

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 268**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008 E 10166054 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2230519**

54 Título: **Biomarcadores y procedimientos de diagnóstico, predicción y/o pronóstico de septicemia y usos de los mismos**

30 Prioridad:

16.11.2007 EP 07120929

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.08.2014

73 Titular/es:

**BIOCARTIS NV (100.0%)
Generaal De Wittelaan 11 B3
2800 Mechelen, BE**

72 Inventor/es:

**KAS, KOEN;
VANPOUCKE, GRIET;
DEGROEVE, SVEN y
HUIJBEN, KATHLEEN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 486 268 T3

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

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores y procedimientos de diagnóstico, predicción y/o pronóstico de septicemia y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La invención se refiere a biomarcadores basados en péptidos y/o proteínas y a moléculas que se unen a los mismos para el diagnóstico de enfermedad o determinación de una afección particular en un sujeto, en particular ciertos péptidos o proteínas como biomarcadores para septicemia y procedimientos para uso de los mismos en el diagnóstico, pronóstico y/o predicción de la aparición de septicemia que incluyen procedimientos que implican determinar expresión elevada, disminuida o alterada de dichos biomarcadores en una muestra de un sujeto.

Antecedentes a la invención

10 En muchas enfermedades y afecciones, un resultado positivo del tratamiento y/o profilaxis se correlaciona fuertemente con diagnóstico temprano y/o exacto de la enfermedad o afección. Sin embargo, frecuentemente no hay procedimientos eficaces de diagnóstico temprano y por tanto, los tratamientos se administran frecuentemente demasiado tarde, inapropiadamente o a individuos que no se beneficiarán de ellos. Como resultado, muchos fármacos que pueden ser beneficiosos para algunos pacientes pueden funcionar malamente, en absoluto o con efecto adverso en otros pacientes.

15 Así, existe la necesidad de estrategias innovadoras que permitirán la detección, predicción, pronóstico, diagnóstico y tratamiento temprano de enfermedades y otras afecciones biológicas. También hay una necesidad de determinar la capacidad, o incapacidad, de un paciente para tolerar medicaciones o tratamientos.

20 La septicemia se llama más comúnmente una infección de la corriente sanguínea o envenenamiento de la sangre. Es la presencia de bacterias (bacteriemia), organismos infecciosos o sus toxinas en la sangre u otros tejidos del cuerpo. La septicemia frecuentemente se produce en pacientes que padecen síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) como resultado de, por ejemplo, cirugía, traumatismo, quemaduras, pancreatitis y otros eventos no infecciosos que hacen que se produzca la inflamación. El SRIS combinado con una infección se llama septicemia y puede producirse en muchas etapas diferentes de gravedad. La infección puede producirse simultáneamente con la aparición de SRIS por ejemplo debido a la infección de una herida o traumatismo o puede producirse después debido a la presencia latente de un organismo infeccioso.

25 La septicemia puede asociarse a síntomas clínicos de enfermedad sistémica (en todo el cuerpo) tales como fiebre, escalofríos, malestar general, hipotensión arterial y cambios del estado mental. La septicemia puede ser una situación grave, una enfermedad potencialmente mortal que requiere cuidado urgente y completo. El tratamiento depende del tipo de infección, pero normalmente empieza con antibióticos o medicaciones similares.

30 Como la septicemia puede ser el resultado de infección por una amplia variedad de organismos, es una afección que es particularmente difícil de predecir y diagnosticar suficientemente temprano para intervención eficaz. Es una respuesta inflamatoria excesiva e incontrolada en un individuo, normalmente resultante de una respuesta del sistema inmunitario inapropiada del individuo a un organismo patógeno. Además, puede no haber números significativos de organismos en sitios accesibles o en líquidos corporales del individuo afectado, aumentando así la dificultad de diagnóstico. Por tanto existe la necesidad de identificar biomarcadores que indiquen el riesgo, o la aparición temprana de septicemia, independientemente del agente causante, para permitir la intervención temprana y eficaz. La diferenciación entre

35 pacientes que están en riesgo de desarrollar septicemia y aquellos que no también ayudará a tratar el estado de la enfermedad. En particular, la capacidad para distinguir SRIS de septicemia en un paciente es altamente deseable.

40 Por tanto hay una necesidad inmediata de la identificación de biomarcadores que sean medibles y específicos para la afección e indicativos del riesgo de progresión a, o aparición temprana de, septicemia además de procedimientos de uso de dichos marcadores en el cribado.

