓN: 27..248) y se reproduce a continuación como SEC ID N°: 1

SEC ID Nº: 1

IVGGRKARPRQFPFLASIQNQGRHFCCGALIHARFVMTAASCFSQNPQVSTVVLGAYDLRRRE
 RQSRQTFSSMSSENGYDPQQNLNDLMLLQLDREANLTSSVTILPLPLQONATVEAGTRCQVAGW
 GSQRSGGRLSRFPRFVNVTVTPEDQCRPNNVCTGVLTRRGICNGDGGTPLVCEGLAHGVASF
 LGPCGRGPDDFFTRVALFRDWIDGVLNNPGP

5 Los niveles de HBP en individuos que presentan uno o más de los criterios del SIRS no se han investigado previamente. Los inventores han demostrado por primera vez que los niveles de HBP están aumentados en individuos que posteriormente desarrollan una septicemia grave. Los niveles de HBP están elevados hasta 12 horas antes de que se registre la hipotensión inducida por septicemia, pero disminuyen rápidamente si se instaura una terapia. Los inventores también han demostrado por primera vez que la proporción de HBP/recuento de glóbulos blancos (WBC) está elevada en individuos que posteriormente desarrollan una septicemia grave.

10 De acuerdo con la invención, se proporciona por lo tanto un método de identificación de si un individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave, comprendiendo dicho método medir la HBP en una muestra de fluido tomada del individuo, y de este modo determinar si el individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave.

15 El método de la invención puede comprender además medir el WBC o el recuento de neutrófilos (NC) en un individuo, calcular la proporción de HBP/WBC o la proporción de HBP/NC, respectivamente, y de este modo determinar si el individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave.

El método de la invención puede comprender por lo tanto medir la HBP en un individuo y calcular el nivel de HBP/WBC o la proporción de HBP/NC en un individuo, y de este modo determinar si el individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave.

La invención proporcionar además:

- 20 - uso *in vitro* de un anticuerpo específico de HBP o fragmento del mismo capaz de unirse a HBP para determinar si un individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave;
- un kit de ensayo que comprende un anticuerpo específico de HBP o fragmento del mismo capaz de unirse a HBP y medios para la medición del WBC en un individuo.

25 También se describe un método de reducción del riesgo de que un individuo desarrolle una septicemia grave, que comprende:

(i) determinar si un individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave usando un método de la invención; y

(ii) administrar a un individuo identificado en (i) como en riesgo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente adecuado para el tratamiento de una infección y/o de fluidos intravenosos.

30 Descripción de las Figuras

35 La **Figura 1** muestra la concentración de HBP (Figura 1a), las proporciones de HBP/WBC (Figura 1b), los niveles de CRP (Figura 1c), los niveles de IL-6 (Figura 1d) y los niveles de lactato (Figura 1e) en el grupo de septicemia grave (n = 51), el grupo de septicemia (n = 95), el grupo de infección sin SIRS (n = 44) y el grupo de SIRS sin infección (n = 12). Línea dentro del recuadro: mediana; bordes del recuadro: cuartiles (Q1, Q3); patillas: intervalo de valores; x y o: valores atípicos identificados por número de paciente. Las líneas que representan los valores de corte para el nivel de HBP de 20 ng/ml y la proporción de HBP/WBC de 2 para las Figuras 1a y 1b, respectivamente.

40 La **Figura 2** muestra una curva de ROC para el nivel de HBP y/o la proporción de HBP/WBC, el nivel de HBP, la proporción de HBP/WBC, el lactato, el recuento de glóbulos blancos, CRP e IL-6. La línea recta de 0,0 a 1,1 es una línea de referencia. Los segmentos diagonales están producidos por vínculos.

45 La **Figura 3** muestra la proporción de HBP/WBC (Figura 3a) o la concentración de HBP (Figura 3b) para cada individuo (n = 51) en el grupo de septicemia grave, representada frente al tiempo desde la recogida de la primera muestra de plasma respecto al tiempo de la menor presión arterial medida (indicada mediante la flecha a las 0 h). Los círculos en blanco en la Figura 3a representan pacientes que están por debajo del nivel de corte de la proporción de HBP/WBC pero que tienen una puntuación por encima del nivel de corte de la concentración de HBP. Los círculos en blanco en la Figura 3b representan pacientes que están por debajo del nivel de corte de la concentración de HBP pero que tiene una puntuación por encima del nivel de corte de la proporción de HBP/WBC.

La **Figura 4** muestra el cambio en la proporción de HBP/WBC en muestras de plasma consecutivas tomadas de 16 pacientes con septicemia grave a lo largo de 96 horas (Figura 4a) y 7 pacientes con septicemia, con infección sin SIRS o sin infección a lo largo de 72 horas (Figura 4b). Cada línea representa un paciente individual.

5 Descripción detallada de la invención

Diagnóstico

La presente invención se refiere a un método de identificación de si un sujeto está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave. Por lo tanto, la invención se refiere al diagnóstico de la susceptibilidad de un individuo a una septicemia grave. El individuo bajo ensayo es típicamente sospechoso de estar en riesgo de desarrollar una septicemia grave. El individuo es típicamente un mamífero. El mamífero es típicamente un ser humano o un mamífero doméstico tal como un caballo, una vaca, una oveja, un perro o un gato. El individuo es preferentemente un ser humano.

El individuo puede ser sospechoso de estar en riesgo de desarrollar una septicemia grave porque tenga una infección confirmada o sospechada y/o presente uno o más, o dos o más, de los criterios del SIRS. Los criterios del SIRS son:

- (1) fiebre (temperatura $>38^{\circ}\text{C}$) o hipotermia (temperatura $<36^{\circ}\text{C}$);
- (2) frecuencia cardíaca >90 latidos por minuto;
- (3) frecuencia respiratoria >20 respiraciones por minuto o $\text{PaCO}_2 <32$ mm Hg; y
- (4) recuento de glóbulos blancos > 12 ($\times 10^9$ células/l) o <4 ($\times 10^9$ células/l).

La infección confirmada o sospechada es típicamente una o más de una infección bacteriana, parasitaria o fúngica. Una infección bacteriana puede estar causada por una o más bacterias Gram negativas o Gram positivas. La una o más bacterias Gram negativas pueden seleccionarse de *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* (típicamente *K.pneumoniae* o *K. oxytoca*), *Enterobacter spp.* (típicamente *E. cloacae* o *E. aerogenes*), *Bordetella spp.* (típicamente *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* o *B. parapertussis*), *Chlamydia spp.* (típicamente *C. trachomatis*), *Legionella spp.* (típicamente *L. pneumophila*), *Pseudomonas spp.* (típicamente *P. aeruginosa*), *Mycoplasma spp.* (típicamente *M pneumoniae*), *Haemophilus influenza*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Neisseria meningitidis* (típicamente de serogrupo A, B, C, H, I, K, L, X, Y, Z, 29E o W135). La una o más bacterias Gram positivas pueden seleccionarse de *Staphylococcus spp.* (típicamente *S. aureus* o *Staphylococci* coagulasa negativos), *Streptococcus spp.* (típicamente *S. pneumoniae* o *S. pyogenes*) y *Enterococcus spp.* (típicamente *E. faecium* o *E. faecalis*). Una infección fúngica puede estar causada por uno o más hongos seleccionados de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* y *Aspergillus fumigatus*.

La infección confirmada o sospechada puede afectar a cualquier parte del cuerpo. Los ejemplos típicos incluyen una infección que afecta a los pulmones; el tracto respiratorio; el hígado; los riñones; el tracto urinario; la piel (cutánea y subcutánea); el corazón; el estómago; los intestinos; la sangre; los huesos; las articulaciones o cualquier combinación de los mismos. La infección confirmada o sospechada puede ser meningitis.

La infección puede confirmarse mediante prácticas de diagnóstico conocidas en la técnica, por ejemplo, cultivo microbiano de muestras tomadas del individuo, ensayo de antígenos de muestras de orina u otros fluidos tomadas del individuo (especialmente para infecciones por *S. pneumoniae* y *Legionella sp.*) o análisis por PCR (especialmente para neumonías atípicas causadas por infección bacteriana, por ejemplo, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Chlamydia* y *B. pertussis*). Más recientemente se han desarrollado técnicas de PCR múltiple que permiten un ensayo simultáneo para múltiples infecciones bacterianas y fúngicas.

La infección puede sospecharse debido a la presencia de uno o más de los síntomas generales siguientes: fiebre superior a 38°C ; escalofríos; dolor; un algia o dolor de la palpación; sensación general de cansancio; sudores nocturnos; y una herida o incisión con enrojecimiento, calor, hinchazón o dolor asociado, o que exude un fluido que sea blanco, amarillento o verdusco.

