

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 966**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05702028 .1**
96 Fecha de presentación: **27.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1709444**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **Método para diagnosticar enfermedades infecciosas midiendo el nivel de TREM-1 soluble en una muestra**

30 Prioridad:
27.01.2004 GB 0401730

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.09.2012

73 Titular/es:
**Université de Lorraine
34 Cours Léopold CS 25233
54052 Nancy Cedex , FR**

72 Inventor/es:
**KOLOPP-SARDA, Marie Nathalie;
BENE, Marie-Christine;
PANINA, Paola;
DI LUCIA, Pietro;
LEVY, Bruno;
BOLLAERT, Pierre-Edouard;
FAURE, Gilbert y
GIBOT, Sebastien**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 386 966 T3

DESCRIPCIÓN

Método para diagnosticar enfermedades infecciosas midiendo el nivel de TREM-1 soluble en una muestra.

Esta invención se refiere en general al campo de la inmunología. Más particularmente, la presente invención se refiere a la inflamación y al uso de marcadores que permiten el diagnóstico precoz de enfermedades infecciosas (por ejemplo, de origen bacteriano o fúngico) y el seguimiento de los pacientes infestados durante el tratamiento farmacológico. Estos marcadores tienen aplicaciones particulares en el diagnóstico de neumonía y septicemia.

El diagnóstico y tratamiento de neumonía infecciosa en pacientes con ventilación (respiración) mecánica sigue siendo un reto para los profesionales clínicos. Frecuentemente se realiza un diagnóstico clínico probable de neumonía cuando un paciente desarrolla un nuevo infiltrado radiográfico asociado con fiebre, leucocitosis y secreciones traqueales purulentas y cuando se aíslan microorganismos de las vías respiratorias. Desafortunadamente muchos procesos no infecciosos pueden ser responsables de fiebre y nuevos infiltrados pulmonares en pacientes con ventilación mecánica y entonces los enfoques clínicos conducen a una sobreestimación de la incidencia de neumonía. Además, cualquiera que sea el método de diagnóstico microbiológico elegido, requiere más trabajo de laboratorio con plazos inevitables de 24 a 48 horas antes de obtener resultados de cultivos microbiológicos cuantitativos definitivos. Mientras tanto, los profesionales clínicos frecuentemente se sienten incómodos sobre el diagnóstico y, en muchos casos, se administran antibióticos innecesarios mientras se esperan los resultados del laboratorio. Por lo tanto, se han estudiado previamente muchos marcadores biológicos para mejorar la rapidez y realización del método de diagnóstico pero los resultados han sido "desalentadores".

En los Ejemplos de la presente memoria los inventores describimos un ensayo de detección rápido de la forma soluble del receptor TREM-1 humano (sTREM-1) en el líquido broncoalveolar de pacientes con ventilación mecánica para diagnosticar con precisión la neumonía bacteriana o fúngica.

Muchos procesos no infecciosos conducen a fiebre y a nuevos infiltrados pulmonares en los pacientes con ventilación mecánica, haciendo que el diagnóstico de la neumonía (y especialmente de la neumonía asociada a respiradores) sea muy desafiante. Los signos sistémicos de infección, tales como fiebre, taquicardia, y leucocitosis, son hallazgos no específicos y pueden ser causados por cualquier estado que libere citoquinas. Pugin et al. (*Am. Rev. Respir. Dis.* 1991;143:1121-9) combinaron la temperatura corporal, el recuento de leucocitos, el volumen y aspecto de las secreciones traqueales, la relación entre la presión parcial del oxígeno arterial y la fracción de oxígeno inspirado ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), examen por rayos X del pecho, y cultivos de aspirados traqueales en una puntuación clínica de infección pulmonar (abreviadamente CPIS por la expresión inglesa *Clinical Pulmonary Infection Score*) y describieron que una puntuación >6 estaba asociada con una alta probabilidad de neumonía. Esto fue confirmado por el estudio de los inventores puesto que una puntuación de infección pulmonar clínica >6 fue el mejor predictor clínico de neumonía con una relación de probabilidad de 2,98. Sin embargo, sigue sin ser confirmada la precisión del diagnóstico de esta puntuación.

En términos de tomar decisiones clínicas en pacientes en los que se sospecha neumonía, el principal problema con el método de diagnóstico microbiológico elegido, que aún es materia de debate, es que requiere cultivo de muestras, lo que implica esperar al menos 24-48 horas después de la toma de muestras. Durante este plazo, la incertidumbre del profesional clínico hacia el diagnóstico del paciente frecuentemente conduce a la prescripción de antibióticos innecesarios. Sin embargo, el uso de antibióticos empíricos de amplio espectro en pacientes sin infección es potencialmente perjudicial, facilitando la colonización y superinfección con bacterias multirresistentes y se ha demostrado que está correlacionado con aumentos de las estancias hospitalarias y por tanto con mayores costes hospitalarios. Además, el uso excesivo de antibióticos en dichos pacientes críticamente enfermos retrasa el diagnóstico y tratamiento adecuados de la verdadera causa de la fiebre y el infiltrado pulmonar.

Se han estudiado muchos marcadores biológicos con la esperanza de mejorar la rapidez y prestaciones de los métodos de diagnóstico. Entre ellos, la proteína C reactiva del suero y la procalcitonina han sido decepcionantes en pacientes críticamente enfermos. Se han obtenido resultados similares en estudios de los inventores con diferencias no significativas entre pacientes infectados pulmonarmente y pacientes no infectados.

Cuando son superados los mecanismos anatómicos y mecánicos de defensa que impiden que los microorganismos alcancen los alveolos se desarrolla una respuesta compleja del hospedante. Esta respuesta comprende la activación, por los productos microbianos, de los macrófagos alveolares que localmente liberan múltiples mediadores endógenos. Entre estos mediadores, el factor de necrosis tumoral- α (TNF α), la interleuquina-1 β (IL-1 β) y otras citoquinas han demostrado que están aumentadas en diversos tipos de problemas infecciosos pulmonares. Sin embargo, de acuerdo con otros estudios, (por ejemplo véase Monton C et al. *Crit. Care Med.* 1999; 9:1745-53), los inventores fuimos incapaces de determinar el nivel umbral discriminatorio preciso de dichos mediadores para el diagnóstico de neumonía.

Los inventores, usando una técnica de inmunotransferencia fácil de realizar demuestran en la presente invención que una forma soluble de TREM-1 (sTREM-1) se libera localmente en líquido de lavado broncoalveolar de pacientes que sufren neumonía con una sensibilidad de al menos 98 por ciento. En llamativo contraste, el sTREM-1 se detectó solamente en 6 de 64 pacientes sin neumonía. Los niveles de líquido de lavado broncoalveolar de sTREM-1 no estaban correlacionados con ninguno de los parámetros clínicos o biológicos analizados y mantenidos como parámetro independiente de alta especificidad. En un análisis de regresión logística múltiple, la presencia de sTREM-1 en el líquido de lavado broncoalveolar demostró ser el mejor predictor de neumonía con una relación de

probabilidad tan alta como 41,52. La presencia de sTREM-1 por sí mismo fue más precisa que cualesquiera hallazgos clínicos o valores de laboratorio en identificar la existencia de neumonía bacteriana o fúngica. Por tanto, la rápida detección de sTREM-1 en líquido de lavado broncoalveolar es útil en establecer o excluir el diagnóstico de neumonía bacteriana o fúngica.

La septicemia es una causa común de morbilidad y mortalidad en las unidades de cuidados intensivos (UCI). Los signos clínicos y de laboratorio de la inflamación sistémica incluyendo cambios en la temperatura corporal, taquicardia o leucocitosis no son suficientemente sensibles ni específicos para el diagnóstico de la septicemia y pueden ser mal interpretados debido a que pacientes críticamente enfermos presentan frecuentemente un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (abreviadamente en lo sucesivo SIRS por la expresión inglesa *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) sin infección. Este problema es de importancia fundamental debido al hecho de que la terapia y el desenlace difieren grandemente entre los pacientes con septicemia y los pacientes sin septicemia. Además, el amplio uso de antibióticos para tales pacientes es probable que aumente la resistencia a los antibióticos, la toxicidad y los costes. Por tanto, hay hasta el presente una necesidad no satisfecha de herramientas clínicas y de laboratorio que permitan distinguir entre SIRS y septicemia. Entre los marcadores potencialmente útiles de la septicemia, se ha sugerido la procalcitonina (en lo sucesivo abreviadamente a veces PCT) como el más prometedor. Se ha postulado que los niveles de procalcitonina son superiores a las variables clínicas o ensayos de laboratorio usados generalmente, tales como los niveles de la proteína C-reactiva (abreviadamente en lo sucesivo CRP por la expresión inglesa *C-Reactive Protein*) o el recuento de leucocitos, e incluso los correlacionan con la gravedad de la invasión microbiana. Sin embargo, diversos investigadores han cuestionado la precisión del diagnóstico y pronóstico de medidas rutinarias de la PCT, describiendo resultados inconsistentes y variables que dependen de la gravedad de la enfermedad y de la infección en la población de pacientes estudiada. La septicemia implica un consumo significativo de recursos de cuidados intensivos y sigue siendo un problema siempre presente en las unidades de cuidados intensivos. Se ha estimado que entre 400.000 y 500.000 pacientes están así afectados cada año tanto en EE.UU. como en Europa. La morbilidad y la mortalidad siguen siendo altas a pesar de mejoras tanto en las terapias de mantenimiento como anti-microbianas. Las tasas de mortalidad varían desde 40% para septicemias no complicadas hasta 80% en los pacientes que sufren choque séptico y disfunción multiorgánica. Ahora está siendo mejor comprendida la patogénesis de los estados. La mayor comprensión del complejo retículo de mediadores inmunitarios, inflamatorios y hematológicos puede permitir el desarrollo de métodos racionales y nuevas terapias.

La afección de la septicemia ha sido asociada previamente a muchos términos y nomenclaturas, que reflejan tanto la complejidad de la afección como la similitud a otras etiologías de la respuesta inflamatoria secundaria. Para ilustrar la compleja naturaleza de la septicemia, ésta ha sido definida por Edward O. Uthman, MD, como "*una constelación de hallazgos clínicos y de laboratorio para los cuales un médico experimentado llega a la conclusión de que el paciente puede tener una infección grave*". Su definición tuvo como finalidad ser una definición nebulosa, subjetiva y tautológica, porque los intentos de definir la "septicemia" en la bibliografía provocaron una gran cantidad de desacuerdo y reservas.

En 1991, el *American College of Chest Physicians and the American Society of Critical Care Medicine* publicó definiciones para el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y la septicemia, con el fin de clarificar el diagnóstico y tratamiento de estas afecciones y ayudar a la interpretación de los investigadores en este campo (véase la Tabla 1).

Tabla 1: Definiciones para el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y septicemia

Hay SIRS cuando se den dos o más de:	1. Temperatura > 38°C o <36°C 2. Taquicardia > 90 latidos/minuto 3. Ritmo respiratorio > 20 respiraciones/minuto o PaCO ₂ < 4,3 kPa 4. Recuento leucocitario >12x10 ⁹ /L o < 4x10 ⁹ /L o >10% de formas inmaduras (banda)
Septicemia:	SIRS debido a infección
Septicemia grave:	Septicemia con pruebas de hipoperfusión de órganos
Choque séptico:	Septicemia grave con hipotensión (presión sistólica BP < 90 mm de Hg) a pesar de resucitación con líquido adecuada o el requerimiento de agentes vasopresores/inotrópicos para mantener la presión sanguínea.

Un modelo de variables fisiológicas ha sido mostrado en pacientes críticamente enfermos en respuesta a una gama de agresiones que incluyen; trauma, quemaduras, pancreatitis e infección. Estos incluyen respuestas inflamatorias, leucocitosis o leucopenia grave, hipertermia o hipotermia, taquicardia y taquipnea y han sido denominados colectivamente síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Esta definición pone el énfasis en la importancia del proceso inflamatorio en estos estados independientemente de la presencia de infección. El término septicemia está reservado al SIRS cuando se sospecha o está probada la infección.

La septicemia está más estratificada en la septicemia grave cuando hay pruebas de la hiperfusión de órganos, puesta de manifiesto por la disfunción de órganos, tales como hipoxemia, oliguria, acidosis láctica o función cerebral alterada. El choque séptico es la septicemia grave complicada con hipotensión definida como presión de sangre sistólica inferior a 90 mm de Hg a pesar de resucitación con líquido adecuada. La septicemia y el SIRS pueden

complicarse por la insuficiencia de dos o más órganos, denominada insuficiencia de múltiples órganos (abreviadamente MOF por la expresión inglesa *Multiple Organ Failure*), debida a perfusión y oxigenación desordenada de órganos. Además de los efectos sistémicos de la infección, una respuesta inflamatoria sistémica puede ocurrir en estados inflamatorios graves, tales como pancreatitis y quemaduras.

5 El aspecto de los signos de una respuesta inflamatoria está menos bien definido después de agresiones traumáticas. En la unidad de cuidados intensivos, las bacterias gram-negativas están implicadas en 50 a 60% de las septicemias, dando cuenta las bacterias gram-positivas de más de 35 a 40% de los casos. El resto de los casos es debido a causas menos comunes de hongos, virus y protozoos.

10 El reconocimiento precoz de la septicemia y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en pacientes críticamente enfermos pueden evitar el aumento de la morbilidad, la mortalidad y la duración de las estancias asociadas con la insuficiencia de múltiples órganos. Sin embargo, hay problemas importantes asociados con el diagnóstico de la septicemia y existe una clara necesidad de métodos rápidos, fiables y sensibles para detectar, monitorizar y tratar el SIRS debido a agentes infecciosos (septicemia).

15 La presente invención está dirigida a evitar los problemas existentes asociados con el diagnóstico de la septicemia para proporcionar un método de detección seguro y consistente. En los Ejemplos de la presente memoria los inventores describimos el valor de analizar la forma soluble de TREM-1 (sTREM-1) en muestras de plasma de pacientes críticamente enfermos recién ingresados sospechosos de padecer septicemia como un nuevo enfoque de diagnosticar con precisión los procesos infecciosos.