45 Los biomarcadores son indicadores biológicos que señalizan un estado fisiológico cambiado debido a una enfermedad o intervención terapéutica. Se ha demostrado que ciertas sustancias, que incluyen proteínas y péptidos, se expresan diferencialmente en tejido enfermo y muestras de fluido corporal en ciertas afecciones tales como septicemia, cuando se compara con tejido normal y muestras de fluido corporal. Por tanto, el (las) proteína(s)/el (los) péptidos(s) diferencialmente expresados presentes en (o ausentes de) muestras enfermas de un paciente, mientras que están ausentes de (o presentes) en tejido normal, es/son biomarcadores candidatos para esa enfermedad o afección.

50 Frecuentemente, un único biomarcador solo puede ser insuficiente para el diagnóstico exacto de una enfermedad o afección, especialmente una tan compleja como la septicemia. Como resultado, existe una necesidad continua de identificación de biomarcadores que pueden usarse para identificar o perfilar la afección en diversas etapas en su patología.

55 El único biomarcador de diagnóstico aprobado por la FDA para distinguir septicemia de causas no infecciosas de síndromes de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) actualmente disponible es la procalcitonina (PCT). El rendimiento de diagnóstico y pronóstico de PCT es, sin embargo, bastante bajo como se mostró en un informe reciente de Tang y colaboradores (Tang B.M.J. y col., The Lancet vol 7:p. 210-217, 2007), que indica que la prueba de procalcitonina no puede distinguir con exactitud septicemia de SRIS en pacientes adultos críticamente enfermos.

La proteína C reactiva es otro marcador ampliamente usado para diagnosticar septicemia, pero es incapaz de distinguir

entre septicemia y SRIS sin infección.

El documento US 2004/096917 desvela el diagnóstico de septicemia o SRIS usando perfiles de biomarcadores.

Roth y col. (Biochemical and biophysical research communications, 2003, vol. 308, n.º: 4, páginas 840-846) desvelan la medición de histonas solubles en sueros de pacientes con septicemia en comparación con controles sanos usando un ensayo de ELISA frente a fragmentos de histona asociados a ADN.

El documento WO 2009/061918 A1, que es un documento del Artículo 54(3) del CPE desvela que las proteínas histonas están presentes en mayores cantidades en la sangre de animales que padecen septicemia inducida por la introducción de lipopolisacárido (LPS) en comparación con animales de control.

Los autores de la invención han desarrollado ahora procedimientos que permiten la rápida cuantificación, cualificación y comparación de perfiles de proteínas y péptidos derivados de diferentes muestras biológicas y como resultado han identificado novedosos biomarcadores para diagnosticar, pronosticar y/o predecir septicemia y sus diferentes fases y de septicemia frente a SRIS sin infección en un sujeto.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona novedosos biomarcadores que permiten que el doctor médico o el profesional clínico diferencie entre afecciones de SRIS y septicemia y procedimientos para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico precisos, rápidos y sensibles de septicemia frente a SRIS mediante (1) una medida de la cantidad o calidad de uno o más de dichos biomarcadores tomados de una muestra biológica de un sujeto de referencia, sea un sujeto sano, un paciente que tiene septicemia o un paciente que tiene SRIS sin infección, para proporcionar un "perfil de biomarcadores de referencia" para dichos biomarcadores que es indicativo de la afección y (2) mediante la comparación de este perfil de biomarcadores de referencia con un "perfil de biomarcadores candidatos" de dicho(s) biomarcador(es) de una muestra biológica comparable de un sujeto que tiene septicemia, está en riesgo de desarrollar septicemia o está en una fase particular en la progresión de la septicemia.

Un "perfil de biomarcadores de referencia" puede obtenerse de una población de individuos que (1) no tienen y nunca han tenido septicemia, (2) que tienen septicemia o están padeciendo la aparición de septicemia o una fase particular en la progresión de la septicemia o (3) que tienen SRIS sin infección. Si el perfil de biomarcadores del sujeto de prueba contiene características distintivas del perfil de biomarcadores de la población de referencia, entonces el individuo puede diagnosticarse como que está respectivamente (1) sano, (2) que está en riesgo de desarrollar septicemia, que tiene septicemia o que está en una etapa particular en la progresión de la septicemia o (3) que tiene SRIS. El perfil de biomarcadores de referencia también puede obtenerse de diversas poblaciones de individuos que incluyen aquellas que están padeciendo SRIS o aquellas que están padeciendo una infección pero que no están padeciendo SRIS.

Por consiguiente, la presente invención permite al profesional clínico distinguir entre aquellos pacientes que tienen SRIS pero que probablemente no van a desarrollar septicemia grave, que tienen septicemia, o que están en riesgo de desarrollar septicemia.

La presente invención proporciona materia como se expone en una cualquiera y todas las reivindicaciones adjuntas 1 a 10. La memoria descriptiva proporciona además el uso de proteínas histonas según se definen en el presente documento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia, o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto.