La presente invención puede usarse para confirmar la susceptibilidad en un individuo con uno o más factores de riesgo adicionales y/o una o más predisposiciones hacia el desarrollo de septicemia grave. Los factores de riesgo que aumentan la susceptibilidad a desarrollar una septicemia grave incluyen típicamente cualquier factor que aumente la susceptibilidad a una infección. Estos factores pueden incluir un sistema inmune debilitado (es decir, el individuo está inmunocomprometido) o la presencia en un paciente hospitalizado de una vía intravenosa, herida quirúrgica, drenaje quirúrgico o un sitio de interrupción de la piel conocido como úlceras de decúbito o escaras de decúbito. Un individuo diabético es más propenso a desarrollar una septicemia grave. El método de diagnóstico de la invención puede llevarse a cabo junto con otro ensayo o prueba genética para refinar la predicción de riesgo.

Típicamente, el individuo no tiene una enfermedad asociada inflamatoria crónica y/o no presenta síntomas que estén específicamente asociados con dichas enfermedades. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, asma, artritis reumatoide, artrosis y enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de intestino irritable y enfermedad inflamatoria del intestino. Si el individuo tiene una enfermedad asociada inflamatoria crónica, tiene además una infección confirmada o sospechada como se ha definido anteriormente y/o presenta uno o más, o dos o más, de los criterios del SIRS.

Típicamente, el individuo no tiene una septicemia grave o no presenta síntomas que conducirían a un diagnóstico de septicemia grave. Típicamente, dichos síntomas incluyen hipotensión inducida por septicemia, disfunción orgánica o anomalías de la perfusión. La hipotensión inducida por septicemia se define como una presión arterial sistólica de <90 mm Hg o una reducción de <40 mm Hg desde la medida basal en ausencia de otras causas de hipotensión. Las anomalías de la perfusión pueden incluir, pero sin limitación, hipoperfusión, acidosis láctica, oliguria o una alteración aguda en el estado mental. La septicemia grave incluye como subcategoría el estado de choque séptico. Este estado está específicamente definido por la presencia de hipotensión inducida por septicemia a pesar de una reanimación con fluidos adecuada junto con la presencia de anomalías de la perfusión. Los individuos que estén recibiendo agentes inotrópicos o vasopresores pueden no estar hipotensos en el momento en que se miden las anomalías de la perfusión.

La presente invención implica medir el nivel de HBP en un individuo. Típicamente, el nivel de HBP se mide determinando la concentración de HBP en una muestra de fluido tomada del individuo. De acuerdo con la presente invención, un nivel aumentado de HBP en comparación con el nivel o concentración basal indica que el individuo es susceptible a o está en riesgo de desarrollar una septicemia grave. El nivel basal es típicamente el nivel de HBP en un individuo que es sospechoso de estar en riesgo de desarrollar una septicemia grave pero que posteriormente no desarrolla una septicemia grave. Por ejemplo, los inventores han demostrado que, cuando el nivel de HBP se mide por determinación de la concentración de HBP en una muestra de plasma tomada de un individuo, los individuos que desarrollan una septicemia no grave tienen una mediana de concentración de HBP de aproximadamente 8,5 ng/ml, los individuos que tienen una infección confirmada o sospechada pero presentan uno o menos criterios del SIRS tienen una mediana de concentración de HBP de aproximadamente 6,5 ng/ml, y los individuos que presentan dos o más criterios del SIRS en ausencia de infección tienen una mediana de concentración de HBP de aproximadamente 9 ng/ml. La mediana de la concentración de HBP para todas las categorías de individuos que son sospechosos de estar en riesgo de desarrollar una septicemia grave pero que posteriormente no desarrollan una septicemia grave es de aproximadamente 8 ng/ml.

En la presente invención, en una muestra de fluido tomada de un individuo, una concentración aumentada de HBP asociada con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es típicamente superior a aproximadamente 15 ng/ml, o superior a aproximadamente 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 ng/ml. La concentración aumentada de HBP asociada con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es preferentemente superior a aproximadamente 20 ng/ml.

De acuerdo con la presente invención, el aumento en el nivel o concentración de HBP asociado con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es de al menos 2 veces, 2,5 veces o 3 veces respecto al nivel o concentración basal. El aumento en el nivel o concentración de HBP asociado con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es preferentemente de al menos 2,5 veces respecto al nivel o concentración basal.

La presente invención también puede implicar por lo tanto la evaluación de la proporción de HBP/recuento de glóbulos blancos (WBC) para determinar el riesgo de desarrollar una septicemia grave.

De acuerdo con la presente invención, una proporción de HBP/WBC aumentada en comparación con la proporción basal indica que el individuo es susceptible a o está en riesgo de desarrollar una septicemia grave. La proporción basal es típicamente la proporción de HBP/WBC en un individuo que es sospechoso de estar en riesgo de desarrollar una septicemia grave pero que posteriormente no desarrolla una septicemia grave. Cuando la concentración de HBP en una muestra de fluido se mide en ng/ml y el WBC en una muestra de sangre se mide en número de células $\times 10^9/l$, los inventores han demostrado que, por ejemplo, los individuos que desarrollan una septicemia no grave tienen una mediana de proporción de HBP/WBC de aproximadamente 0,7:1, los individuos que tienen una infección confirmada o sospechada pero presentan uno o menos criterios del SIRS tienen una mediana de proporción de HBP/WBC de aproximadamente 0,85:1, y los individuos que presentan dos o más criterios del SIRS en ausencia de infección tienen una mediana de proporción HBP/WBC de aproximadamente 0,9:1. La mediana de la proporción de HBP/WBC para todas las categorías de individuos que son sospechosos de estar en riesgo de desarrollar una septicemia grave pero que posteriormente no desarrollan una septicemia grave es de aproximadamente 0,75:1.

En la presente invención, cuando la concentración de HBP en una muestra de fluido se mide en ng/ml y el recuento de WBC en una muestra de sangre se mide en número de células $\times 10^9/l$, una proporción de HBP/WBC aumentada asociada con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es típicamente superior a aproximadamente 1,4:1, o superior a aproximadamente 1,5:1, 1,6: 1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1 ó

2,4:1. La proporción de HBP/WBC aumentada asociada con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es preferentemente superior a aproximadamente 2,0:1.

De acuerdo con la presente invención, el aumento en la proporción de HBP/WBC asociado con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es de al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces o 3 veces respecto a la proporción basal. El aumento en la proporción de HBP/WBC asociado con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es preferentemente de al menos 2,5 veces respecto a la proporción basal.

Los presentes inventores han determinado que el recuento de neutrófilos (NC) medio en individuos sospechosos de estar en riesgo de desarrollar una septicemia grave es de aproximadamente el 80% del recuento de glóbulos blancos (WBC). La presente invención también puede evaluar la proporción de HBP/NC para determinar el riesgo de desarrollar una septicemia grave.

De acuerdo con la presente invención, una proporción de HBP/NC aumentada en comparación con la proporción basal indica que un individuo es susceptible a o está en riesgo de desarrollar una septicemia grave. La proporción basal es típicamente la proporción de HBP/NC en un individuo que no tiene una infección y/o que no presenta ninguno de los criterios del SIRS. Cuando la concentración de HBP en una muestra de fluido se mide en ng/ml y el recuento de NC en una muestra de sangre se mide en número de células $\times 10^9/l$, los inventores han demostrado que, por ejemplo, los individuos que desarrollan una septicemia no grave tienen una mediana de proporción de HBP/NC de aproximadamente 0,55:1, los individuos que tienen una infección confirmada o sospechada pero presentan uno o menos criterios del SIRS tienen una mediana de proporción de HBP/NC de aproximadamente 0,65:1, y los individuos que presentan dos o más criterios del SIRS en ausencia de infección tienen una mediana de proporción de HBP/NC de aproximadamente 0,7:1. La mediana de la proporción de HBP/NC para todas las categorías de individuos que son sospechosos de estar en riesgo de desarrollar una septicemia grave pero que posteriormente no desarrollan una septicemia grave es de aproximadamente 0,6:1.

En la presente invención, cuando la concentración de HBP en una muestra de fluido se mide en ng/ml y el recuento de NC en una muestra de sangre se mide en número de células $\times 10^9/l$, una proporción de HBP/NC aumentada asociada con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es típicamente superior a aproximadamente 1,1:1, o superior a aproximadamente 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1 ó 1,9:1. La proporción de HBP/NC aumentada asociada con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es preferentemente superior a aproximadamente 1,6:1.