20 La identificación temprana de la infección tiene un impacto principal en el curso, gestión y desenlace clínicos de los pacientes críticos. Los médicos de cuidados intensivos tienen a su disposición una variedad de indicadores para servirse como guía en discriminar estados infecciosos de los que no lo son en los pacientes recién ingresados. En algunos casos, el diagnóstico de la septicemia llega a ser muy claro después de completar el historial médico y el examen físico de un paciente recién ingresado (Bates DW, et al. *Ann. Intern. Med.* 1990; 113:495-500). En otras circunstancias las agresiones no infecciosas que causan el SIRS (por ejemplo, trauma, hemorragia, quemaduras, pancreatitis, etc.), el diagnóstico de la septicemia sigue siendo un reto. Se han hecho esfuerzos para identificar un marcador fiable de la infección. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha producido la aceptación general de ningún indicador clínico o biológico de la septicemia. Entre los marcadores potencialmente útiles de la septicemia, la procalcitonina han sido propuesta como uno de los más prometedores, pero ha sido cuestionado por diversos autores.

30 En el estudio descrito en el Ejemplo 3 de la presente memoria, el nivel plasmático de sTREM-1 parece ser el mejor predictor independiente de la septicemia. A un nivel umbral de 600 ng/mL, los valores predictivos positivos y negativos son 94 y 92 % respectivamente. Este estudio tiene una implicación importante para los profesionales clínicos. Como supuesto nuevo ensayo para diagnosticar la septicemia tras el ingreso en la UCI, la valoración del nivel de sTREM-1 plasmático ofrece un grado de certeza más alto que los otros candidatos actualmente disponibles. Esta precisión puede guiar útilmente a los médicos en su toma de decisiones clínicas y ser un enfoque en etapas a la compleja gestión de los pacientes críticamente enfermos. La técnica de la inmunotransferencia usada en la presente invención puede realizarse en 3 a 4 horas y puede proporcionar valiosa información mucho antes de que estén disponibles los resultados de cultivos de sangre. Además, es de bajo coste y puede ser aplicada a pequeñas series o incluso a muestras individuales.

40 Los resultados descritos en la presente invención demuestran que la rápida medida de los niveles de sTREM-1 plasmático puede mejorar la capacidad de los profesionales clínicos en diferenciar pacientes con septicemia de los que tiene inflamación sistémica de origen no infeccioso. Esto debe ser especialmente útil para los pacientes para los que el diagnóstico no es clínicamente sencillo. La técnica de inmunotransferencia descrita es rápida, precisa, de bajo coste y puede ser aplicada a pequeñas series o incluso a muestras individuales. El uso de este ensayo para determinar los niveles de sTREM-1 plasmático debe conducir a un diagnóstico más preciso de la septicemia en pacientes ingresados en UCI con una sospecha clínica de infección.

45 El receptor desencadenante expresado en células mieloides-1 (TREM-1) es un miembro de la superfamilia de las Ig, cuya expresión está sobre-regulada en células fagocíticas en presencia de bacterias u hongos (Bouchon A et al. *Nature* 2001; 230: 1103-7). La proteína TREM-1 y el ácido nucleico correspondiente están descritos en la solicitud de patente US 2003/0165875 y el documento de patente US 6.420.326, mientras que el documento WO 02/058721 describe una variante de empalme soluble (TREM-1 sv) y se especula que los niveles disminuidos de esta proteína pueden indicar una respuesta inflamatoria. Los inventores hemos determinado que el TREM-1 se libera o se segrega desde la membrana de fagocitos activados y puede encontrarse en una forma soluble en los líquidos corporales y por tanto es un marcador de diagnóstico útil. La presencia de una forma soluble de TREM-1 (sTREM-1) en líquido de lavado broncoalveolar (abreviadamente BAL por la expresión inglesa *Bronchoalveolar lavage*) de pacientes con ventilación mecánica se muestra en la presente memoria como un buen indicador de la neumonía infecciosa.

Además, como se describe en la presente memoria, el uso de una valoración de sTREM-1 plasmático en un grupo de pacientes gravemente enfermos, ingresados con signos de inflamación grave aguda, puede distinguir la septicemia de la inflamación no infecciosa sistémica grave.

60 Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para el cribado clínico y diagnóstico de una enfermedad de origen bacteriano o fúngico que sea neumonía o septicemia.

Por tanto, en un primer aspecto la invención proporciona un método para diagnosticar una enfermedad de origen bacteriano o fúngico en un sujeto, en donde dicha enfermedad es neumonía o septicemia, comprendiendo dicho método la etapa de medir el nivel de sTREM-1 en una muestra biológica de líquido corporal obtenido de dicho sujeto, comparar el nivel medido de sTREM-1 en la muestra con un nivel medio en una población de control que no tiene dicha enfermedad de origen bacteriano o fúngico, comparándose los niveles elevados de sTREM-1 con dicho control que indicativo de la presencia o extensión de dicha enfermedad de origen bacteriano o fúngico en el paciente, en donde dicha etapa de medir el nivel de sTREM-1 comprende a su vez la etapas de:

- (a) poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo capaz de unirse específicamente a sTREM-1; y
- (b) detectar el nivel de sTREM-1 presente en la muestra observando el nivel de unión entre dicho anticuerpo y sTREM-1. Como se ha indicado antes sTREM-1 es una forma soluble del receptor TREM-1 que puede ser detectada en ciertas muestras de líquido corporal por un anticuerpo producido contra el receptor TREM-1.

El término "neumonía" como se define en la presente memoria, significa una inflamación de los pulmones causada por infección por agentes patógenos extracelulares, tales como infecciones bacterianas e infecciones no bacterianas (por ejemplo, infección por *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides*, *Sporothrixschenkii*, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, o *Mucor* sp.), infecciones por protozoos o infecciones por parásitos (no parte de la invención por ejemplo, las causadas por *Toxoplasma gondii*, *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris*, *anquilostoma*, *Dirofilaria*, *Paragonimus* o *Entamoeba histolytica*) en donde se puede detectar la expresión aumentada de sTREM-1. La neumonía incluye la "neumonía lobular" (que ocurre en un lóbulo de los pulmones) y bronconeumonía (que tiende a estar irregularmente localizada en los pulmones). Además, la neumonía se clasifica frecuentemente en dos categorías que pueden ayudar a predecir los organismos que más probablemente son los responsables. "La neumonía adquirida en la comunidad que es la contraída fuera de un hospital. La neumonía en este caso frecuentemente sigue a una infección respiratoria viral. Afecta a casi 4 millones de adultos cada año. Probablemente sea causada por *Streptococcus pneumoniae*, la bacteria más común causante de la neumonía. Otros organismos, tales como bacterias atípicas llamada *Chlamydia* o *Mycoplasma pneumonia* son también causas comunes de neumonía adquirida en la comunidad. "La neumonía adquirida en hospitales" contraída dentro de hospitales se denomina frecuentemente neumonía nosocomial. Los pacientes hospitalizados son particularmente vulnerables a bacterias gram-negativas y estafilococos.

La expresión "septicemia de origen bacteriano o fúngico" como se define en la presente memoria, significa SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) asociada con infección por agentes patógenos extracelulares tales como infección bacteriana, por ejemplo bacteremia (la presencia de bacterias en la sangre) con o sin insuficiencia de órganos, y las infecciones no bacterianas, tales como la fungemia (por ejemplo, la infección por levadura por *Candida albicans*), infecciones por protozoos o parasitemia (no parte de la invención; tal como en la en filariasis, malaria y tripanosomiasis) en donde puede ser detectada la expresión aumentada de sTREM-1. Sin vincularse a ninguna teoría, los inventores sospechamos que la expresión de sTREM-1 no está generalmente aumentada en incidencias de infección y septicemia causadas por agentes patógenos intracelulares, tales como virus.

En este aspecto, la medida del nivel de sTREM-1 comprende la etapas de: (a) poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo capaz de unirse específicamente a sTREM-1; y (b) detectar el nivel de sTREM-1 presente en la muestra observando el nivel de unión entre dicho anticuerpo y sTREM-1.

La valoración o medida de los niveles de sTREM-1 presentes en la muestra se pueden realizar usando protocolos estándares conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando tiene lugar la observación de la unión entre sTREM-1 y un anticuerpo capaz de unirse específicamente a sTREM-1, esta observación se puede llevar a cabo usando metodologías conocidas. Por ejemplo la unión puede ser detectada mediante el uso de una inmunoendayo competitivo, un sistema de ensayo no competitivo que usa técnicas tales como transferencias Western, un radioinmunoensayo, un ensayo ELISA (ensayo con inmunosorbente unido a enzima), un inmunoensayo "sándwich", un ensayo de inmunoprecipitación, una reacción con precipitina, una reacción con precipitina en difusión en gel, un ensayo de inmunodifusión, un ensayo de aglutinación, un ensayo de fijación del complemento, un ensayo inmunoradiométrico, un inmunoensayo fluorescente, un inmunoensayo con proteína A, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo ELISA de competición o sándwich, un radio-inmunoensayo, un ensayo de transferencia Western, un ensayo inmunohistológico, un ensayo inmunocitoquímico, un ensayo de transferencia de mancha, un ensayo de polarización con fluorescencia, un ensayo de proximidad de escintilación, un ensayo de fluorescencia resuelto en tiempo homogéneo, un análisis *IASys* y un análisis *BIAcore*.

La determinación de la incidencia de la enfermedad de origen bacteriano o fúngico que sea neumonía o septicemia (dependiendo del estado del paciente y el tipo de muestra) puede ser abordada comparando los niveles de sTREM-1 presentes en la muestra con el nivel del valor de la mediana en un grupo de muestras de control, es decir, muestras de individuos sanos). Se describe la comparación con una muestra de control o con datos derivados de análisis previos (por ejemplo los proporcionados como una curva o ilustración estándar con un kit de diagnóstico o datos contenidos en un programa informático, por ejemplo asociados con un medio de diagnóstico). La determinación de la incidencia de origen bacteriano o fúngico puede comprender derivar la relación de probabilidad usando un análisis multivariante basado en los parámetros de distribución a partir de un conjunto de datos de referencia derivados del análisis de los niveles de sTREM-1 en pacientes los cuales la enfermedad de origen bacteriano o fúngico está ausente, presente o en remisión.

Se describen medios de diagnóstico capaces de medir niveles de sTREM-1 y/o comparar dichos niveles con niveles conocidos que son indicativos del estado de la enfermedad del paciente. Dichos medios de diagnóstico puede tomar la forma de un ensayo con un bastoncito, por ejemplo llevando los reactivos necesarios para realizar el método de la invención y producir, por ejemplo, un resultado colorimétrico que puede ser comparado contra una carta de colores.

5 También se consideran otros medios de diagnóstico que incluyen medios de medida de muestras y/o medios de proceso de datos que contienen datos estándares, como se ha mencionado antes, con programas asociados para comparar dichos datos con los datos de una muestra.

Por tanto, el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención comprende la etapa adicional de correlacionar el nivel detectado de sTREM-1 con la presencia o ausencia de enfermedad de origen bacteriano o fúngico que es neumonía o septicemia comparando el nivel medido de sTREM-1 en la muestra con un valor de la mediana del nivel obtenido en muestras obtenidas de una población de control de individuos que no tienen una enfermedad de origen bacteriano o fúngico, para indicar la presencia o ausencia de enfermedad de origen bacteriano o fúngico en el paciente.

En una realización adicional, el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede ser usado en monitorizar la evolución o remisión de la enfermedad de origen bacteriano o fúngico, en otras palabras, para indicar la evolución o remisión de la enfermedad. Dichos métodos podrían ser usados para monitorizar la eficacia y/o progreso de la terapia en un sujeto. En esta realización, el método comprende además las etapas de medir el nivel de de sTREM-1 en una segunda o posterior muestra del paciente, obteniéndose las primera y segunda o posteriores muestras en diferentes tiempos; y comparando los niveles de las muestras para indicar la evolución o remisión de la enfermedad de origen bacteriano o fúngico.

Los métodos de diagnóstico de acuerdo con la presente invención se llevan a cabo *ex vivo*. Las muestras biológicas para análisis por los métodos de la invención pueden ser obtenidas usando métodos conocidos en la técnica a partir de varias fuentes, en particular a partir de líquidos corporales, tales como sangre completa, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina y líquido de lavado broncoalveolar. La muestra debe ser una muestra tratada de tal modo que cualquier sTREM-1 presente no sea eliminado antes de la valoración o se haga indetectable.

Cuando un paciente tiene síntomas de neumonía sospechada, una muestra biológica preferida es una muestra de líquido de lavado broncoalveolar.

Cuando un paciente tiene síntomas de SIRS, una muestra biológica preferida es una muestra de suero sanguíneo.

Los métodos de la invención son aplicables a mamíferos, por ejemplo humanos, primates no humanos, ovejas, cerdos, vacas, caballos, cabras, perros, gatos y roedores, tales como ratón y rata. Generalmente la muestra biológica analizada por los métodos de la invención es una muestra humana. La muestra biológica debe contener generalmente moléculas de proteínas del sujeto analizado y se debe manipular de tal modo que las proteínas de la muestra no se hagan indetectables por los compuestos elegidos para detectarlas.

En la presente solicitud, la expresión "compuesto capaz de unirse a sTREM-1" significa anticuerpos se une específicamente a sTREM-1.

En los métodos de la invención se usan anticuerpos que se une específicamente, de modo preferible exclusivamente a sTREM-1 incluyendo pero sin limitación, los anticuerpos que son: anticuerpos mono- o poli-clonales (por ejemplo, producidos contra sTREM-1), anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos, multi-específicos, bi-específicos, anticuerpos monocatenarios derivados de técnicas de presentación de fagos, fragmentos de Fab, F(ab')₂, Fvs enlazados por disulfuro, y fragmentos que contienen un dominio VL o VH o incluso una región determinante complementaria (abreviadamente CDR por la expresión inglesa *Complementary Determining Region*) que específicamente se une a sTREM-1.

Las inmunoglobulinas modificadas de otro modo también están incluidas dentro del alcance de la invención, por ejemplo una fusión del receptor de TREM-1 a uno o más dominios proteínicos derivados de inmunoglobulinas, por ejemplo para conferir solubilidad y/o estabilidad a, por ejemplo fragmentos Fc de IgG o IgM humanas.

También se describen sustancias o productos que mimetizan la estructura terciaria de un ligando para el receptor de TREM-1 como compañeros de unión específica para sTREM-1. Es posible diseñar dichos productos sobre la base de modelización por ordenador. El producto puede ser producido sintéticamente usando medios químicos. El uso de tecnología del DNA recombinante para modificar la estructura requerida también es posible como lo es la modificación química.

Como se ha descrito, se considera que el receptor de TREM-1 aislado o sTREM-1, o la modelización por ordenador usando la estructura del receptor de TREM-1 o sTREM-1, pueden ser usados para producir compañeros específicos de unión para sTREM-1 usando métodos conocidos en la técnica.