De acuerdo con la presente invención, el aumento en la proporción de HBP/NC asociado con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es de al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces o 3 veces respecto a la proporción basal. El aumento en la proporción de HBP/NC asociado con una susceptibilidad aumentada a o riesgo de desarrollar una septicemia grave es preferentemente de al menos 2,5 veces respecto a la proporción basal.

La invención se lleva a cabo típicamente *in vitro* en una muestra obtenida del individuo. La muestra comprende típicamente un fluido corporal del individuo. La muestra es preferentemente una muestra de sangre, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo o líquido articular. La muestra es más preferentemente una muestra de sangre. La muestra se procesa típicamente antes de ensayarse, por ejemplo, por centrifugación. La muestra también puede almacenarse típicamente antes del ensayo, preferentemente por debajo de -70°C .

Pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para ensayar el nivel de HBP. Estos métodos implican típicamente usar un agente para la detección de HBP. Típicamente, el agente se une específicamente a HBP. El agente puede ser un anticuerpo específico para HBP. Por específico se entenderá que el agente o anticuerpo se une a HBP sin una reactividad cruzada significativa con cualquier otra molécula, particularmente cualquier otra proteína. Por ejemplo, un agente o anticuerpo específico para HBP no mostrará una reactividad cruzada significativa con elastasa de neutrófilos humana. La reactividad cruzada puede evaluarse por cualquier método adecuado.

Un anticuerpo usado en el método de la invención puede ser un anticuerpo completo o un fragmento del mismo que sea capaz de unirse a HBP. El anticuerpo puede ser monoclonal. Dicho anticuerpo completo es típicamente un anticuerpo que se produce por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales pueden obtenerse por inmunización de un mamífero, típicamente un conejo o un ratón, con HBP en condiciones adecuadas, y aislamiento de moléculas de anticuerpo a partir de, por ejemplo, el suero de dicho mamífero. Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse por métodos de hibridoma o recombinantes.

Los métodos de hibridoma implican inmunizar a un mamífero, típicamente un conejo o un ratón, con HBP en condiciones adecuadas, después recoger los esplenocitos de dicho mamífero y fusionarlos con células de mieloma. La mezcla de células fusionadas se diluye después y los clones se cultivan a partir de células parentales individuales. Los anticuerpos secretados por los diferentes clones se ensayan después para determinar su capacidad para unirse a HBP, y el clon más productivo y estable se cultiva después en medio de cultivo en un gran volumen. El anticuerpo secretado se recoge y se purifica.

Los métodos recombinantes implican la clonación en fago o levadura de diferentes segmentos génicos de inmunoglobulina para crear bibliotecas de anticuerpos con secuencias de aminoácidos ligeramente diferentes. Esas secuencias que dan origen a anticuerpos que se unen a HBP pueden seleccionarse, y las secuencias clonarse, por ejemplo, en una línea celular bacteriana, para su producción.

- 5 Típicamente, el anticuerpo es un anticuerpo de mamífero, tal como un anticuerpo de primate, humano, roedor, (por ejemplo, ratón o rata), conejo, ovino, porcino, equino o camélido. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de camélido o un anticuerpo de tiburón. El anticuerpo puede ser un nanocuerpo. El anticuerpo puede ser cualquier clase o isotipo de anticuerpo, por ejemplo IgM, pero preferentemente es IgG.

- 10 El fragmento de anticuerpo completo que puede usarse en el método comprende un sitio de unión a antígeno, por ejemplo, fragmentos Fab o F(ab)₂. El anticuerpo completo o fragmento puede estar asociado con otros restos, tales como enlazadores que pueden usarse para unir entre sí 2 o más fragmentos o anticuerpos. Dichos enlazadores pueden ser enlazadores químicos o pueden estar presentes en forma de una proteína de fusión con el fragmento o anticuerpo completo. Por lo tanto, los enlazadores pueden usarse para unir entre sí anticuerpos completos o fragmentos que tengan la misma o diferentes especificidades de unión, por ejemplo, que puedan unirse al mismo o a diferentes polimorfismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico que sea capaz de unirse a dos antígenos diferentes, típicamente dos cualesquiera de los polimorfismos mencionados en la presente memoria. El anticuerpo puede ser un "diacuerpo" formado por unión de dos dominios variables contiguos. En el caso en el que los anticuerpos usados en el método estén presentes en cualquiera de las formas anteriores que tienen diferentes sitios de unión a antígeno de diferentes especificidades, entonces estas diferentes especificidades son típicamente hacia polimorfismos en diferentes posiciones o en diferentes proteínas. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende secuencias de diferentes anticuerpos naturales, por ejemplo, un anticuerpo humanizado.
- 15
- 20

- 25 Los métodos para evaluar el nivel de HBP implican típicamente poner en contacto una muestra con un agente o anticuerpo capaz de unirse específicamente a HBP. Dichos métodos pueden incluir ensayos de varilla y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Típicamente, las varillas comprenden uno o más anticuerpos o proteínas que se unen específicamente a HBP. Si está presente más de un anticuerpo, los anticuerpos tienen preferentemente diferentes determinantes no solapantes, de modo que pueden unirse a HBP simultáneamente.

- 30 El ELISA es un ensayo en fase sólida heterogéneo que requiere la separación de reactivos. El ELISA se lleva a cabo típicamente usando la técnica de tipo sándwich o la técnica competitiva. La técnica de tipo sándwich requiere dos anticuerpos. El primero se une específicamente a HBP y está unido a un soporte sólido. El segundo anticuerpo está unido a un marcador, típicamente un conjugado enzimático. Se usa un sustrato para la enzima para cuantificar el complejo de HBP-anticuerpo y, por lo tanto, la cantidad de HBP en una muestra. El ensayo de inhibición competitiva de antígeno también requiere típicamente un anticuerpo específico de HBP unido a un soporte. Se añade un conjugado de HBP-enzima a la muestra (que contiene HBP) a ensayar. La inhibición competitiva entre el conjugado de HBP-enzima y la HBP sin marcar permite la cuantificación de la cantidad de HBP en una muestra. Los soportes sólidos para reacciones de ELISA contienen preferentemente pocillos.
- 35

- 40 La presente invención también puede emplear métodos de medición de HBP que no comprenden anticuerpos. La separación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la detección por fluorescencia se usan preferentemente como método de determinación del nivel de HBP. Pueden usarse aparatos y métodos de HPLC como se han descrito anteriormente (Tsikas D et al. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 705: 174-6). La separación durante la HPLC se lleva a cabo típicamente basándose en el tamaño o la carga. Antes de la HPLC, típicamente se añaden aminoácidos endógenos y una L-homoarginina de patrón interno a las muestras de ensayo y estos se extraen por fases en cartuchos de CBA (Varian, Harbor City, CA). Los aminoácidos dentro de las muestras están preferentemente derivatizados con o-ftalaldehído (OPA). La exactitud y precisión del ensayo se determina preferentemente dentro de muestras de control de calidad para todos los aminoácidos.
- 45

Pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para medir el recuento de glóbulos blancos o el recuento de neutrófilos en un individuo. Dichos métodos incluían el recuento automático o manual.

- 50 La invención proporcionar además un kit de diagnóstico que comprende medios para medir el nivel de HBP en un individuo y, de este modo, determinar si el individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave. El kit contiene típicamente uno o más anticuerpos que se unen específicamente a HBP. Por ejemplo, el kit puede comprender un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de CDR injertada o un anticuerpo humanizado. El anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina intacta o un fragmento de la misma, tal como un fragmento Fab, F(ab')₂ o Fv. Si está presente más de un anticuerpo, los anticuerpos tienen preferentemente diferentes determinantes no solapantes, de modo que pueden unirse a HBP simultáneamente.
- 55

El kit puede comprender además medios para la medición del recuento de WBC en un individuo.

El kit puede comprender además uno o más reactivos o instrumentos diferentes que permitan que se lleve a cabo cualquiera de las realizaciones del método mencionado anteriormente. Dichos reactivos o instrumentos incluyen uno

o más de los siguientes: un tampón o tampones adecuados (soluciones acuosas), medios para aislar la HBP a partir de una muestra, medios para obtener una muestra del individuo (tal como un recipiente o un instrumento que comprende una aguja) o un soporte que comprende pocillos en los que pueden realizarse reacciones cuantitativas. Opcionalmente, el kit puede comprender instrucciones para permitir que el kit se use en el método de la invención, o detalles respecto a en qué individuos puede llevarse a cabo el método.

Terapia

También se describe el tratamiento de un individuo identificado por un método de la invención como en riesgo de desarrollar una septicemia grave. Por lo tanto, una sustancia para su uso en la reducción del riesgo de desarrollar una septicemia grave puede usarse en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un individuo identificado mediante un método de la invención como en riesgo de desarrollar una septicemia grave. El estado de un individuo identificado por un método de la invención como en riesgo de desarrollar una septicemia grave puede mejorarse por lo tanto por administración de dicha sustancia. Por lo tanto, puede prevenirse una septicemia grave. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia útil para reducir el riesgo de desarrollar una septicemia grave puede administrarse a un individuo identificado por un método de la invención como en necesidad de la misma. Las sustancias adecuadas para reducir el riesgo de desarrollar una septicemia grave incluyen típicamente uno o más antibióticos y uno o más fluidos intravenosos. El uno o más antibióticos son típicamente anticuerpos de amplio espectro. Los anticuerpos de amplio espectro se seleccionan típicamente de uno o más aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos, penicilinas, sulfonamidas o tetraciclinas. Por ejemplo, los antibióticos adecuados incluyen, pero sin limitación, Gentamicina, Kanamicina, Neomicina, Estreptomina, Tobramicina, Cefazolina, Cefalexina, Cefapirina, Cefradina, Cefuroxima, Cefixima, Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftizoxima, Ceftriaxona, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Ofloxacino, Clindamicina, Azitromicina, Claritromicina, Eritromicina, Amoxicilina, Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Cloxacilina, Dicloxacilina, Mezlocilina, Nafcilina, Oxacilina, Penicilina G Benzatina, Penicilina G Potasio, Penicilina G Procaína, Penicilina V Potasio, Piperacilina, Ticarcilina, Ticarcilina-Clavulanato potásico, Pirimetamina-Sulfadoxina, Sulfadizina, Sulfisoxazol, Sulfmetoxazol, Trimetoprim-sulfametoxazol, Clortetraciclina, Doxiciclina y Tetraciclina.

Una sustancia útil para reducir el riesgo de desarrollar una septicemia grave de acuerdo con la invención se formula típicamente para su administración en la presente invención con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. El vehículo o diluyente farmacéutico puede ser, por ejemplo, una solución isotónica. Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, junto con la sustancia activa, diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o de calcio y/o polietilenglicoles; agentes de unión; por ejemplo, almidones, goma arábiga, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, por ejemplo, almidón, ácido alginico, alginatos o almidón glicolato sódico; mezclas efervescentes; colorantes; edulcorantes; agentes humectantes tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Dichas preparaciones farmacéuticas pueden fabricarse de una forma conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla, granulación, fabricación de comprimidos, recubrimiento con azúcares o recubrimiento con películas.

Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones o suspensiones. Los jarabes pueden contener como vehículos, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

Las suspensiones y emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico. Las suspensiones o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con la sustancia activa, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo, propilenglicol y, si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

Las soluciones para administración o infusión intravenosa pueden contener como vehículo, por ejemplo, agua estéril o preferentemente pueden estar en forma de soluciones salinas isotónicas acuosas estériles.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia usada en la prevención de una septicemia grave se administra a un paciente identificado de acuerdo con un método de la invención. La dosis, por ejemplo, de un antibiótico, puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con la sustancia usada; la edad, peso y estado del paciente a tratar; la vía de administración; y el régimen necesario. De nuevo, un médico será capaz de determinar la vía de administración necesaria y la dosificación para cualquier paciente particular. Una dosis diaria típica es de aproximadamente 0,1 a 50 mg por kg de peso corporal, de acuerdo con la actividad del antibiótico específico, la edad, el peso y las condiciones del sujeto a tratar, y la frecuencia y vía de administración. Preferentemente, los niveles de dosificación diaria son de 5 mg a 2 g. Esa dosis puede proporcionarse como una sola dosis o puede proporcionarse como múltiples dosis, por ejemplo, tomadas a intervalos regulares, por ejemplo, 2, 3 ó 4 dosis administradas diariamente.

El Ejemplo siguiente ilustra la invención:

Ejemplo

1. Métodos

Participantes en el estudio

202 pacientes adultos con una infección sospechada clínicamente se inscribieron en un estudio prospectivo en el Infectious Disease Clinic, Lund University Hospital, Suecia, entre marzo de 2006 y abril de 2007. Los criterios de inclusión eran fiebre > 38°C y tratamiento con antibióticos durante menos de 24 horas. La duración del tratamiento con antibióticos, los datos demográficos, los criterios del SIRS y la presión arterial sistólica (SBP) se registraron en el momento de la admisión. Se analizó la proteína C reactiva (CRP), el lactato y el recuento de WBC y se obtuvieron muestras de plasma para el análisis posterior de los niveles de HBP e IL-6 en las 12 horas siguientes a la admisión. En 20 pacientes se obtuvieron muestras de plasma en serie durante hasta 96 horas en paralelo con el registro de los criterios del SIRS y de la SBP. Después del alta, se registró el diagnóstico final y la mortalidad a los 28 d, y los pacientes se clasificaron de acuerdo con los criterios del SIRS (Bone et al, Chest 1992; 101(6): 1644-55).

La septicemia grave (grupo 1) se definió como la presencia de septicemia y SBP <90 mm Hg o una caída >40 mm Hg de la SBP desde la medida basal en las 24 h siguientes a la recogida de las muestras de sangre, la septicemia (grupo 2) se definió como la presentación de dos o más criterios del SIRS junto con una infección, la no septicemia (grupo 3) se definió como la presentación de un criterio del SIRS junto con una infección, y la no infección (grupo 4) se definió como la presentación de dos o más criterios del SIRS junto con un diagnóstico final no infeccioso.

Los diagnósticos de infección finales fueron de neumonía (n = 61), infección del tracto respiratorio superior (n = 35), infección del tracto urinario (n = 38), infección cutánea y subcutánea (n = 29), endocarditis (n = 4), gastroenteritis (n = 12) u otras infecciones incluyendo infecciones tropicales (n = 11). En 35 pacientes (17%) se diagnosticó una bacteriemia (17 bacterias Gram negativas y 18 Gram positivas). Los diagnósticos no infecciosos con presentación de dos o más criterios del SIRS fueron de embolia pulmonar y vasculitis sistémica). Las muestras de sangre se recogieron en tubos de plasma con citrato de plástico de 4 ml, se centrifugaron inmediatamente a 3000 rpm durante 10 min, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

Análisis de HBP, IL-6, CRP, lactato, WBC y proporción de HBP/WBC

La concentración de HBP (ng/ml) se determinó mediante un ELISA de tipo sándwich como se describe en (Tapper et al; Blood 2002; 99(5): 1785-93). Las muestras de plasma se diluyeron 1/40 en PBS y se procesaron por duplicado. Se produjo HBP humana recombinante y se purificó como se describe en (Rasmussen et al; FEBS Lett 1996; 390(1): 109-12). Se prepararon anticuerpos monoclonales de ratón (2F23A) y antisuero de conejo (409A) contra HBP recombinante y se purificaron como se describen en (Lindmark et al; J. Leukoc. Biol 1999; 66(4): 634-43), y se usaron a 1/3000 y 1/7000 respectivamente. Se usó IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de BioRad Laboratories (Richmond, CA), a 1/3000. Se calculó una proporción de HBP/WBC por división de la concentración de HBP (ng/ml) con el WBC ($\times 10^9$ células/l).

La IL-6 se midió con un kit de IL-6 humana comercial (Quantikine, R&D Systems, Reino Unido), límite de detección de 3 pg/ml. Las muestras de plasma se diluyeron 1/40. Se realizaron análisis de CRP y lactato en un Roche Hitachi Modular-P con reactivos de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) de acuerdo con la descripción del fabricante, con la excepción de que las muestras para el análisis de lactato se tomaron de tubos de plasma con citrato en lugar de tubos de oxalato-fluoruro.

El recuento de glóbulos blancos (WBC) se midió en un Sysmex XE2100 de acuerdo con la descripción del fabricante (Sysmex).

40 Análisis estadístico

Los datos se presentan como medianas, intervalos intercuartiles. Se llevó a cabo un ensayo de significación usando el ensayo de suma de rangos de Mann-Whitney. Un valor p bilateral <0,05 se consideraba estadísticamente significativo. Las curvas de característica operativa del receptor (ROC) (DeLong et al; Biometrics 1988; 44(3): 837-45) y el área bajo la curva (AUC) se determinaron para HBP, proporción de HBP/WBC, CRP, WBC e IL-6. Los valores de AUC se describen con el intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Las sensibilidades, especificidades, valores predictivos positivos y valores predictivos negativos se calcularon a partir de tablas cruzadas. El cociente de verosimilitud positivo y el cociente de verosimilitud negativo también se describen en la Tabla 1.