El compuesto capaz de unirse a sTREM-1 es un anticuerpo producido contra el receptor de TREM-1, uno de sus fragmentos o una de sus variantes, siempre que sea capaz de unirse específicamente a sTREM-1. Por ejemplo, dicho anticuerpo es uno producido contra la proteína de fusión de Fc y TREM-1 humano (TREM-1-Fc) (véase el Ejemplo 1 en la presente descripción).

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo capaz de unirse

específicamente a sTREM-1 en un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de origen bacteriano o fúngico, es decir, neumonía o septicemia como se define en las reivindicaciones.

Como se ha indicado antes "un anticuerpo producido contra el receptor de TREM-1, uno de sus fragmentos o una de sus variantes" puede funcionar como un compuesto capaz de unirse específicamente a sTREM-1. Los anticuerpos se producen preferiblemente contra el receptor de TREM-1 humano (receptor desencadenante expresado en células mieloides) para el cual se da la secuencia de cDNA en la [SEQ ID NO:1]. El receptor de TREM-1 que se expresa en células mieloides humanas, es una proteína transmembranal de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig-SF). El receptor de TREM-1 es una glicoproteína transmembranal que tiene la secuencia de aminoácidos de la [SEQ ID NO:2] que se expresa selectivamente en neutrófilos de la sangre y un subconjunto de monocitos, pero no los linfocitos y otros tipos de células.

Por consiguiente, se describen anticuerpos producidos contra proteínas TREM aisladas o recombinantemente preparadas TREM o sus polipéptidos o sus fragmentos, sus homólogos, sus derivados, o sus variantes, como se han definido en la presente memoria, como polipéptidos derivados del receptor de "TREM-1".

De acuerdo con la definición de "anticuerpo capaz de unirse específicamente a sTREM-1", dichos anticuerpos producidos contra "polipéptidos derivados del receptor de TREM-1" se unen específicamente a sTREM-1. Dichos anticuerpos pueden ser ensayados para unirse con células que expresan el receptor TREM-1 y preferiblemente también una muestra de un paciente que se sabe ha estado padeciendo neumonía o septicemia de origen bacteriano o fúngico.

El término "homólogo" especialmente "homólogo del receptor de TREM-1" tal como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier miembro de una serie de péptidos que pueden producirse a los cuales pueden unirse los anticuerpos capaces de unirse a sTREM-1. Los homólogos del receptor de TREM-1 pueden ser de la misma o diferente especie de animales.

El término "variante" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una variación alélica de origen natural de un péptido dado o una variación preparada recombinantemente de un péptido o proteína dados en el cual uno o más residuos de aminoácidos han sido modificados por sustitución, adición o delección de aminoácidos.

El término "derivado" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una variación de un péptido o proteína dados que están modificados de otra forma, es decir, por unión covalente de cualquier tipo de molécula, preferiblemente que tiene bioactividad, al péptido o proteína, incluyendo aminoácidos de origen no natural.

El cDNA del receptor de TREM-1 humano es un nucleótido de una longitud de 884 bases (Fig. 1; [SEQ ID NO:1]) y el marco de lectura abierto del receptor de TREM-1 está constituido por los nucleótidos 48 a 752 de la [SEQ ID NO:1], que codifica una proteína transmembranal que comprende la secuencia de 234 aminoácidos mostrada en la Fig. 2 [SEQ ID NO:2]. El cDNA del receptor TREM-1 humano puede encontrarse en la base de datos GenBank con el número de acceso AF196329. El supuesto dominio transmembranal abarca los residuos de aminoácidos 201 a 229 de la [SEQ ID NO:2] y contiene un residuo de lisina cargado en la posición 217. Su cola citoplásmica consiste en 5 residuos de aminoácidos y no parece contener restos de señalización.

En una realización particular y preferida, los anticuerpos para unirse al sTREM-1 se producen contra el polipéptido derivado del receptor de TREM-1 que comprende al menos un dominio extracelular que comprende a su vez los residuos de aminoácidos 17 a 200 de la [SEQ ID NO:2].

Además de los anticuerpos antes descritos, otros anticuerpos adecuados para uso en la invención son los que tienen la capacidad de unirse a sTREM-1 que se producen contra homólogos del receptor de TREM-1 de la misma o diferente especie de animal, preferiblemente de mamíferos, más preferiblemente de roedores, tales como ratón y rata, y más preferiblemente de ser humano.

Los homólogos de la molécula de ácido nucleico del receptor de TREM-1 (es decir, la [SEQ ID NO:1]) pueden ser aislados basándose en su estrecha identidad de secuencia de nucleótidos con las moléculas de ácido nucleico humano descritas en la presente memoria, por técnicas de hibridación estándar en condiciones estrictas o moderadamente estrictas, como las definidas en la presente memoria más adelante, usando el cDNA humano de la invención o una de sus porciones como sonda de hibridación.

Los aspectos de la invención también pueden ser aplicados en el marco del diagnóstico múltiple de un sujeto. Por ejemplo, en un método de cribado de un paciente para detectar la presencia o susceptibilidad a la enfermedad descrita en la presente memoria, que comprende realizar una pluralidad de ensayos de diagnóstico en una muestra de tejidos del paciente para una pluralidad de enfermedades, la invención proporciona la mejora en donde uno de los ensayos de diagnóstico comprende medir el nivel de sTREM-1.

Por claridad debe advertirse que en los aspectos y realizaciones de la invención antes descritos, el diagnóstico de neumonía sola o septicemia sola será deducido tanto por el nivel detectado de sTREM-1 como por síntomas del paciente. Generalmente una muestra del lavado broncoalveolar de un paciente con síntomas relativos a los pulmones sería usado para diagnosticar neumonía basándose en los niveles elevados de sTREM-1. Una muestra de suero sanguíneo de un paciente que presenta síntomas de SIRS sería usada para diagnosticar septicemia de origen bacteriano o fúngico basándose en niveles elevados de sTREM-1.

Por tanto la invención también proporciona un método para diagnosticar la enfermedad de origen bacteriano o fúngico en sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de medir el nivel de sTREM-1 y la etapa de medir el nivel de TREM-1-ligando en una o más muestras biológicas obtenidas de dicho sujeto.

Como se describe en el Ejemplo 4 en la presente memoria, los inventores han desarrollado un método basado en una ensayo inmunoenzimático (en este caso ELISA) para la detección de TREM-1 soluble. Por tanto, la invención proporciona un método para diagnosticar la enfermedad de origen bacteriano o fúngico en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de medir el nivel de sTREM-1 en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto y en donde el nivel de sTREM-1 se mide por una técnica inmunoquímica. Ejemplos de dichas técnicas inmunoquímicas son inmunofluorescencia indirecta (IIF), inmunoperoxidasa (POD), inmunotransferencia Western (WB), radioinmunoprecipitación (RIPA), ensayo con inmunosorbente unido a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y ensayos de aglutinación. En una realización preferida se usa un método ELISA que emplea un anticuerpo TREM-1 anti-humano para medir el nivel de sTREM-1.

El documento WO2004081233 describe un método para diagnosticar septicemia bacteriana o fúngica en un sujeto midiendo el nivel de TREM-1-Ligando en una muestra biológica obtenida del sujeto y compuestos capaces de unirse al TREM-1-Ligando. El nivel de TREM-1-Ligando presente en las muestras se mide observando el nivel de unión entre estos compuestos y TREM-1-Ligando. Como se describe en el Ejemplo 4 de la presente memoria, los inventores hemos determinado la medida de tanto el TREM-1 soluble (como se describe en la presente memoria) como del TREM-1-Ligando asociado a membrana (como se describe en el documento WO2004081233) en pacientes recién ingresados críticamente enfermos permite la rápida identificación de los que tienen infección.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención son aplicables a cada uno de los otros aspectos, *mutatis mutandis*.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, con referencia a las Figuras de los dibujos, en las cuales:

La Figura 1 muestra el cDNA del receptor de TREM-1 humano [SEQ ID NO:1].

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos del receptor de TREM-1 humano [SEQ ID NO:2].

La Figura 3 muestra los niveles de sTREM-1 en líquido de lavado broncoalveolar de pacientes de acuerdo con el diagnóstico. Los valores individuales están representados gráficamente y las barras representan los valores medios. $P < 0,001$ entre neumonía adquirida en la comunidad (abreviadamente CAP por la expresión inglesa *Community Acquired Pneumonia*) y pacientes sin neumonía (abreviadamente NP por la expresión inglesa *No Pneumonia*) y entre neumonía asociada a respirador (abreviadamente VAP por la expresión inglesa *Ventilator-associated Pneumonia*) y NP: (n=64); CAP: (n=38); VAP: (n=46).

La Figura 4 muestra curvas de eficacia diagnóstica (abreviadamente ROC por la expresión inglesa *Receiver-Operating-Characteristic*) del receptor para varios niveles umbrales de sTREM-1 en líquido de lavado broncoalveolar, el factor de necrosis tumoral-1 α e interleuquina-1 β en diferenciar entre presencia y ausencia de neumonía. Áreas bajo las curvas de eficacia diagnóstica (ROC) para:

sTREM-1: 0,93 (intervalo de confianza del 95%, 0,92 a 0,95)

Factor de necrosis tumoral-1 α : 0,64 (intervalo de confianza del 95%, 0,62 a 0,69)

Interleuquina-1 β : 0,69 intervalo de confianza, 0,67 a 0,72)

La Figura 5 muestra líquidos sobrenadantes de lavado broncoalveolar (BAL) examinados por análisis de transferencia Western usando el anticuerpo monoclonal anti TREM-1 21C7:

Pista 1: control positivo (sTREM-1, 50 pg/mL)

Pista 2: líquido sobrenadante de BAL de un paciente con neumonía

Pista 3: líquido sobrenadante de BAL de un paciente sin neumonía

La Figura 6 muestra un diagrama de flujo de pacientes ingresados en la UCI durante el periodo de estudio.

La Figura 7 muestra los niveles plasmáticos en el ingreso de Proteína C reactiva, Procalcitonina y sTREM-1 de acuerdo con el diagnóstico. Los valores individuales están representados gráficamente y las barras representan los valores medios. $P < 0,001$ entre SIRS y septicemia y entre SIRS y choque séptico*:

SIRS: pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (n=29)

Septicemia: pacientes con septicemia o septicemia grave (n=22)

Choque séptico: pacientes con choque séptico (n=25)

La Figura 8 muestra curvas de eficacia diagnóstica (ROC) para diversos niveles umbrales de Proteína C reactiva plasmática, Procalcitonina y sTREM-1 en diferenciar entre presencia y ausencia de infección. Áreas bajo las curvas ROC para: :

Proteína C reactiva: 0,77 (intervalo de confianza del 95%, 0,69 a 0,85)

Procalcitonina: 0,85 (intervalo de confianza del 95%, 0,81 a 0,89)

sTREM-1: 0,97 (intervalo de confianza del 95%, 0,94 a 1,0)

La Figura 9 muestra los niveles plasmáticos en el ingreso de C Proteína C reactiva, Procalcitonina y sTREM-1 en pacientes con septicemia, septicemia grave y choque séptico de acuerdo con el desenlace. Los valores individuales están representados gráficamente y las barras representan los valores medios. Los valores de P son 0,26, 0,64 y 0,05 entre supervivientes y no supervivientes para Proteína C reactiva, Procalcitonina y sTREM-1, respectivamente.

- 5 La Figura 10 muestra una curva estándar para un inmunoensayo enzimático para detectar TREM-1 soluble en los sueros de pacientes con septicemia sospechada.

La Figura 11 muestra la cinética de inmunoensayos enzimáticos para detectar TREM-1 soluble (panel A) y el análisis citofluorimétrico de TREM-1-ligando (panel B) en un paciente que tiene SIRS sin infección (HSR34) y en un paciente con septicemia (HSR37).

- 10 La Figura 12 muestra la variación con el transcurso del tiempo de los valores de la mediana de los niveles plasmáticos (con intervalo intercuartil) de sTREM-1 en pacientes supervivientes (cuadrados) y no supervivientes (triángulos) en una serie de 63 pacientes, algunos con septicemia (n=30) y otros con choque séptico (n=33).

La Figura 13 muestra un análisis de Kaplan-Meier de pacientes con sTREM-1 >180 pg/mL (n=32) y <180 pg/mL (n=31). Hubo una diferencia significativa entre las dos curvas (ensayo de rango logarítmico, p<0,01).

- 15 La Figura 14 muestra un análisis de la expresión en la superficie celular de TREM-1 en monocitos de pacientes con septicemia (n=25) y pacientes sin septicemia (n=15) o controles sanos (n=7). Los resultados se expresaron como la intensidad de fluorescencia media (abreviadamente MFI por la expresión *Mean Fluorescence Intensity*). Los valores p respectivos (ensayo t de Student) se representan encima de cada gráfica de dispersión.

- 20 La Figura 15 muestra el análisis de la expresión en la superficie celular de TREM-1 en células polimorfonucleares de pacientes con septicemia (n=25) y pacientes sin septicemia (n=15) o controles sanos (n=7). Los resultados se expresaron intensidad de fluorescencia media (MFI). Los valores p respectivos (ensayo t de Student) se representan encima de cada gráfica de dispersión.

- 25 La Figura 16 muestra TREM-1 el modelo de expresión de monocitos durante el choque séptico de acuerdo con el desenlace. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia media. Los valores de p respectivos se representan encima de los puntos de tiempo. 'La línea base' corresponde a la primera determinación y 'el último valor' a la última determinación de TREM-1 antes del alta de la UCI o la muerte.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Producción de anticuerpos contra el receptor de TREM-1 que son capaces de unirse al sTREM-1

- 30 Se produjeron anticuerpos contra una proteína de fusión del receptor de TREM-1 con la región Fc de IgG humana. Para producir TREM-1-Fc soluble, el fragmento de cDNA que codifica la región extracelular de TREM-1 se amplificó por PCR y se clonó en un vector de expresión que contenía los exones para la bisagra, la región CH2 y CH3 de IgG1 humana (véase Bouchon et al. *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 4991-4995). Explicado brevemente, TREM-1 de 760 pb fue amplificado por RT-PCR, clonado en pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), y secuenciado. Los cebadores usados para la PCR fueron:

- 35 5'-GCTGGTGCACAGGAAGGATG [SEQ ID NO: 3]
3'-GGCTGGAAGTCAGAGGACATT [SEQ ID NO: 4]

El gen quimérico fue transfectado en la línea celular de mieloma de ratón J558L, cribado de líquidos sobrenadantes de cultivo, y la purificación de TREM-1-Fc puede ser realizada luego, como se ha descrito previamente (Traunecker, et al., 1991, *Trends Biotechnol.* 9: 109)).