2. Resultados

Características de los participantes en el estudio

Se incluyeron 202 pacientes que cumplían los criterios de inclusión. Los pacientes se clasificaron en los 4 grupos siguientes: 51 pacientes con septicemia grave (grupo 1), 95 pacientes con septicemia (grupo 2), 44 pacientes sin septicemia (grupo 3) y 12 pacientes sin infección (grupo 4). La mediana de la edad y la proporción de hombres/mujeres de los 4 grupos eran de 62 a; 31/20, 57 a; 42/53, 44 a; 15/29, y 73 a; 11/1, respectivamente. Se encontró bacteriemia en 22, 11 y 2 pacientes en los grupos 1, 2 y 3, respectivamente.

Análisis de los niveles de HBP y de las proporciones de HBP/WBC en los participantes en el estudio

En el momento de la admisión, los niveles de HBP eran significativamente superiores en el grupo con septicemia grave ($p < 0,0001$) (Fig. 1 a), superando 42/51 pacientes un nivel de corte de 20 ng/ml, en comparación con 1/95, 0/44 y 0/12 pacientes en el grupo 2, el grupo 3 y el grupo 4, respectivamente. Además, los pacientes en el grupo con septicemia grave mostraban proporciones de HBP/WBC significativamente superiores ($p < 0,0001$) en comparación con los otros grupos (Fig. 1b). Se encontró una proporción de HBP/WBC por encima de 2,0 en 44/51 pacientes en el grupo con septicemia grave, 2/95 pacientes en el grupo con septicemia, 0/44 pacientes en el grupo sin septicemia y 0/12 pacientes en el grupo sin infección. Además, en el grupo con septicemia grave, 47/51 pacientes tenían un nivel de HBP en plasma >20 ng/ml o una proporción de HBP/WBC $>2,0$, en comparación con 2/95 pacientes en el grupo con septicemia y 0 pacientes en los otros 2 grupos (Tabla 1).

De forma similar, los niveles de CRP, IL-6 y lactato también eran significativamente superiores ($p = 0,003$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$) en el grupo con septicemia grave aunque había un solapamiento considerable entre grupos (Fig. 1 c-e).

Análisis del valor predictivo del nivel de HBP y de la proporción de HBP/WBC

Asumiendo una prevalencia del 25% de septicemia grave, como en el presente estudio, las variables siguientes mostraban una especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (PPV), valor predictivo negativo (NPV), cociente de verosimilitud positivo (PLR) y cociente de verosimilitud negativo (NLR) mejores en el diagnóstico de la septicemia grave en comparación con todos los niveles de corte de CRP e IL-6 diferentes calculados:

- un nivel de HBP >20 ng/ml indica que el individuo desarrollará una septicemia grave; o
- una proporción de HBP/WBC $>2,0$ indica que el individuo desarrollará una septicemia grave; o
- un nivel de HBP >20 ng/ml o una proporción de HBP/WBC $>2,0$ indica que el individuo desarrollará una septicemia grave.

Estos descubrimientos se resumen en las Tablas 1a, 1b y 1c, y se confirman mediante la curva de ROC (figura 2). El análisis estadístico de la curva de ROC se muestra en la tabla 2.

El nivel de HBP y la proporción de HBP/WBC predicen una septicemia grave antes del inicio de los síntomas clínicos

En 20 de los 51 pacientes en el grupo con septicemia grave el valor de HBP estaba elevado hasta 12 h antes de que se alcanzase la menor SBP (figuras 3a y 3b). Los niveles de HBP disminuían rápidamente en las 24 h siguientes en los 11 pacientes que se trataron con antibióticos y fluidos intravenosos adecuados y que se recuperaron sin complicaciones. En 5 casos en los que los pacientes continuaron siendo circulatoriamente inestables, los niveles de HBP permanecieron sin embargo elevados, 1 de estos pacientes murió dentro del intervalo de 28 días desde la fecha de inclusión (Fig. 4a).

En los 5 pacientes muertos, todos fueron en el grupo con septicemia grave y todos en los 1-4 días siguientes a la última recogida de muestra de HBP elevada. Los niveles de HBP permanecieron bajos, por debajo de 20 ng/ml, en 6 pacientes con septicemia y 1 paciente sin septicemia, en los que se realizó un seguimiento con una toma de muestras en serie (Fig. 4b).

20 pacientes en el grupo con septicemia grave tenían niveles de HBP o proporciones de HBP/WBC aumentados en el momento de la admisión pero una SBP normal, indicando que estos indicadores son capaces de predecir una septicemia grave antes de que sea posible un diagnóstico clínico convencional. Esto se ejemplifica mediante una mujer de 70 años de edad que se presenta con un historial de 3 días de fiebre, diarrea y vómitos. El examen físico era corriente excepto por fiebre de 38°C , frecuencia de pulso de 100 pero SBP normal de 130 mm/Hg, y se la hospitalizó con un diagnóstico provisional de gastroenteritis. Se le administraron 1000 ml de fluido cristaloides i.v. 6 horas después desarrolló una hipotensión grave con SBP de 70 mm/Hg, dificultad respiratoria y se la transfirió inmediatamente a la UCI, donde posteriormente se le diagnosticó SDRA (Síndrome de Dificultad Respiratoria del Adulto) con coagulación intravascular diseminada debido a una septicemia por *E. coli*. En el momento de la admisión su nivel de HBP era de 80 ng/ml y la proporción de HBP/WBC era de 4,2.

Tabla 1a: Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, cociente de verosimilitud positiva y cociente de verosimilitud negativa de variables ensayadas en el diagnóstico de una septicemia bacteriana grave

Variable	Punto de corte	Sensibilidad%	Especificidad %	PPV %	NPV%	PLR	NLR
HBP(ng/ml)	>20	82,4	99,3	97,7	94,3	118	0,18
Proporción de HBP/WBC	>2	86,3	98,7	95,6	95,5	66,4	0,14
Proporción de HBP/WBC o nivel de HBP(ng/ml)	>2 o >20	92,2	98,7	95,9	97,4	71	0,08
CRP (mg/l)	>50	88,2	36,4	31,9	90,2	1,39	0,32
	>100	82,3	53,6	37,5	90,0	1,77	0,33
	>150	64,7	71,3	42,9	85,6	2,25	0,49
	>200	37,2	80,8	39,6	79,2	1,94	0,77
IL6 (pg/ml)	>100	78,4	72,8	49,4	91,0	2,88	0,30
	>200	62,7	77,5	48,5	86,0	2,78	0,48
	>500	47,0	84,0	50,0	82,5	2,94	0,63
	>1000	43,0	90,0	59,5	82,4	4,30	0,23
Lactato (mmol/l)	>2,5	27,5	98,0	82,4	79,6	13,7	0,74
	>2,0	41,2	91,8	63,6	81,8	5,0	0,64
	>1,5	52,9	77,6	45,0	82,6	2,4	0,61
	>1	88,2	46,3	36,3	91,9	1,6	0,25

5 Tabla 1 b: Sensibilidad y especificidad de diferentes niveles de corte de HBP en el diagnóstico de septicemia bacteriana grave

Punto de corte de HBP (ng/ml)	Especificidad	Sensibilidad
>15	95,1	88,2
>16	98,0	88,2
>17	98,6	84,3
>19	98,6	84,3
>20	99,3	82,4
>21	99,3	80,4
>22	99,3	78,4
>23	99,3	76,5
>24	99,3	74,5

Tabla 1c: Sensibilidad y especificidad de diferentes niveles de corte de la proporción de HBP/WBC en el diagnóstico de septicemia bacteriana grave

Punto de corte de HBP/WBC (ng/ml)	Especificidad	Sensibilidad
-----------------------------------	---------------	--------------

1,4	87,1	92,2
1,5	95,0	88,2
1,7	95,5	86,3
1,8	96,3	86,3
1,9	98,0	86,3
2,0	98,6	86,3
2,1	98,6	84,3
2,2	98,6	81,4
2,3	98,6	78,4
2,4	98,6	74,5
3,6	99,3	54,9

Tabla 2: Análisis de la curva de ROC para las variables ensayadas en el diagnóstico de una septicemia bacteriana grave

Variable(s) de resultado de ensayo	Área Bajo la Curva	Error Típ. (a)	Sig. asintótica (b)	Intervalo de confianza del 95% asintótico	
				Límite inferior	Límite superior
HBP (ng/ml)	0,954	0,017	0,000	0,920	0,988
Proporción de HBP/WBC	0,949	0,022	0,000	0,905	0,993
Proporción de HBP/WBC o nivel de HBP (ng/ml)	0,960	0,019	0,000	0,923	0,997
CRP (mg/ml)	0,719	0,040	0,000	0,641	0,797
IL6 (pg/ml)	0,789	0,038	0,000	0,714	0,863
Lactato (mmol/l)	0,769	0,050	0,000	0,697	0,841
Recuento de WBC	0,511	0,050	0,820	0,413	0,608

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110>HANSA MEDICAL AB

<120> MÉTODO DE DIAGNÓSTICO

<130> N101680ASER

<150> GB 0711327.7

10 <151> 12-06-2007

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.0

<210> 1

<211> 222

15 <212> PRT

<213> homo sapiens

ES 2 380 875 T3

<400> 1

Ile Val Gly Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg Gln Phe Pro Phe Leu Ala
 1 5 10 15
 Ser Ile Gln Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His
 20 25 30
 Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Gln Ser Gln Asn Pro
 35 40 45
 Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu
 50 55 60
 Arg Gln Ser Arg Gln Thr Phe Ser Ile Ser Ser Met Ser Glu Asn Gly
 65 70 75 80
 Tyr Asp Pro Gln Gln Asn Leu Asn Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Asp
 85 90 95
 Arg Glu Ala Asn Leu Thr Ser Ser Val Thr Ile Leu Pro Leu Pro Leu
 100 105 110
 Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala Gly Thr Arg Cys Gln Val Ala Gly Trp
 115 120 125
 Gly Ser Gln Arg Ser Gly Gly Arg Leu Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val
 130 135 140
 Asn Val Thr Val Thr Pro Glu Asp Gln Cys Arg Pro Asn Asn Val Cys
 145 150 155 160
 Thr Gly Val Leu Thr Arg Arg Gly Gly Ile Cys Asn Gly Asp Gly Gly
 165 170 175

 Thr Pro Leu Val Cys Glu Gly Leu Ala His Gly Val Ala Ser Phe Ser
 180 185 190
 Leu Gly Pro Cys Gly Arg Gly Pro Asp Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu
 195 200 205
 Phe Arg Asp Trp Ile Asp Gly Val Leu Asn Asn Pro Gly Pro
 210 215 220

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de si un individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave, comprendiendo dicho método medir la proteína de unión a heparina (HBP) en una muestra de fluido tomada del individuo y de este modo determinar si el individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave.
- 5 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además medir el recuento de glóbulos blancos (WBC) o el recuento de neutrófilos (NC) en una muestra de sangre tomada del individuo, calcular la proporción de HBP/WBC o la proporción de HBP/NC, respectivamente, y de este modo determinar si el individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave.
- 10 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que determinar si el individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave comprende determinar si la concentración de HBP es o no superior a 15 ng/ml o 20 ng/ml en la muestra de fluido.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nivel o concentración de HBP en la muestra de fluido está aumentado al menos 2,5 veces respecto al nivel o concentración basal de HBP.
- 15 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que cuando la concentración de HBP en una muestra de fluido se mide en ng/ml y el WBC en la muestra de sangre se mide en número de células x 10⁹/l, determinar si el individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave comprende determinar si la proporción de HBP/WBC es o no superior a 2.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la proporción de HBP/WBC o la proporción de HBP/NC en la muestra de sangre está aumentada al menos 2,5 veces respecto a la proporción de HBP/WBC o la proporción de HBP/NC basal, respectivamente.
- 20 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el individuo es sospechoso de estar en riesgo de desarrollar una septicemia grave.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el individuo tiene una infección confirmada o sospechada y/o presenta uno o más de los criterios del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Grave (SIRS).
- 25 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el individuo tiene una infección confirmada o sospechada y/o presenta dos o más de los criterios del SIRS.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, en el que la infección confirmada o sospechada afecta a: los pulmones; el tracto respiratorio; el hígado; los riñones; el tracto urinario; la piel (cutánea y subcutánea); el corazón; el estómago; los intestinos; la sangre; los huesos; las articulaciones o cualquier combinación de los mismos.
- 30 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el individuo: está inmunocomprometido; es diabético; es un paciente hospitalizado con una vía intravenosa, una herida quirúrgica, un drenaje quirúrgico o una escara de decúbito; o cualquier combinación de los mismos.
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el individuo es un mamífero.
- 35 13. El método de la reivindicación 12, en el que el mamífero es un ser humano.
14. Uso *in vitro* de un anticuerpo específico de HBP o fragmento del mismo capaz de unirse a HBP para determinar si un individuo está o no en riesgo de desarrollar una septicemia grave.