- 40 Se produjeron anticuerpos monoclonales (mAb) Anti-TREM-1 inmunizando ratones BALB/c con TREM-1-Fc. Explicado brevemente, ratones BALB/c hembras de 10 semanas (Iffa-Credo, L'Arbresle, Francia) recibieron detrás del cuello una inyección inicial de 100 µg de la proteína de fusión TREM-1-Fc, mezclada 1:1 (vol/vol) con Alu-Gel-S (Serva Biochemicals, Paramus, NJ). Cuatro fueron semanas más tarde, recibieron una inmunización de recuerdo con el mismo inmunógeno, seguido después de 2 semanas por una inyección final de 100 µg de TREM-1-Fc purificada. Tres días más tarde, los ratones fueron sacrificados y se aislaron las células de los ganglios linfáticos drenantes y se fusionaron con las compañeras de fusión de mieloma, Ag8.653, usando polietilenglicol 4000. Los líquidos sobrenadantes del hibridoma se cribaron en dos etapas. Primeramente, se realizó un ensayo ELISA usando TREM-1-Fc en la etapa de revestimiento e IgG anti-ratón de cabra marcada con fosfatasa alcalina humana adsorbida como anticuerpo secundario. Los líquidos sobrenadantes de los clones que fueron positivos en el ensayo
50 ELISA se ensayaron luego por análisis FACS® para teñir células por citometría de flujo.

EJEMPLO 2: Detección rápida de la forma soluble de TREM-1 (sTREM) en el diagnóstico de neumonía

Materiales y métodos

Población del estudio

- 55 Antes de la inclusión en el estudio se obtuvo la aprobación por parte del Comité de Revisión de la Institución y el consentimiento informado de los pacientes o de sus parientes. Todos los pacientes de una edad mínima de 18 o mayores estaban hospitalizados en la UCI médica de la Institución donde trabajaban los inventores y fueron

prospectivamente enrolados en el estudio si cumplían los siguientes criterios: 1) necesidad de ventilación mecánica; 2) sospecha clínica de neumonía infecciosa definida por un infiltrado recientemente desarrollado y persistente por radiografía del pecho asociada con al menos una de las siguientes: secreciones traqueales purulentas, temperatura corporal de al menos 38,3°C, y leucocitosis ($>10000/\text{mm}^3$) o leucopenia ($<4000/\text{mm}^3$). La neumonía por ventilación mecánica fue definida por la adquisición de la enfermedad después de 48 horas de ventilación mecánica. Tras el ingreso en la UCI, para cada paciente se registraron los siguientes parámetros: edad; sexo; gravedad del estado médico subyacente estratificada de acuerdo con los criterios de McCabe y Jackson (McCabe WR, Jackson GG. *Arch. Intern. Med.* 1982; 110:847-64); puntuación fisiológica aguda simplificada II (abreviadamente SAPS II por la expresión inglesa *Simplified Acute Physiologic Score II*); Determinación de la insuficiencia de órganos relacionada con la septicemia (abreviadamente SOFA por la expresión inglesa *Septicemia-related Organ Failure Assessment*) puntuación (intervalo, 0 a 24, con puntuaciones para cada sistema de órganos [respiración, coagulación, hígado, cardiovascular, sistema nervioso central y riñón] que variaba desde 0 [normal] a 4 [el más anormal]); y razón del ingreso en la UCI. En el ingreso también se registraron las siguientes variables de la línea base: puntuación SAPS II; puntuación SOFA; temperatura corporal; recuento leucocitario; relación entre la presión parcial de oxígeno arterial y la fracción de oxígeno inspirado ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$); niveles en suero de proteína C reactiva y procalcitonina; presencia de choque, definido como una presión arterial sistólica inferior a 90 mm de Hg con signos de hipoperfusión periférica o necesidad de infusión continua de agentes vasopresores o inotrópicos; duración del episodio previo de ventilación mecánica; y uso de terapia antimicrobiana previa. La puntuación de la infección pulmonar clínica (CPI) se calculó como ha sido descrito previamente por Pugin J, et al. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991;143:1121-9. También se registraron la duración de la ventilación mecánica, de la estancia en la UCI y de la mortalidad en la UCI.

Confirmación del diagnóstico

Los lavados mini-broncoalveolares (BAL) y el proceso de toma de muestras microbiológicas se realizaron como se describe en detalle en Papazian L. et al. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;152:1982-91 y Duffo F et al. *Anesthesiology* 2002;1:74-9. Explicados brevemente, el lavado mini-broncoalveolar se realizó usando *Combicath*, un catéter telescópico taponado estéril, de 50 cm, de una sola vaina (Plastimed, St Leu La Forêt, France). El líquido BAL recuperado (13 ± 3 mL de cada 20 mL o suero de solución salina instilado) se dividió en dos muestras: una se usó para el examen microscópico directo y cultivo cuantitativo; la otra se centrifugó a 10000 revoluciones por minuto durante 30 minutos y el líquido sobrenadante se congeló a -80°C hasta que se usó para las medidas de sTREM-1 y citoquina. La concentración de micro-organismos considerada significativa para el diagnóstico potencial de la neumonía fue $>10^3$ ufc/mL de líquido BAL. El diagnóstico *post hoc* de la neumonía se hizo a partir de una combinación de los criterios clínicos ya mencionados con pruebas microbiológicas de infección microbiana. Estos criterios fueron similares a los usados para la neumonía asociada con ventilación mecánica descritos en el trabajo de Pugin J et al. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991;143:1121-9.

Se consideró que el paciente no tenía neumonía cuando se estableció una causa alternativa para el infiltrado pulmonar y no hubo un crecimiento bacteriano significativo en el cultivo BAL en asociación con la recuperación completa de fiebre, infiltrado y leucocitosis sin terapia antimicrobiana. Dos profesionales de cuidados intensivos revisaron todos los registros médicos pertenecientes al paciente y clasificaron independientemente el diagnóstico como neumonía adquirida en la comunidad, neumonía asociada con ventilación mecánica o sin neumonía. En todos los casos se consiguió un consenso en relación con el diagnóstico. Ambos profesionales de cuidados intensivos no tuvieron acceso a los resultados de los niveles de sTREM-1 y citoquinas.

Valoraciones de sTREM-1 y citoquinas

La determinación de los niveles de sTREM-1 en muestras de líquidos BAL se realizó usando una técnica de inmunotransferencia con 21C7 una IgG1 de muridos monoclonal dirigida con el TREM-1 humano preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1. Explicado brevemente, 100 μL o cada líquido sobrenadante BAL se aplicó como mancha a una membrana de nitrocelulosa, se secó, y se revistió por la parte superior con solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con seroalbúmina bovina al 3%. La hoja de nitrocelulosa se incubó luego durante 60 minutos en presencia de 21C7 diluido 1:2000. Después de un lavado exhaustivo, la hoja fue incubada adicionalmente durante 60 minutos con inmunoglobulinas anti-ratón de cabra diluidas 1:1000 (Dako, Glostrup, Dinamarca), se lavó en PBS suplementada con dimetilsulfóxido al 20% y se incubó durante 30 minutos con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano silvestre diluida 1:1000 (Bio-Rad, Cergy, Francia). Luego se añadió el sustrato enzimático cromógeno Opti-4CN (Bio-Rad) y se desarrolló color en proporción a la cantidad de sTREM-1 unida a la membrana. Cada hoja contenía también muestras de calibrado de una concentración conocida de sTREM-1 (0 a 200 pg/mL). La determinación colorimétrica se consiguió por medio de un escáner de reflectancia y el programa informático *Quantity One Quantitation* (Bio-Rad). La concentración de sTREM-1 de cada muestra se determinó comparando las densidades ópticas de las muestras con la curva estándar. Todas las medidas se realizaron por duplicado y los resultados se expresan como la concentración media en picogramos por mililitro de líquido de lavado broncoalveolar. La sensibilidad de esta técnica permite la detección de un nivel de sTREM-1 tan bajo como 5 pg/mL y el método completo lleva menos de 3 horas. El coeficiente de variación de la valoración fue inferior al 5 por ciento. Se determinaron el factor de necrosis tumoral- α y la interleuquina-1 β en el líquido BAL por un método ELISA en fase sólida de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia). La sensibilidad de la técnica permite la detección de niveles tan bajos como 2 pg/mL para el factor de necrosis tumoral- α y 3,9 pg/mL para la interleuquina-1 β .

Análisis estadístico

Los resultados descriptivos de variables continuas se expresaron como el valor medio ($\pm$ DT). Los resultados de sTREM-1 en BAL y los niveles de citoquinas se expresaron como el valor medio ($\pm$ DT). Las variables fueron analizadas por su asociación con el diagnóstico que usa el ensayo χ^2 de Pearson para los datos de categorías y el ensayo U de Mann-Whitney U para los datos numéricos. La comparación entre los diferentes grupos se realizó por el ensayo U de Mann-Whitney U (o cuando sea apropiado el ensayo de Kruskal-Wallis no paramétrico) para los datos numéricos y usando el ensayo χ^2 de Pearson para los datos de categorías. Las relaciones entre sTREM-1 y las características clínicas o biológicas se determinaron usando el ensayo de correlación de Spearman. Para evaluar el valor de la presencia de sTREM-1 en líquido BAL, los inventores usaron un modelo de regresión logístico de múltiples etapas con el uso del valor P 0,05 o menos para entrar en el modelo. Los predictores incluyeron hallazgos clínicos y de laboratorio junto con información sobre la presencia de sTREM-1 en líquido BAL. Se construyeron curvas de eficacia diagnóstica (RCO) para ilustrar los diversos valores umbrales de sTREM-1, factor de necrosis tumoral- α e interleuquina-1 β . El análisis se completó con el programa informático *Statview* (Abacus Concepts, Berkeley CA y una P<0,05 de dos colas se consideró significativa.

Resultados

Fueron ingresados 1097 pacientes en la UCI. Fueron enrolados todos los 148 pacientes que cumplían los criterios de inclusión. En la Tabla 2 siguiente se muestran las características de la línea base del grupo de estudio global.

Tabla 2: Características de la población estudiada

Características	Todos los pacientes (n=148)	Neumonía adquirida en la comunidad (n=38)	Neumonía asociada con respirador (n=46)	Sin neumonía (n=64)	Valor de P
Edad, años ($\pm$ DT).....	60 $\pm$ 15	58 $\pm$ 17	59 $\pm$ 14	62 $\pm$ 14	0,53
Sexo, n (%)					
Varones.....	95 (64)	24 (63)	29 (63)	42 (66)	
Hembras.....	53 (36)	14 (37)	17 (37)	22 (34)	0,97
Puntuación de McCabe valor medio ($\pm$ DT).....	1,85 $\pm$ 0,95	1,77 $\pm$ 0,92	1,81 $\pm$ 0,92	1,88 $\pm$ 0,91	0,79
Historial de COPD*, n (%)	39 (26)	9 (23)	12 (26)	18 (28)	0,93
Puntuación de SAPS II $\dagger$, valor medio ($\pm$ DT).....	52 $\pm$ 17	53 $\pm$ 20	50 $\pm$ 15	53 $\pm$ 17	0,76
Puntuación SOFA $\S$ *, mean ($\pm$ DT).....	7,8 $\pm$ 3,9	8,5 $\pm$ 4,4	7,0 $\pm$ 3,5	8,1 $\pm$ 4,0	0,43
Razón de la admisión n (%)	42 (28,3)	23 (61)	4 (9)	15 (24)	0,002
Insuficiencia respiratoria aguda					
Neurológica	41 (27,7)	7 (18)	15 (33)	19 (30)	0,45
Choque	37 (25)	6 (16)	16 (35)	15 (23)	0,18
Diversa	28 (19)	2 (5)	11 (24)	15 (23)	0,08
Duración de la ventilación mecánica, días ($\pm$ DT).....	14 $\pm$ 12	8 $\pm$ 7	21 $\pm$ 19	11 $\pm$ 9	<0,001
Duración de estancia en la UCI, días ($\pm$ DT).....	18 $\pm$ 15	11 $\pm$ 8	26 $\pm$ 21	15 $\pm$ 9	<0,001
Mortalidad, n (%).....	50 (34)	11 (29)	19 (41)	20 (31)	0,58

*COPD: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
 $\dagger$ SAPS II: Puntuación fisiológica aguda simplificada II
 $\S$ SOFA: Determinación de insuficiencia de órganos relacionada con la septicemia
 Los valores de P son de comparaciones entre grupos CAP, VAP NP; DT = desviación típica

La mayoría de los pacientes tuvo una co-morbilidad asociada y 38 (26 por ciento) tuvieron un historial de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Las puntuaciones media s ($\pm$ DT) SAPSII y SOFA fueron 52 ($\pm$ 17) y 7,8 ($\pm$ 3,9) respectivamente. La tasa de mortalidad en la UCI fue 34 por ciento de acuerdo con el riesgo predicho de muerte basado en la puntuación SAPS II (Le Gall JR et al. *JAMA* 1993;270:2957-63). El diagnóstico se estableció como neumonía adquirida en la comunidad (CAP) en 38 pacientes (26 por ciento), neumonía asociada con ventilación mecánica (VAP) en 46 pacientes (31 por ciento) y sin neumonía (NP) en 64 pacientes (43 por ciento). Entre los del grupo NP, los diagnósticos fueron establecidos como sigue: Exacerbación aguda de EPOC (n=11); Síndrome de malestar respiratorio agudo (abreviadamente ARDS por la expresión inglesa *Acute Respiratory Distress Syndrome*) de origen extra-pulmonar (septicemia abdominal o uro-genital: n=19; pancreatitis: n=6; otros: n=4); ARDS de origen pulmonar (casi-ahogo: n=1; inhalación de humo de fuego: n=1); choque cardiogénico n=12) y desconocido (n=10). Las características clínicas de los tres grupos no diferían significativamente en el ingreso (Tabla 1). Los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad fueron denominados frecuentemente como si la hubieran adquirido en la UCI con más insuficiencia respiratoria aguda que otros (P=0,002). Como era de esperar la duración

de la ventilación mecánica y la duración de la estancia en la UCI fueron superiores entre los pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica ($P<0,001$). La mortalidad no difirió entre los tres grupos. Una puntuación de la infección pulmonar clínica (CPIS) >6 fue más frecuente en los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad que en los pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica ($P=0,02$). La temperatura corporal, el recuento leucocitario, la relación entre la presión del oxígeno arterial y la fracción del oxígeno inspirado ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), los niveles de proteína C reactiva (CRP) y de procalcitonina en suero no difirieron en los tres grupos (Tabla 3).