FIGURA 1a

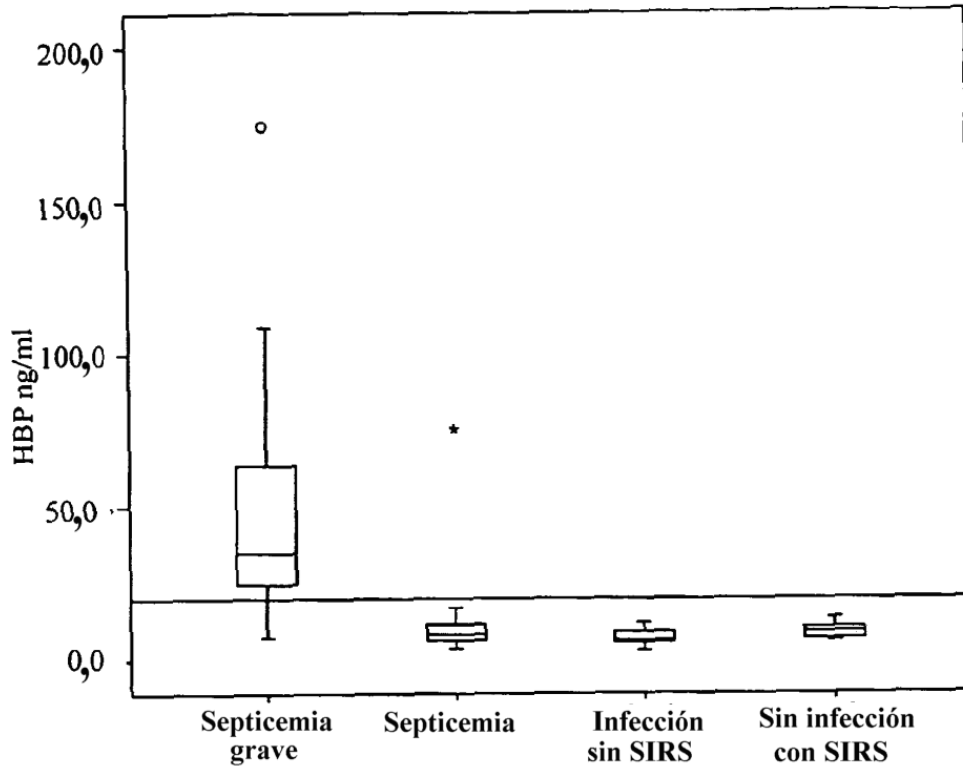


FIGURA 1b

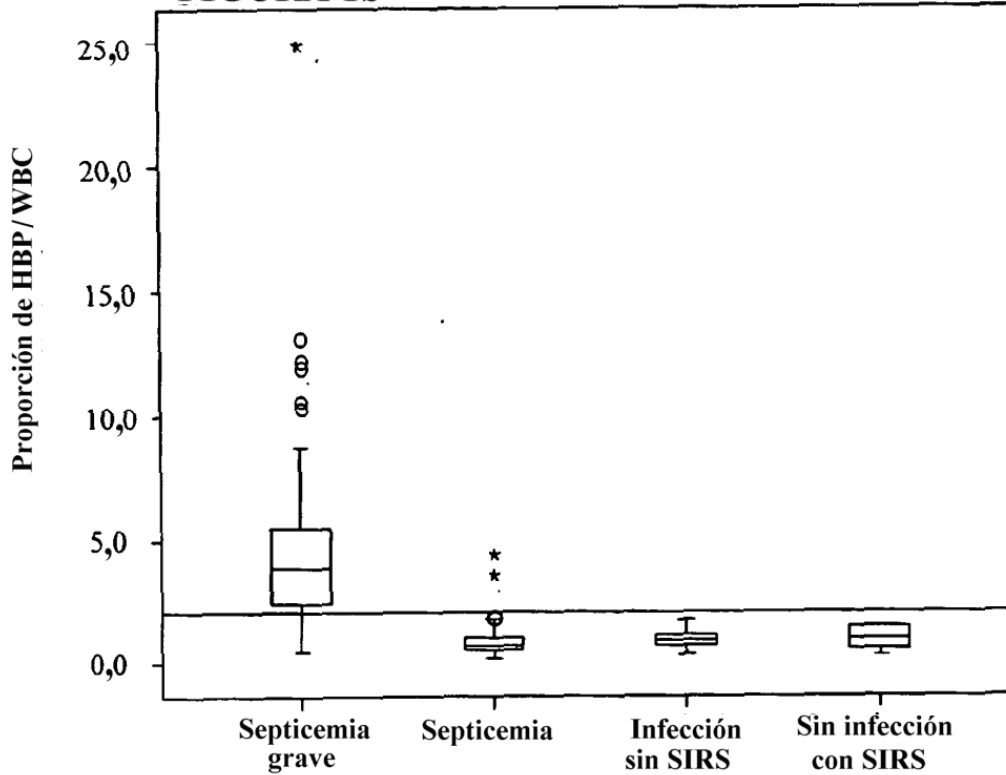


FIGURA 1c

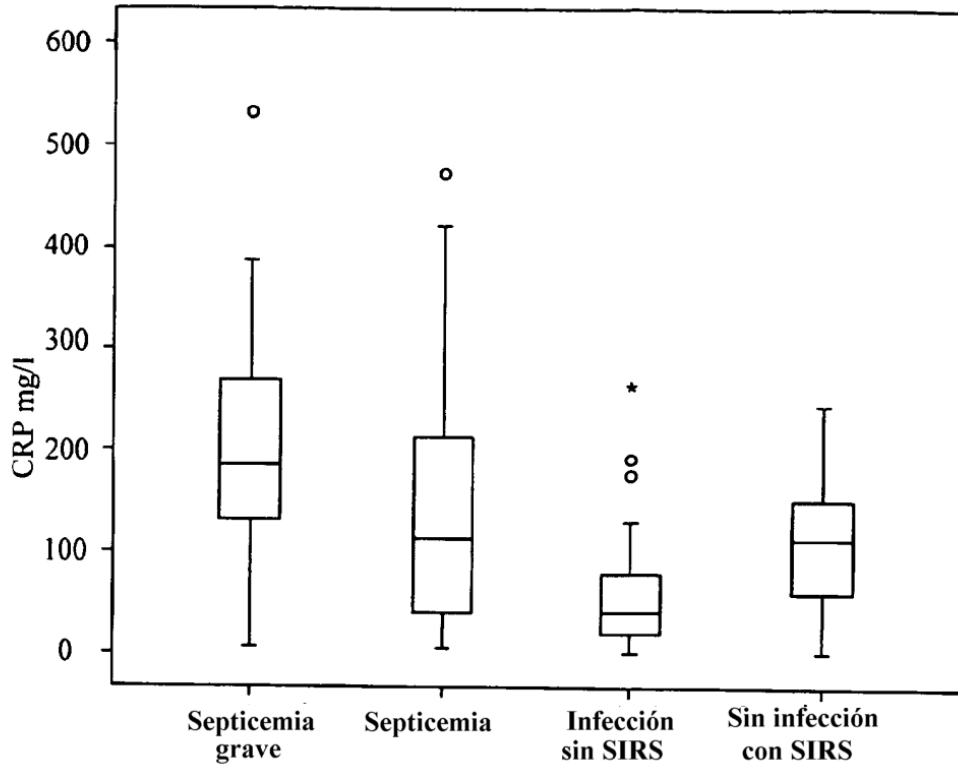


FIGURA 1d

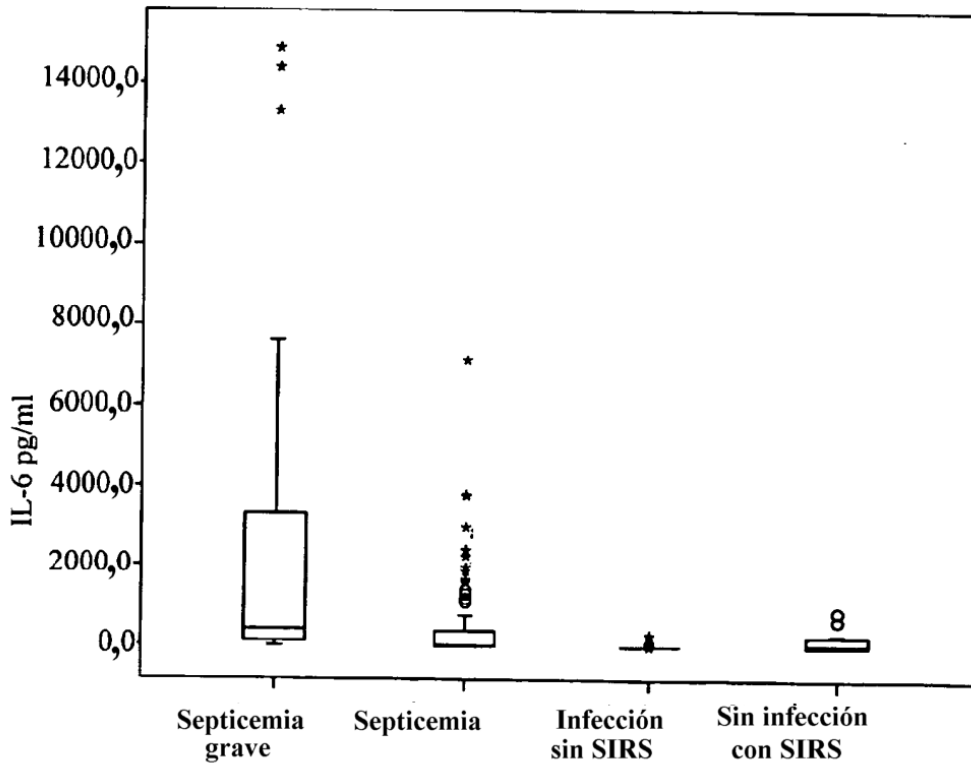