Las especies microbianas crecieron a una concentración significativa a partir de BAL ($>10^3$ UFC/mL) de todos los pacientes, con neumonía adquirida en la comunidad, excepto 2 infectados con *Legionella pneumophila* de todos los pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 3. Características de los 3 grupos de pacientes en el ingreso

Característica	Neumonía adquirida en la comunidad (n=38)	Neumonía asociada con respirador (n=46)	Sin neumonía (n=64)	Valor de P
Duración de la ventilación mecánica antes de la entrada en el estudio, días ($\pm$ DT).....	0,4 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 8,5	2,1 $\pm$ 4,8	<0,001
Terapia antimicrobiana previa, n(%).....	33 (87)	19 (41)	30 (47)	<0,001
Choque, n(%).....	18 (47)	19 (41)	30 (47)	0,49
Temperatura corporal, °C ($\pm$ DT)	37,9 $\pm$ 2,0	38,1 $\pm$ 0,9	37,7 $\pm$ 1,1	0,82
Recuento leucocitario, células/mm ³ ($\pm$ DT).....	12800 $\pm$ 7900	13400 $\pm$ 8500	12500 $\pm$ 5800	0,99
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, mm de Hg ($\pm$ DT)...	181 $\pm$ 80	203 $\pm$ 67	206 $\pm$ 91	0,51
CPIS [†] >6 , n(%).....	23 (60)	28 (61)	22 (34)	0,02
Procalcitonina, ng/mL ($\pm$ DT)...	3,7 $\pm$ 1,9	2,6 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 1,2	0,58
Proteína C reactiva, mg/L ($\pm$ DT)	197 $\pm$ 128	184 $\pm$ 108	141 $\pm$ 110	0,34
TNF α en líquido BAL $\S$, pg/mL ($\pm$ DT).....	298,2 $\pm$ 47,7	290,5 $\pm$ 39,7	147,2 $\pm$ 25,1	<0,001
IL-1 β en líquido BAL $\S$, μ g/mL ($\pm$ DT).....	92,5 $\pm$ 22,5	95,1 $\pm$ 29,4	41,5 $\pm$ 12,5	<0,001
sTREM-1 en líquido BAL $\S$, μ g/mL ($\pm$ DT)	23,2 $\pm$ 2,8	33,6 $\pm$ 5,1	1,8 $\pm$ 0,9	<0,001

* $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$: Relación entre la presión parcial del oxígeno arterial y la fracción de oxígeno inspirado.
[†]CPIS: Puntuación de la infección pulmonar crítica
 $\S$ BAL: lavado broncoalveolar
P values are comparisons entre CAP, VAP and NP groups

Tabla 4: Aspectos y organismos asociados con la neumonía

Aspecto u organismo	Neumonía adquirida en la comunidad (n=38)	Neumonía asociada con respirador (n=46)
Neumonía monomicrobiana, n (%)	36 (95)	37 (80)
Neumonía polimicrobiana, n (%)	2 (5)	9 (20)
Número total de patógenos*, n	40	58
Bacilos, n(%)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 (25)	12 (20,7)
<i>Haemophilus influenzae</i>		10 (17,2)
<i>Acinetobacter baumannii</i>		4 (6,9)
<i>Serratia marcescens</i>		6 (10,3)
<i>Klebsiella species</i>	1 (2,5)	6 (10,3)
<i>Legionella pneumophila</i>	3 (7,5)	2 (3,4)
Diversos	2 (5)	3 (5,2)
Cocos n(%)		
<i>Streptococcus aureus</i>	4 (10)	14 (24,1)
<i>Streptococcus species</i>	1 (2,5)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	17 (42,5)	1 (1,7)
Hongos	2 (5)	3 (5,2)

*Los organismos mostrados fueron los que fueron aislados a concentraciones significativas de cultivos cuantitativos de líquido de lavado broncoalveolar ($>10^3$ unidades formadoras de colonias/mL). La infección por *Legionella pneumophila* fue diagnosticada por la detección del antígeno urinario soluble.

Niveles de sTREM-1, Factor de necrosis tumoral- α e interleuquina-1 β

Los niveles de sTREM-1 fueron superiores en el líquido BAL de los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad y los con neumonía asociada a ventilación mecánica que en el de los pacientes sin neumonía ($P < 0,001$) pero no diferían significativamente entre los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad y la asociada con ventilación mecánica (Figura 3). Los niveles de factor de necrosis tumoral- α e interleuquina-1 β mostraron la misma tendencia ($P < 0,001$) pero con un gran solapamiento de valores. Entre los pacientes con neumonía, hubo una tendencia ($P = 0,07$) hacia niveles superiores de sTREM-1 en no supervivientes que en supervivientes con $31,2 \pm 5,7$ pg/mL y $24,9 \pm 3,0$ pg/mL respectivamente. No hubo correlación entre los niveles de sTREM-1 y el historial previo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cantidad de células inflamatorias en el líquido BAL, especies microbianas u otras características clínicas y biológicas.

Valor en diagnóstico de la valoración de sTREM-1

Los inventores determinaron luego si la presencia de sTREM-1 en el líquido de lavado broncoalveolar podía discriminar entre presencia y ausencia de neumonía. Puesto que no hubo diferencia entre pacientes con la neumonía adquirida en la comunidad y la asociada con ventilación mecánica se presentan los datos reunidos para los siguientes análisis. Cualquiera que sea el nivel de 5 pg/mL o superior, se detectó sTREM-1 en líquido BAL entre 36 de 38 pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (sensibilidad: 95 por ciento, 2 falsos negativos), 46 de 46 pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica (sensibilidad: 100 por ciento) y en 6 de 64 pacientes sin neumonía (6 falsos positivos). Por tanto, entre la población completa de pacientes, la presencia de sTREM-1 en líquido BAL está asociada con una relación de probabilidad de 10,38. La capacidad de sTREM-1 de diferenciar la neumonía de la ausencia de neumonía fue determinada por análisis de la curva ROC (Figura 4). El área bajo la curva ROC cuando se usó sTREM 1 para diferenciar neumonía de ausencia de neumonía fue 0,93 (IC de 95 por ciento 0,92 a 0,95, $P < 0,001$). Un valor umbral de sTREM 1 de 5 pg/mL (que representó los umbrales técnicos de detección) tuvo una sensibilidad de 98 por ciento (IC de 91 por ciento, 95 a 100) una especificidad de 90 por ciento (IC de 95 por ciento, 84 a 96). En un análisis de regresión logística múltiple los inventores determinamos que la presencia de sTREM-1 en líquido BAL fue el predictor independiente más potente de neumonía con una relación de probabilidad de 41,52 (Tabla 5). El mejor predictor clínico de neumonía fue una puntuación de infección pulmonar clínica de > 6 (relación de probabilidad: 2.98).

Tabla 5. Análisis de regresión logística múltiple de los factores usados para diferenciar entre pacientes con y sin neumonía

PREDICTOR	Valor de P	RELACIÓN DE PROBABILIDAD (Intervalo de confianza del 95%)
CPIS > 6	0,002	2,98 (1,51 to 5,86)
TNF α en BAL > 150 pg/mL	0,004	2,44 (1,82 a 5,75)
IL-1 β en BAL > 75 pg/mL	0,003	2,70 (1,97 a 13,18)
sTREM-1 en BAL > 5 pg/mL	$< 0,001$	41,52 (20,90 a 77,62)

*CPIS: puntuación de la infección pulmonar clínica

Estos resultados demuestran que la rápida detección del sTREM-1 en el líquido de lavado broncoalveolar mejora la capacidad de los profesionales clínicos en diferenciar pacientes con neumonía bacteriana o fúngica de los sin neumonía. Esto debe ser especialmente útil entre los pacientes cuyo diagnóstico no es clínicamente sencillo. La técnica de la inmunotransferencia es rápida, precisa, de muy bajo coste y puede ser aplicada a pequeñas series o incluso a muestras individuales. El uso de este ensayo para demostrar la presencia de sTREM-1 en el líquido de lavado broncoalveolar conducirá a más diagnósticos precisos de neumonía en pacientes con ventilación mecánica. La documentación microbiológica se obtuvo en todos los casos de neumonía adquirida en la comunidad y la asociada con ventilación mecánica. Cuando se consideró que estaba ausente la neumonía se estableció una alternativa no infecciosa para el infiltrado pulmonar o que los pacientes estaban completamente recuperados de fiebre, infiltrado, y leucocitosis sin terapia antimicrobiana. Sin embargo, los inventores no pudimos excluir que algunos pacientes con una neumonía asociada con ventilación mecánica verdadera hubiera poder sido clasificada en el grupo de sin neumonía y haberse recuperado espontáneamente. Esto podría haber disminuido artificialmente la especificidad del ensayo y puede haber sido responsable de los 6 falsos positivos en el grupo sin neumonía. Finalmente, y sin desear vincularse a ninguna teoría, ninguno de los pacientes analizados presentó una neumonía viral y por tanto, los resultados no son generalizables a las infecciones virales.

EJEMPLO 3: Valor en diagnóstico de los niveles plasmáticos de la forma soluble del receptor desencadenante expresado en células mieloides (TREM)-1 en pacientes críticamente enfermos sospechosos de padecer septicemia

Materiales y métodos

Población del estudio

Todos los pacientes consecutivos recientemente hospitalizados en la UCI médica de un hospital docente en Francia fueron enrolados prospectivamente en el estudio si tenían una infección clínicamente sospechada y cumplían al menos dos criterios de SIRS (Bone RC, et al. *Chest*. 1992;101:1644-55.). La infección clínicamente sospechada fue definida como una declaración explícita por el médico de primera atención indicando la sospecha de una infección

en curso, combinada con la iniciación de un trabajo de diagnóstico para identificar o descartar la infección y la prescripción de terapia antimicrobiana. Los pacientes no fueron enrolados si eran mayores de 80 años o estuvieran inmunocomprometidos (tratamiento con corticosteroides, receptores de trasplante de médula ósea u órganos, leucopenia [recuento de linfocitos < 1 G/L] o neutropenia [recuento de granulocitos polimorfonucleares <0,5 G/L], malignidad hematológica o síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Fueron excluidos también los pacientes que presentaron muerte prematura o alta (en las 12 horas después del ingreso) o ausencia completa de tratamiento antimicrobiano. Los pacientes originados en la sala de urgencias, las salas generales, o desde quirófanos. Antes del ingreso se obtuvieron la aprobación del comité de revisión institucional y el consentimiento informado de los pacientes o sus parientes.

10 *Recogida de datos*

Tras el ingreso en la UCI, se registraron los siguientes parámetros para cada paciente: edad; sexo; gravedad del estado médico subyacente estratificado de acuerdo con los criterios de McCabe and Jackson (*Arch Intern Med.* 1982; 110:847-64); puntuación de sicología aguda simplificada II (SAPSII) (Le Gall JR et al. *JAMA.* 1993; 270:2957-63); determinación de insuficiencia orgánica relacionada con septicemia.

La puntuación SOFA (intervalo 0 a 24, con puntuaciones para cada sistema de órganos [respiración, coagulación, hígado, cardiovascular, sistema nervioso central y riñón] que varía desde 0 [normal] a 4 [lo más anormal]) (Vincent JL et al. *Intensive Care Med.* 1996;22:707-10); razón para el ingreso en la UCI; diagnóstico principal; signos vitales; parámetros respiratorios; ensayos habituales de sangre y resultados de cultivos microbiológicos. Se determinó la supervivencia o muerte en la UCI durante un periodo de seguimiento tan largo como 28 días. Los ensayos microbiológicos y la terapia antimicrobiana fueron prescritos por el médico de primera atención de acuerdo con la práctica usual de la UCI sin interferencia con el equipo de investigadores. Dos facultativos de cuidados intensivos revisaron retrospectivamente todos los registros médicos pertenecientes a cada paciente e independientemente clasificaron el diagnóstico como SIRS, septicemia, septicemia grave o choque séptico en el momento del ingreso, de acuerdo para establecer las definiciones de consenso (Bone RC, et al. *Chest.* 1992; 101:1644-55). En todos los casos se consiguió el acuerdo referente al diagnóstico. Ambos facultativos de cuidados intensivos desconocían los resultados de los valores de sTREM-1 plasmático.

Medidas de niveles plasmáticos de procalcitonina y sTREM-1

En las 12 horas posteriores al ingreso y enrolamiento en el estudio, se extrajeron 5 mL de sangre completa heparinizada vía una línea arterial para las determinaciones de PCT y sTREM-1. El plasma se recogió por centrifugación a 4°C, se fraccionó en partes alícuotas, y se conservó a -80°C hasta el día de la valoración. Las concentraciones de PCT plasmáticas se midieron usando un inmunoensayo con una técnica sándwich y un sistema de detección por quimioluminiscencia, de acuerdo con el protocolo del fabricante (LumiTest; Brahms Diagnostica, Berlín, Alemania). La determinación de los niveles de sTREM-1 plasmático se realizó como se describe en el Ejemplo 2. Explicado brevemente, 100 µL de cada muestra de plasma se aplicó como mancha sobre una membrana de nitrocelulosa, se secó y se recubrió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con seroalbúmina bovina al 3%. La hoja de nitrocelulosa se incubó luego durante 60 minutos en presencia del anticuerpo monoclonal anti-TREM-1 21C7, una IgG₁ de muridos dirigida contra el TREM-1 humano, preparada como se describe en el Ejemplo 1.

Después de un lavado a fondo, la hoja se incubó adicionalmente durante 60 minutos con inmunoglobulinas anti-ratón de cabra diluida 1:1000 (Dako, Glostrup, Dinamarca), se lavó en PBS suplementada con dimetilsulfóxido al 20% y se incubó durante 30 minutos con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano silvestre diluida 1:1000 (Bio-Rad, Cergy, Francia). Luego se añadió el sustrato cromógeno enzimático Opti-4CN (Bio-Rad) y se desarrolló color en proporción a la cantidad de sTREM-1 unido a la membrana. Cada hoja contenía también muestras de calibrado de una concentración conocida de sTREM-1 (0 a 5000 ng/mL). La determinación colorimétrica se consiguió por medio de un escáner de reflectancia y el programa informático *Quantity One Quantitation* (Bio-Rad). La concentración de sTREM-1 de cada muestra se determinó representando gráficamente las densidades ópticas de las muestras en la curva estándar. Todas las medidas se realizaron por duplicado y los resultados expresados como concentración media en nanogramos por mL de plasma. La sensibilidad de esta técnica permite la detección de niveles de sTREM-1 tan bajos como 5 ng/mL y el método completo lleva menos de 3 horas. El coeficiente de variación de la valoración fue inferior al 5 por ciento.

Análisis estadístico

Los resultados descriptivos de variables continuas se expresaron como el valor medio ($\pm$ DT). Los resultados de los niveles de sTREM-1 y PCT plasmáticos se expresaron como el valor medio ($\pm$ DT). Se analizaron las variables por su asociación con el diagnóstico usando el ensayo χ^2 de Pearson para los datos de categorías y el ensayo U de Mann-Whitney para los datos numéricos. La comparación entre los diferentes grupos se realizó usando el ensayo U de Mann-Whitney (o el ensayo de Kruskal-Wallis no paramétrico cuando sea apropiado) para los datos numéricos y usando el ensayo χ^2 de Pearson para los datos de categoría. Las relaciones entre sTREM-1 y las características clínicas o biológicas se determinaron usando el ensayo de correlación de Spearman. Para evaluar el valor de las valoraciones de los niveles de sTREM-1 plasmático, los inventores usaron un modelo de regresión logística en etapas múltiples. Los predictores incluían hallazgos clínicos y de laboratorio junto con información con el nivel de sTREM-1 plasmático. Para el fin del análisis de regresión logística, que requiere eventos de desenlaces binarios, los

sujetos clasificados con septicemia confirmada, septicemia grave o choque séptico (síndrome de septicemia) fueron comparados con los pacientes con SIRS y sospecha inicial de infección. Las curvas de eficacia diagnóstica (ROC) fueron construidas para ilustrar diversos valores umbrales de sTREM-1, PCT y CRP. La sensibilidad, especificidad y los valores predictivos y negativos de cada parámetro fueron calculados de acuerdo con métodos estándares. Estos valores fueron calculados para el umbral que representaba la mejor discriminación como derivadas de las áreas bajo las curvas ROC. El análisis fue completado con el programa informático *Statview* (Abacus Concepts, Berkeley CA) y una $P < 0,05$ de dos colas fue considerada significativa.

RESULTADOS

Características de la población del estudio

En la UCI fueron ingresados 98 pacientes con sospecha clínica de infección, de los cuales 22 no fueron incluidos en el estudio debido a muerte prematura, estado inmunocomprometido, edad mayor de 80 años, ausencia de consentimiento o violación del protocolo (Figura 6). Las características de la línea base del grupo de estudio global se muestran en la Tabla 6. Los valores de las puntuaciones medias ($\pm$ DT) SAPS II y SOFA fueron 50,5 ($\pm$ 22,6) y 8,3 ($\pm$ 4,5) respectivamente. La tasa de mortalidad en la UCI de 26,3 % estaba de acuerdo con el riesgo predictivo de muerte basado en la puntuación SAPS II. El diagnóstico se estableció como SIRS en 29 pacientes (38 %), septicemia o septicemia grave (agrupados como 'Septicemia') en 22 pacientes (29 %) y choque séptico en 25 pacientes (33 %). Los estados causantes de SIRS fueron como sigue: cirugía cardíaca (n=6); choque cardiogénico (n=5); exacerbación aguda de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (n=5); pancreatitis aguda (n=3); choque térmico (n=3); hemorragia gastrointestinal (n=2); trauma (n=1) y desconocido (n=4). Las características clínicas no difirieron significativamente en la inclusión entre pacientes con septicemia y sin septicemia (Tabla 6). Las infecciones fueron microbiológicamente demostradas en 40 de 49 pacientes infectados (82 %) con 55 % por bacterias Gram-negativas, 42 por Gram-positivas y 3 % por infecciones fúngicas. Las principales fuentes de infección fueron las vías respiratorias (55 %) y el abdomen (22 %). Veinticuatro por ciento de los pacientes infectados tuvieron una infección documentada en el torrente sanguíneo. Ni el sitio de la infección ni las cepas microbianas diferían entre pacientes supervivientes y no supervivientes (Tabla 7).

Tabla 6. Datos clínicos y biológicos en ingreso y el desenlace de los pacientes.

Característica	Total (n=76)	Pacientes con septicemia (47)	Pacientes sin septicemia (n=29)	Valor de P
Edad, años.....	60 (15)	61 (14)	59 (15)	0,55
Sexo [†]				
Varones.....	54 (71)	37 (79)	17 (59)	0,06
Hembras.....	22 (29)	10 (21)	12 (41)	
McCabe.....	1,3 (0,8)	1,3 (0,8)	1,3 (0,9)	0,57
Puntuación de fisiología aguda simplificada II.....	50,5 (22,6)	52,6 (23,8)	46,5 (20,5)	0,65
Puntuación SOFA	8,3 (4,5)	9,7 (4,8)	5,8 (2,6)	0,38
Temperatura, °C	37,9 (1,0)	37,9 (1,1)	37,9 (1,0)	0,38
Leucocitos, g/L.....	14,4 (7,6)	14,4 (8,2)	13,9 (3,8)	0,61
Proteína C-Reactiva, mg/L	154,1 (142,8)	203,9 (147,7)	62,7 (65,3)	0,002
Procalcitonina, ng/mL.....	20,9 (44,3)	31,4 (52,4)	1,1(2,2)	<0,001
sTREM-1, ng/mL.....	1121 (953)	1611 (826)	229 (341)	<0,001
Duración de la estancia en la UVI en días	6,4 (7,9)	6,4 (5,3)	6,3 (11,5)	0,37
Tasa de mortalidad [†]	20 (26,3)	15 (31,9)	5 (17,2)	0,16

*Los valores se expresan como la media (DT) salvo indicación contraria. Los valores de P son para la comparación de pacientes con septicemia vs. sin septicemia.

†Los valores se expresan en números (porcentajes)

Table 7. Pacientes con septicemia: Sitios de la infección y cepas al comienzo de la septicemia de acuerdo con el desenlace

	Total (n=49)	Supervivientes (n=34)	No supervivientes (n=15)	Valor de P*
Pacientes que tuvieron documentación microbiana positiva de infección.....	40(82)	28 (82)	12 (80)	0,96
Pacientes que tuvieron cultivo sanguíneo positivo.....	12 (24)	7 (21)	5 (33)	0,54
Sitio de la infección	27 (55)	18 (53)	9 (60)	0,67
Pulmón.....	11 (22)	6 (18)	5 (33)	0,53
Abdominal	5 (11)	5 (15)	0 (0)	0,26
Génito-urinario.....	3 (6)	2 (6)	1 (7)	0,97
Celulitis.....	3 (6)	3 (8)	0 (0)	0,22
Otros.....	N=40	N=28	N=12	
Microorganismos	17 (42)	12 (43)	5 (42)	0,61
Gram-positivos.....	22 (55)	16 (57)	6 (50)	0,64
Gram-negativos.....	1(3)	0(0)	1(8)	0,21

*Los valores de P son para comparación entre supervivientes vs no supervivientes

5 Niveles plasmáticos en la línea base de CRP, PCT y sTREM- 1

Los niveles plasmáticos en la línea base de CRP, PCT y sTREM-1 fueron superiores entre los pacientes con septicemia que entre los sujetos con solamente SIRS (Tabla 6, Figura 7). Los niveles plasmáticos de sTREM-1 parecieron ser más útiles en diferenciar pacientes con septicemia de los que tenían SIRS. Los niveles plasmáticos medios de sTREM-1 en el ingreso fueron 229 ng/mL para SIRS; 1836 ng/mL para septicemia y 1413 ng/mL para choque séptico (P<0,001). La precisión de los parámetros candidatos para distinguir pacientes con SIRS de los estados con choque séptico fue altamente variable (Tabla 8). Como se muestra en la Figura 8, los niveles de sTREM-1 plasmático proporcionaron el valor discriminador más alto en el área bajo la curva (AUC) ROC de 0,97 intervalo de confianza [IC] del (95 %, 0,94 a 1,0) seguido por PCT (AUC, 0,85; IC, 0,81 a 0,89) y CRP (AUC, 0,77; IC, 0,69 a 0,85; p<0,001). A un umbral de 600 ng/mL, el sTREM-1 proporcionó una sensibilidad de 96 % (95 % IC, 0,92 a 100 %) y una especificidad de 89 % (IC, 82 a 95 %) para diferenciar pacientes con SIRS de los que tenían septicemia o choque séptico. No hubo correlación entre los niveles de sTREM-1 y los niveles de CRP o PCT, especies microbianas o cualesquiera otras características clínicas y biológicas.

Table 8. Comportamiento del diagnóstico de diferentes predictores de septicemia.

	sTREM-1	Procalcitonina	Proteína C-Reactiva
Valor umbral*.....	600 ng/mL	0,6 ng/mL	70 mg/L
Sensibilidad, %.....	96	84	76
Especificidad, %	89	70	67
Valor predictivo positivo, %	94	84	80
Valor predictivo negativo, %.....	92	70	60
Relación de probabilidad.....	8,6	2,8	2,2
Área bajo la curva operativa del receptor.....	0,97	0,85	0,77
(Intervalo de confianza del 95%)	(0,94-1,0)	(0,81-0,89)	(0,69-0,85)

*Los valores de la sensibilidad, especificidad y predictivos fueron calculados para el umbral que representó la mejor discriminación como se deriva de las curvas de características operativas del

20 Significado clínico de los niveles plasmáticos de sTREM-1

Con el fin de investigar el comportamiento del diagnóstico de niveles de sTREM-1 plasmático desde una perspectiva clínica, los inventores realizaron un análisis en etapas múltiples que incluían niveles de CRP, PCT y sTREM-1. El nivel de sTREM-1 plasmático se encontró que era el predictor independiente más potente de infección con relación de probabilidad ajustada (abreviadamente AOR por la expresión inglesa *Adjusted Odds Ratio*) de 9,58 (95 % CI, 2,31 a 38,90, P=0,002) (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de regresión logística multivariante*.

Variable	Coefficiente de regresión	SE	Relación de probabilidades (Intervalo de confianza del 95%)	Valor de P
Intercepción.....	-6,25	2,13	NA	0,003
Proteína C-Reactiva, mg/L	0,17	0,09	1,46 (0,79-2,69)	0,23
Procalcitonina, ng/mL.....	0,24	0,19	3,83 (1,00-14,66)	0,05
sTREM-1, ng/mL.....	0,52	0,16	9,58 (2,31-38,90)	0,002

*Resultados de los métodos de selección por etapas. Las otras variables entradas en el modelo fueron la puntuación de fisiología aguda simplificada II, la puntuación de la determinación de insuficiencia de órganos relacionada con la septicemia, el recuento de leucocitos y la temperatura corporal. NA indica no aplicable.

Gravedad de la septicemia y desenlace

Los inventores evaluaron además los niveles de sTREM-1 plasmático en relación con el pronóstico del paciente. Los valores de CRP, PCT sTREM-1 plasmáticos en pacientes infectados en el momento del ingreso, en relación con el desenlace se muestran en la Figura 9. El parámetro más discriminativo para predecir entre los pacientes infectados en el momento del ingreso fue un nivel de sTREM-1 plasmático inferior a 1500 ng/mL (relación de probabilidad, 6,6; CI del 95 por ciento 4,5 a 20,0, P=0,03). El estudio de los inventores tiene varios puntos fuertes. La población del estudio era grande y comprendía un grupo diverso de pacientes adultos críticamente enfermos ingresados en una UCI médica en diversas fases de estados infecciosos y no infecciosos, que permitió una generalización de los hallazgos del estudio. El diagnóstico fue hecho por investigadores que desconocían los niveles de sTREM-1 plasmático y los pacientes fueron clasificados por tener SIRS de origen no infeccioso después de la incorporación de todos los otros datos clínicos y de laboratorio disponibles (Bone RC, et al. *Chest*. 1992;101:1644-55.). Finalmente, el estudio de los inventores fue diseñado como un estudio de la vida real, que no incluía pacientes de control sin infección sospechada, sino solamente pacientes con una alta probabilidad de septicemia por análisis previo, abarcando el espectro de pacientes que probablemente se encuentren en el uso futuro de este ensayo.

Ejemplo 4: Uso de un ensayo inmunoenzimático para detectar TREM-1 soluble en los sueros de pacientes con septicemia sospechada

Se ha diseñado por los inventores un método basado en ELISA para la detección de TREM-1 soluble humano con aplicaciones en el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica, en particular septicemia.

En un ejemplo, el método es como sigue

Materiales:

Placa: Nunc Maxisorp de 96 pocillos

Tampón de revestimiento: carbonato pH 9,6: Na₂CO₃ 0,015 M (0,794 g en 500 ml de H₂O), NaHCO₃ 0,035 M (1,47 g en 500 ml de H₂O)

Tampón de lavado: Tween 20 al 0,1 % en PBS, pH 7,4.

Tampón de valoración: PBS + BSA al 0,2%

Solución de bloqueo: PBS + BSA al 3%

Solución del sustrato: citrato potásico 30 mM, pH 4,1, inmediatamente antes de su uso, añádase 1 comprimido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma N° T-3405) para 10 ml de tampón y añádanse 2,5 µL de H₂O₂ al 30%.