FIGURA 1e

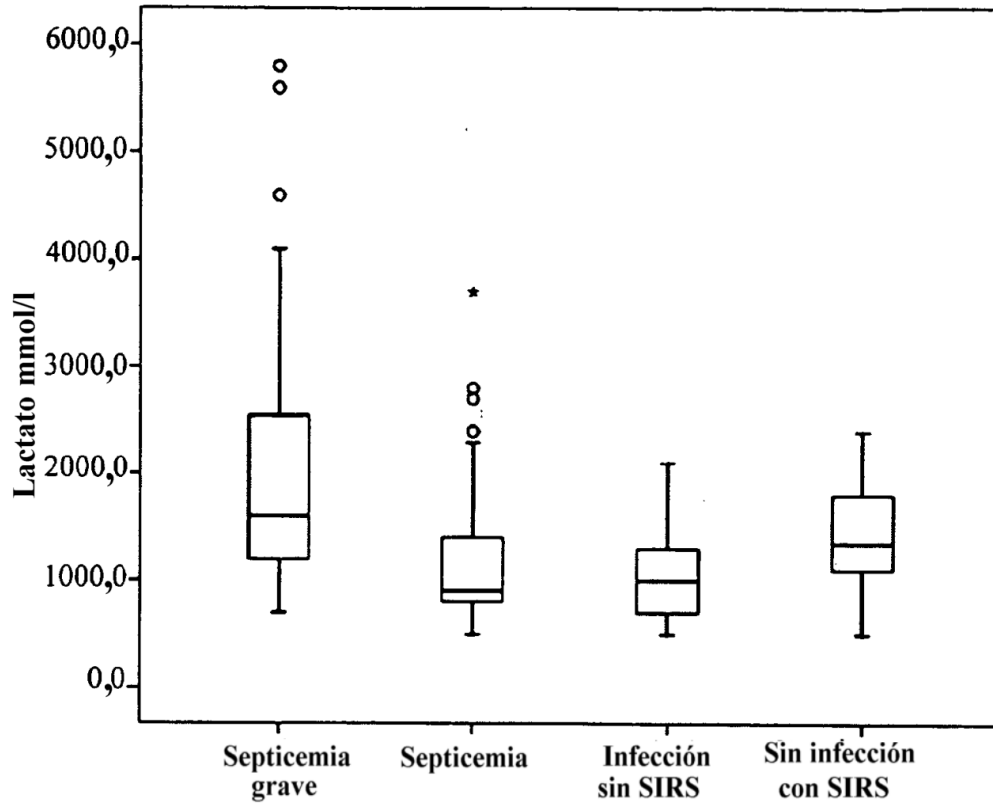


Figura 2

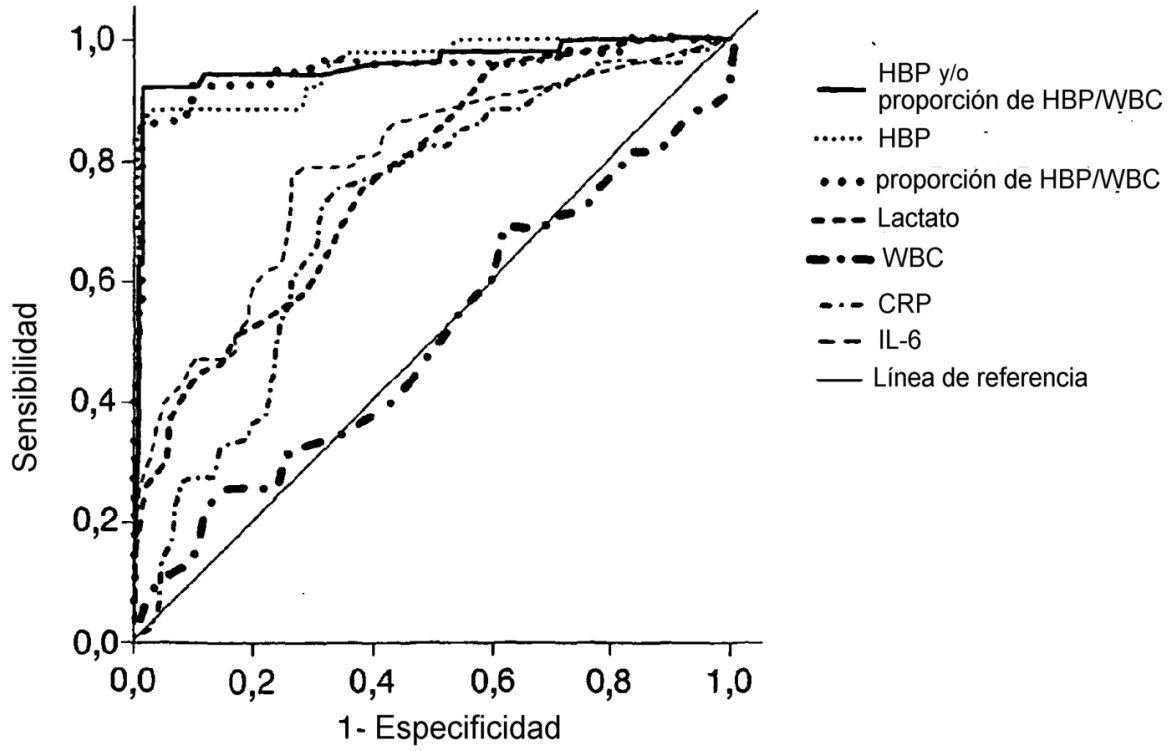


FIGURA 3a

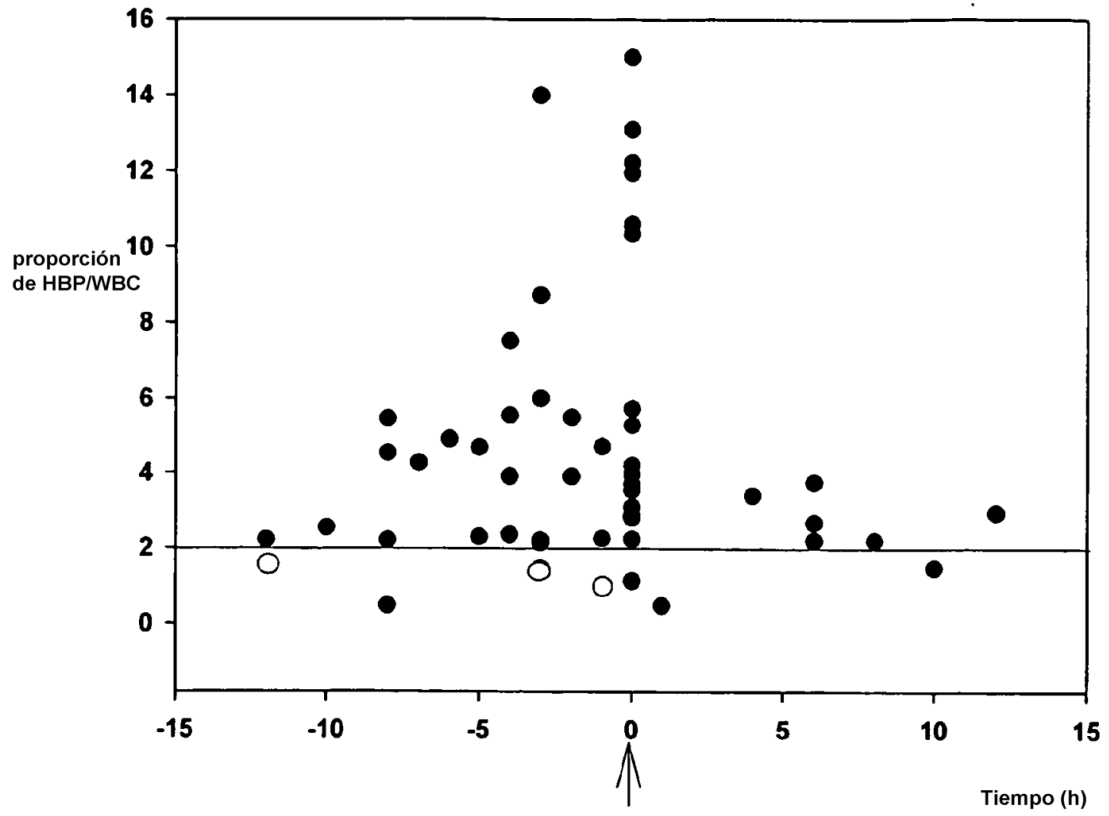


FIGURA 3b

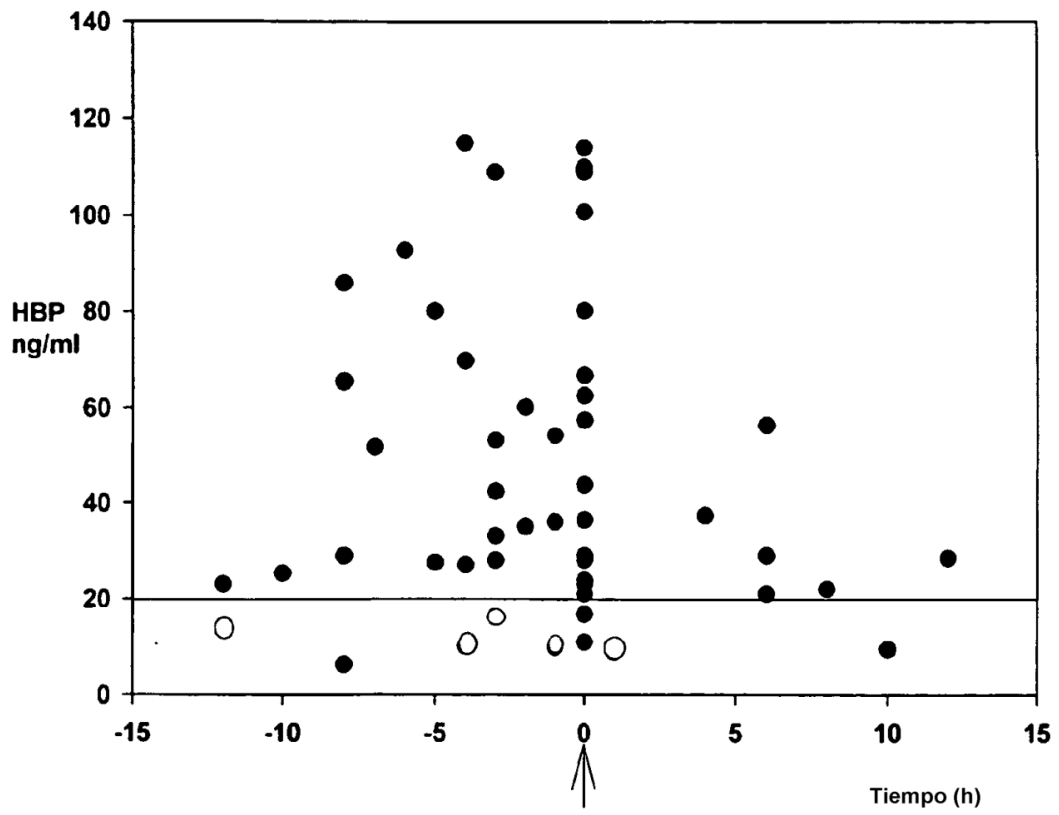


FIGURE 4b