Método:

a) Revestir: 100 µL/pocillo de anticuerpo TREM-1 anti-humano (Polyclonal R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EE.UU. N° AF1278) (1:1000), [C_{madre}: 100 µg/mL-[C_{final}]: 100 ng/mL) diluido en tampón de revestimiento a pH 9,6.

b) Sellar la placa e incubar durante la noche a +4°C.

c) Lavar 3 veces con tampón de lavado.

d) Bloquear las placas añadiendo 200 µL de solución de bloqueo.

e) Incubar a 37°C durante 1 hora o 2 horas a temperatura ambiente.

f) Desechar el líquido sobrenadante y cultivar en placa 100 µL de patrones y muestras diluidos en tampón de valoración.

g) Sellar las placas e incubar durante la noche a +4°C o 2 horas a 37°C.

h) Lavar 6 veces con tampón de lavado.

i) Añadir 100 µL de anticuerpo TREM-1 anti-humano (clon 21C7) diluido en tampón de valoración, 1:1000

[C_{madre}]: 1 mg/mL - [C_{final}] 1 µg/mL.

j) Incubar 2 horas a temperatura ambiente.

k) Lavar 6 veces con tampón de lavado.

l) Añadir 100 µL de HRP conjugada con IgG anti-ratón de cabra (Pierce N° 31430) diluida 1:5000 en tampón de valoración.

m) Sellar la placa e incubar 2 horas a temperatura ambiente.

n) Lavar 6 veces con tampón de lavado.

o) Añadir 100 µL de solución de sustrato a cada pocillo.

p) Incubar a temperatura ambiente.

q) Detener la reacción con H₂SO₄ 1M 50 µL/pocillo.

r) Determinar la densidad óptica de cada pocillo usando un lector de microtitulación a 450 nm

Resultados

Los resultados para las muestras de dos pacientes dentro de un estudio en curso valorados usando el método descrito anteriormente se muestran en la Tabla 10:

Tabla 10:	
HSR34 EN SUERO (ng/mL)	
34/0	0,3364
34/1	0,8662
34/2	1,4172
34/3	1,5655
34/4	1,7139
34/5	0,8662
34/6	0,6543
34/7	0,5907
HSR37 EN SUERO (ng/mL)	
37/0	3,9602
37/1	26,063
37/2	26,296
37/3	14,132
37/4	6,1853
37/5	2,5191
37/6	2,0741
37/7	ND

Los pacientes de los que se sospechaba que tenían septicemia fueron sometidos a análisis en diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). El tiempo 0 representa el día del ingreso en la unidad de cuidados intensivos. Las muestras se obtuvieron cada 48 horas hasta el día 15.

Este ejemplo demuestra que en los pacientes con septicemia (HSR37) el TREM-1 soluble se detectó a niveles bajos (3,96 ng/mL) en el momento del ingreso en la UCI y alcanzó su máximo nivel entre T2 (día 4) y T3 (día 6) (26 ng/mL). El TREM-1 soluble no fue detectado en pacientes con SIRS sin septicemia asociada. Los niveles de TREM-1-Ligando asociado a membrana (la detección del cual se describe en el documento WO2004081233) no fueron detectables en el paciente con septicemia (HSR37) en el momento del ingreso en la UCI y alcanzó la máxima expresión en T4 (día 8). Estos resultados indican que tanto el TREM-1 soluble y TREM-1-Ligando asociado a membrana con el estatus de septicemia y su expresión está correlacionada con el curso clínico de la enfermedad. La medida de tanto el TREM-1 soluble y TREM-1-Ligando asociado a membrana en pacientes críticamente enfermos recién ingresados podría ayudar rápidamente a identificar los que tienen infección.

Ejemplo 5: Valoración de sTREM-1 en plasma de pacientes con septicemia

En otra serie de 63 pacientes, algunos con septicemia (n=30) otros con choque séptico (n=33), se analizaron los niveles de plasma de sTREM-1. La Figura 12 muestra en el curso del tiempo el valor de la mediana de los niveles en plasma de sTREM-1 (con intervalo intercuartil) de 1 un paciente superviviente (cuadrados) y en pacientes no supervivientes (triángulos). La Figura 13 muestra el análisis de Kaplan-Meier de pacientes con sTREM-1 >180 pg/mL (n=32) y <180 pg/mL (n=31) en el momento del ingreso en la UCI. No hubo una diferencia significativa entre las dos curvas (ensayo de rango logarítmico, p<0,01), sub-puntuando por tanto el valor de determinar la forma soluble de TREM-1 en muestras de plasma de pacientes septicémicos críticamente enfermos como un método útil para determinar la evolución de la enfermedad.

Ejemplo 6: Expresión de TREM-1 en leucocitos polimorfonucleares (PMN) y monocitos

En otra serie de pacientes se analizó por citometría de flujo la expresión de TREM-1 en la superficie celular de monocitos (véase la Figura 14) y linfocitos polimorfonucleares (véase la Figura 15) después de marcar con un anticuerpo monoclonal anti-humano de TREM-1, PE-marcado (clon 193015, R&D, Abingdon, Reino Unido). Los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia media (MFI). Se estudiaron tres grupos de pacientes, pacientes septicémicos (n=25) y pacientes no septicémicos (n=15) o controles sanos (n=7). Los valores de p respectivos (ensayo t de Student) se representan encima de cada gráfica de dispersión. No se observaron diferencias significativas para la expresión de TREM-1 en membrana en neutrófilos de pacientes de los tres grupos. La MFI en monocitos de pacientes con choque séptico son significativamente superiores a la MFI de pacientes sin septicemia o controles sanos.

La Figura 16 muestra el modelo de expresión de TREM-1 en monocitos durante el choque séptico de acuerdo con el desenlace. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia media. Los valores de p respectivos se representan encima de los puntos de tiempos. 'La línea base' corresponde a la primera determinación y el 'último valor' hasta la última determinación de TREM-1 antes del alta de la unidad de cuidados intensivos o la muerte. Estos resultados demuestran que entre los pacientes con septicemia, los que tienen niveles inferiores de expresión de TREM-1 en monocitos, pero no en neutrófilos, se puede predecir que tendrán un desenlace positivo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar una enfermedad de origen bacteriano o fúngico en un sujeto, en donde dicha enfermedad es neumonía o septicemia, comprendiendo dicho método la etapa de medir el nivel de sTREM-1 (forma soluble del receptor desencadenante expresado en células-1 mieloides) en una muestra biológica de líquido corporal obtenida de dicho sujeto, comparar el nivel medido de sTREM-1 en la muestra con un nivel medio en una población de control que no padece dicha enfermedad de origen bacteriano o fúngico, siendo
10 indicativos los niveles elevados de sTREM-1 comparados con dicho control de la presencia o extensión de dicha enfermedad de origen bacteriano o fúngico en el paciente, en donde en donde dicha etapa de medir el nivel de sTREM-1 comprende a su vez las etapas de:
 - (a) poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo capaz de unirse específicamente a sTREM-1; y
 - 15 (b) detectar el nivel de sTREM-1 presente en la muestra observando el nivel de unión entre dicho anticuerpo y sTREM-1.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además las etapas adicionales de medir el nivel de sTREM-1 en una segunda o más muestras del paciente, obteniéndose las muestras primera y segunda o más muestras en diferentes tiempos; y comparar los niveles de las muestras para indicar la evolución o remisión de la enfermedad de origen bacteriano o fúngico.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha enfermedad de origen bacteriano o fúngico es neumonía.
4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha enfermedad de origen bacteriano o fúngico es septicemia.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina y líquido de lavado broncoalveolar.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la muestra es líquido de lavado broncoalveolar.
7. El método de la reivindicación 5, en donde la muestra es de suero sanguíneo o plasma sanguíneo.
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la muestra es una muestra humana.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la etapa adicional de medir el nivel de TREM-1-Ligando en una o más muestras biológicas obtenidas de dicho sujeto.
- 40 10. Uso de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a sTREM-1 en un método de diagnóstico *in vitro* de una enfermedad de origen bacteriano o fúngico, como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

ctactactac	taaattcgcg	gccggtcgac	gctggtgcac	aggaaggatg	aggaagacca	60
ggctctgggg	gctgctgtgg	atgctctttg	tctcagaact	ccgagctgca	actaaattaa	120
ctgaggaaaa	gtatgaactg	aaagaggggc	agaccctgga	tgtgaaatgt	gactacacgc	180
tagagaagtt	tgccagcagc	cagaaagctt	ggcagataat	aaggagcggg	gagatgcccc	240
agaccctggc	atgcacagag	aggccttcaa	agaattccca	tccagtccaa	gtggggagga	300
tcataactaga	agactacat	gatcatgggt	tactgcgcgt	ccgaatggtc	aaccttcaag	360
tggaagattc	tggactgtat	cagtgtgtga	tctaccagcc	tccaaggag	cctcacatgc	420
tgttcgatcg	catccgcttg	gtggtgacca	agggtttttc	agggaccct	ggctccaatg	480
agaattctac	ccagaatgtg	tataagattc	ctcctaccac	cactaaggcc	ttgtgccac	540
tctataaccag	ccccagaact	gtgacccaag	ctccacccaa	gtcaactgcc	gatgtctcca	600
ctcctgactc	tgaaatcaac	cttacaatat	tgacagatat	catcagggtt	ccggtgttca	660
acattgtcat	tctcctggct	gggtggattcc	tgagtaagag	cctggtcttc	tctgtcctgt	720
ttgctgtcac	gctgaggtca	tttgtaccct	agggccacga	accacgaga	atgtcctctg	780
acttcagcc	acatccatct	ggcagttgtg	ccaagggagg	agggaggagg	taaaaggcag	840
ggagttaata	acatgaatta	aatctgtaat	caccagctat	ttct		884

[SEQ ID No: 1]

Fig. 1

Met	Arg	Lys	Thr	Arg	Leu	Trp	Gly	Leu	Leu	Trp	Met	Leu	Phe	Val	Ser	1	5	10	15
Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Thr	Lys	Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	Tyr	Glu	Leu	Lys	20	25	30	
Glu	Gly	Gln	Thr	Leu	Asp	Val	Lys	Cys	Asp	Tyr	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	35	40	45	
Ala	Ser	Ser	Gln	Lys	Ala	Trp	Gln	Ile	Ile	Arg	Asp	Gly	Glu	Met	Pro	50	55	60	
Lys	Thr	Leu	Ala	Cys	Thr	Glu	Arg	Pro	Ser	Lys	Asn	Ser	His	Pro	Val	65	70	75	80
Gln	Val	Gly	Arg	Ile	Ile	Leu	Glu	Asp	Tyr	His	Asp	His	Gly	Leu	Leu	85	90	95	
Arg	Val	Arg	Met	Val	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	Leu	Tyr	Gln	100	105	110	
Cys	Val	Ile	Tyr	Gln	Pro	Pro	Lys	Glu	Pro	His	Met	Leu	Phe	Asp	Arg	115	120	125	
Ile	Arg	Leu	Val	Val	Thr	Lys	Gly	Phe	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Asn	130	135	140	
Glu	Asn	Ser	Thr	Gln	Asn	Val	Tyr	Lys	Ile	Pro	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	145	150	155	160
Ala	Leu	Cys	Pro	Leu	Tyr	Thr	Ser	Pro	Arg	Thr	Val	Thr	Gln	Ala	Pro	165	170	175	
Pro	Lys	Ser	Thr	Ala	Asp	Val	Ser	Thr	Pro	Asp	Ser	Glu	Ile	Asn	Leu	180	185	190	
Thr	Asn	Val	Thr	Asp	Ile	Ile	Arg	Val	Pro	Val	Phe	Asn	Ile	Val	Ile	195	200	205	
Leu	Leu	Ala	Gly	Gly	Phe	Leu	Ser	Lys	Ser	Leu	Val	Phe	Ser	Val	Leu	210	215	220	
Phe	Ala	Val	Thr	Leu	Arg	Ser	Phe	Val	Pro	225	230								

[SEQ ID No: 2]

Fig. 2

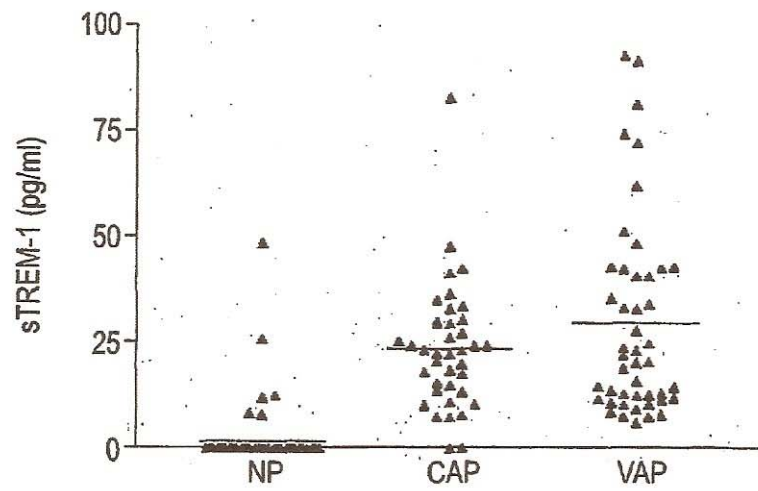


Fig. 3

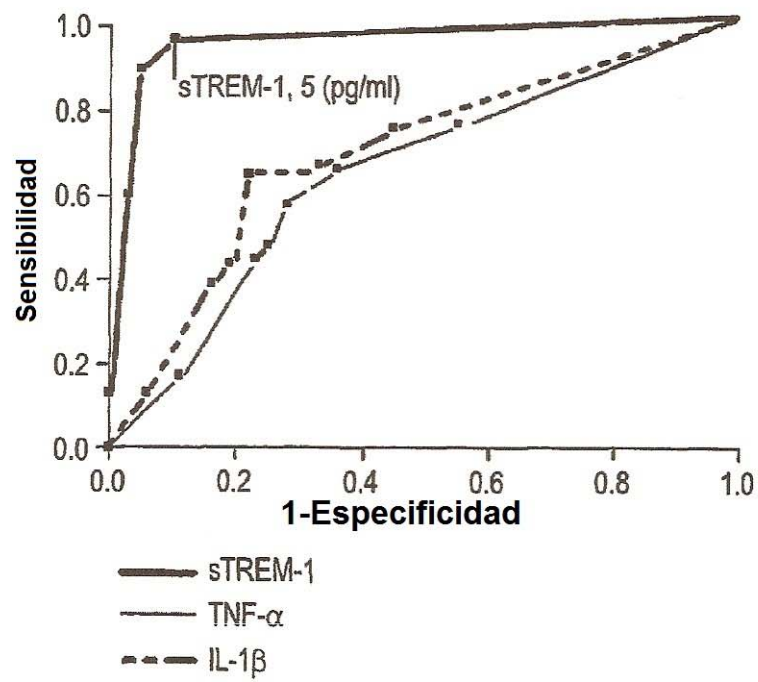


Fig. 4

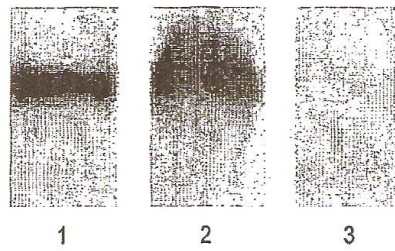


Fig. 5

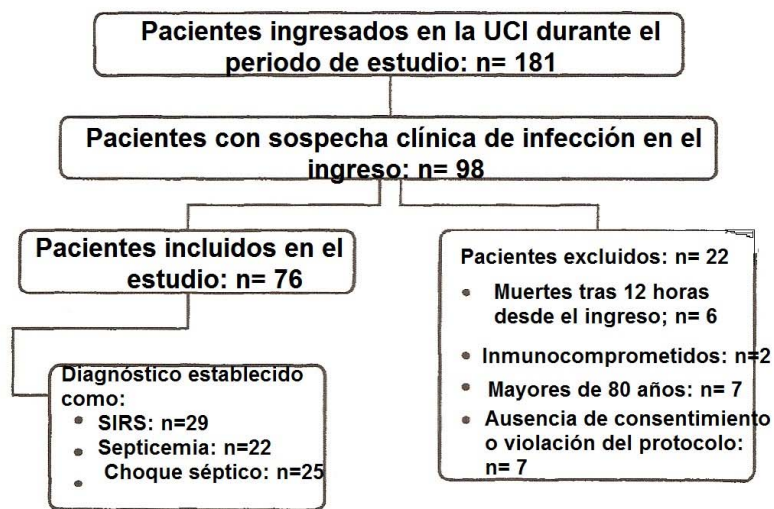


Fig. 6

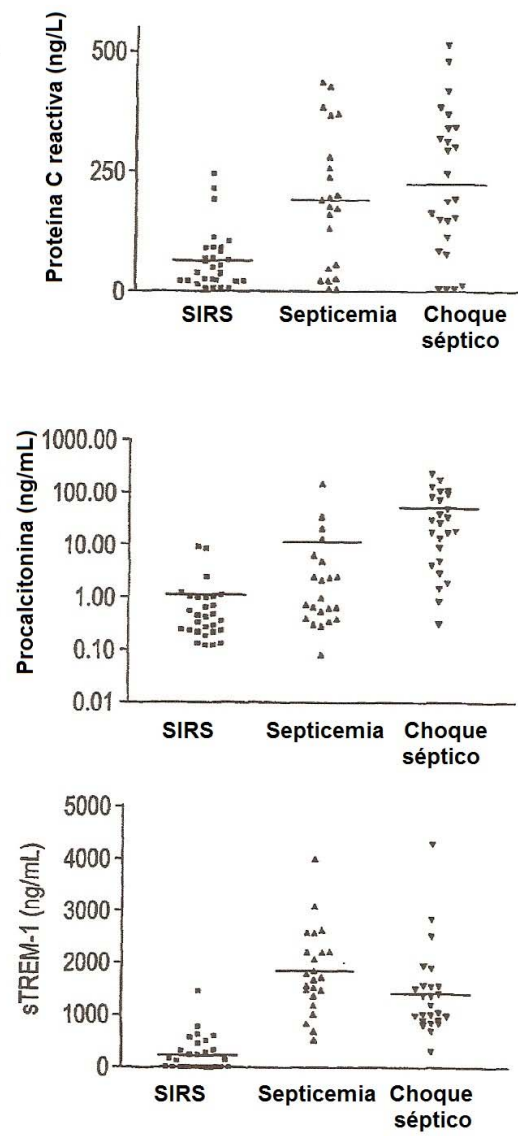


Fig. 7

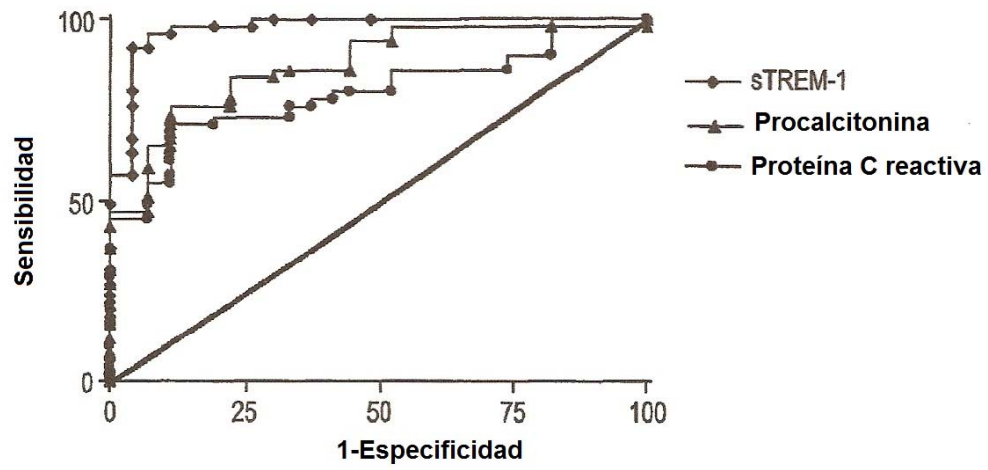


Fig. 8

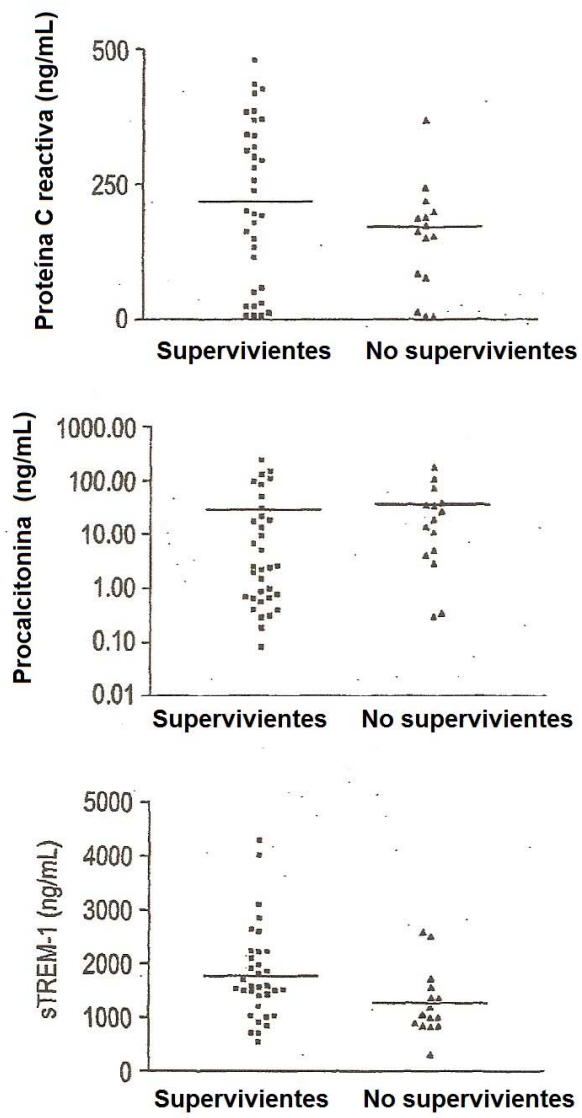


Fig. 9

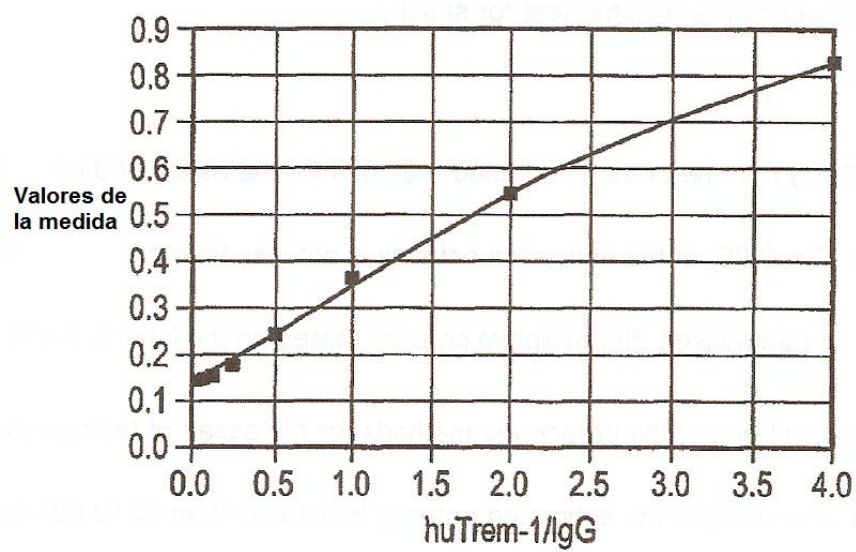


Fig. 10

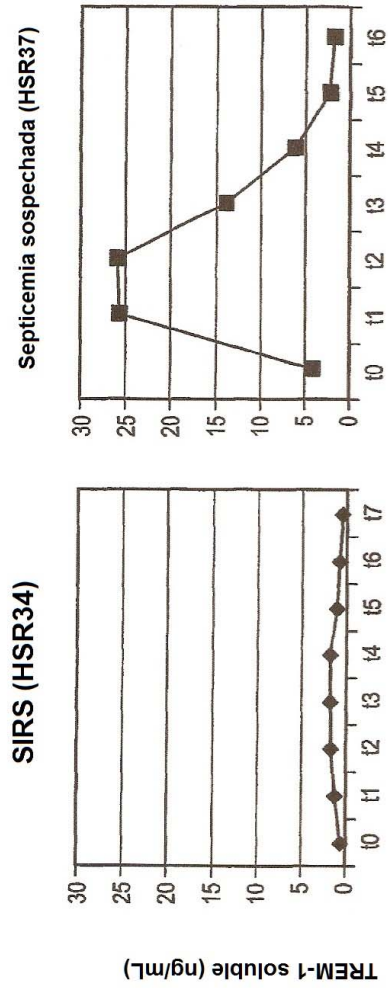


Fig. 11A

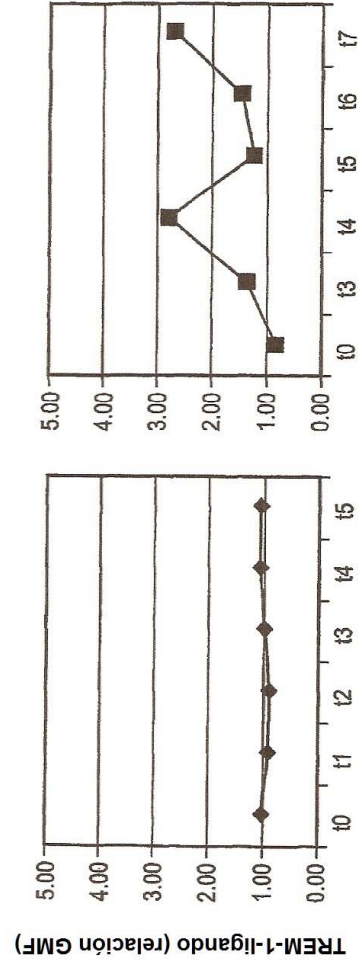


Fig. 11B

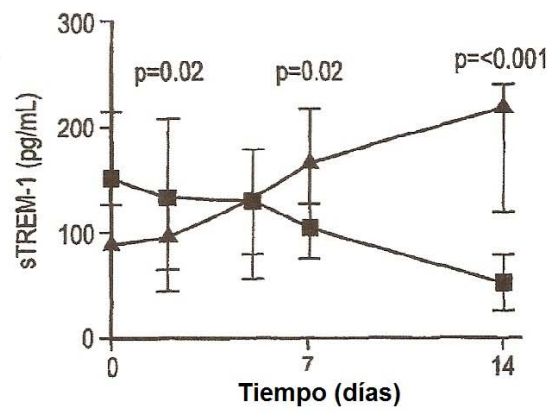


Fig. 12

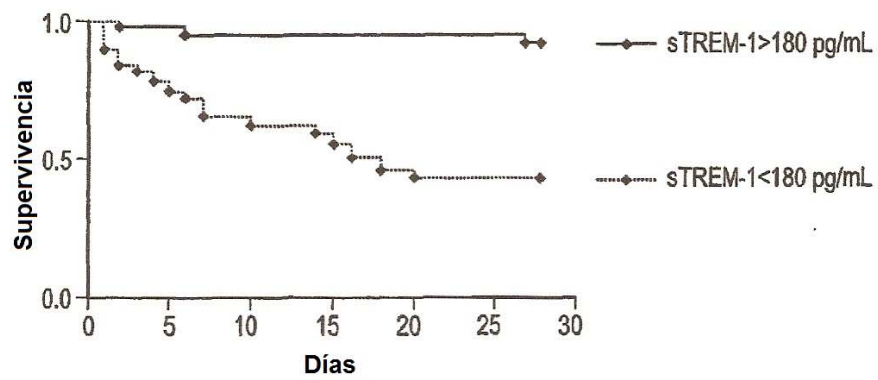


Fig. 13

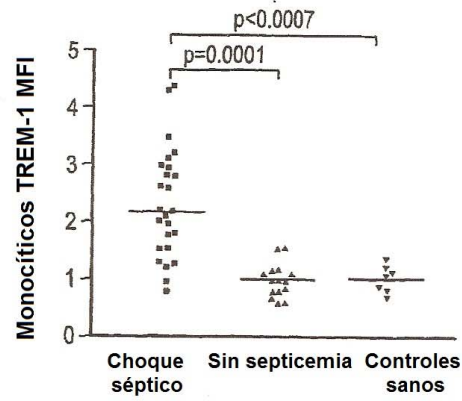


Fig. 14

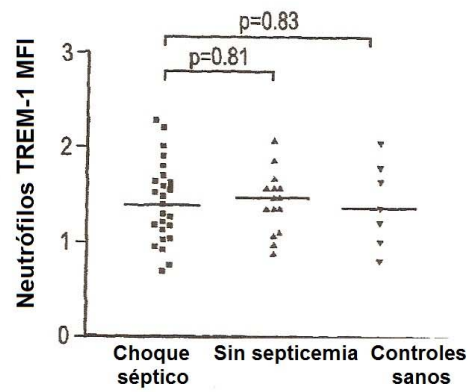


Fig. 15

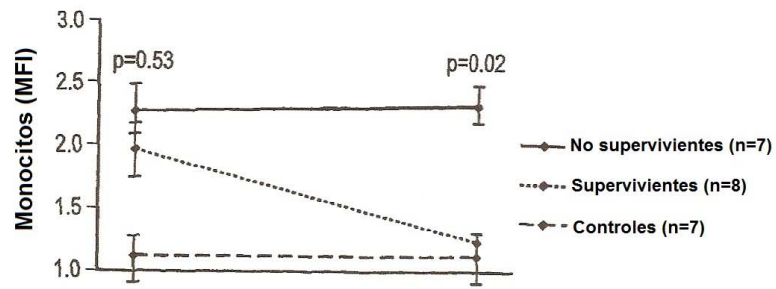


Fig. 16