La memoria descriptiva también proporciona un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende obtener un perfil de biomarcadores candidatos de una muestra biológica tomada de dicho sujeto en el que dicho perfil de biomarcadores candidatos se basa en la medición de la cantidad de proteínas histonas, en dicha muestra y comparar dicho perfil de biomarcadores candidatos con un perfil de biomarcadores de referencia obtenido de un sujeto sano o un paciente que tiene SRIS.

También se proporciona por la memoria descriptiva un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende: obtener un perfil de biomarcadores candidatos de una muestra biológica tomada de dicho sujeto en el que dicho perfil de biomarcadores candidatos se basa en al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, pro-hepcidina (pro-HEPC), receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil de candidatos con un perfil de biomarcadores de referencia obtenido de un sujeto sano o un paciente que tiene SRIS.

La memoria descriptiva proporciona además un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende medir el nivel de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, pro-hepcidina (pro-HEPC), receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra biológica de dicho

sujeto, usar dichas mediciones obtenidas para crear un perfil para dichos biomarcadores y comparar dicho perfil con un perfil de biomarcadores de referencia obtenido de un sujeto sano o un paciente que tiene SRIS.

La memoria descriptiva proporciona un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende determinar una cantidad de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, pro-hepcidina (pro-HEPC), receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra obtenida de un sujeto; y comparar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra del sujeto de prueba con un intervalo de valores normales de los biomarcadores seleccionados en sujetos de control; por lo que un aumento o disminución en la cantidad del biomarcador seleccionado en la muestra a un nivel mayor o menor que el intervalo de valores normales de los biomarcadores seleccionados es indicativo de septicemia.

La memoria descriptiva proporciona además un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende determinar una cantidad de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, pro-hepcidina (pro-HEPC), receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra del sujeto de prueba con un intervalo de valores de los biomarcadores seleccionados obtenidos de sujetos con septicemia; por lo que una cantidad comparable de los biomarcadores seleccionados en dicha muestra con respecto al intervalo de valores de los biomarcadores seleccionados en sujetos con septicemia es indicativa de septicemia.

Alternativamente, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende obtener un perfil de anticuerpos candidatos de una muestra biológica tomada de dicho individuo en el que dicho perfil de anticuerpos candidatos se basa en un anticuerpo para al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, pro-hepcidina (pro-HEPC), receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil de anticuerpos candidatos con un perfil de anticuerpos de referencia.

La memoria descriptiva proporciona además un procedimiento para determinar si un sujeto es sensible o no a tratamiento para septicemia con una sustancia, que comprende las etapas de obtener un perfil de biomarcadores candidatos de una muestra biológica tomada de dicho individuo en el que el perfil de biomarcadores candidatos se basa en al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, pro-hepcidina (pro-HEPC), receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil de candidatos con un perfil de biomarcadores de referencia.

Por ejemplo, uno de los biomarcadores seleccionados es un miembro de la familia de las proteínas histonas.

Preferentemente, dichas proteínas histonas están seleccionadas del grupo de histona H1.4, histona H2A (diferentes isoformas), histona H2B (diferentes isoformas), histona H3 (diferentes isoformas), histona H4 (diferentes isoformas).

Muestras preferidas para ser analizadas en el procedimiento como se describe en el presente documento son sangre u orina, más preferible la muestra es suero o plasma.

El procedimiento como se describe en el presente documento usa tecnología de inmunoensayo seleccionada del grupo de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA múltiplex, radioinmunoensayo o tecnologías de ELISPOT para establecer el perfil de biomarcadores. Alternativamente, el perfil de biomarcadores se establece usando procedimientos de análisis de espectrometría de masas de las proteínas presentes en dicha muestra.

La memoria descriptiva describe adicionalmente un kit para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia que comprende moléculas de unión a al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, pro-hepcidina (pro-HEPC), receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP). Un kit tal puede comprender además un perfil de biomarcadores de referencia o un valor de referencia de la cantidad de uno o más biomarcadores según se define en el presente documento, obtenido de un sujeto sano o un sujeto que tiene SRIS para comparación de los resultados.

Por ejemplo, el kit comprende al menos moléculas de unión que son específicas para la unión de un miembro de la familia de las proteínas histonas.

Por ejemplo, el kit comprende dos o más moléculas de unión que son específicas para la unión de diferentes miembros de la familia de las proteínas histonas.

Preferentemente, dichas proteínas histonas están seleccionadas del grupo de histona H1.4, histona H2A (diferentes isoformas), histona H2B (diferentes isoformas), histona H3 (diferentes isoformas), histona H4 (diferentes isoformas).

Moléculas de unión preferidas como se describen en el presente documento son anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, aptámeros, fotoaptámeros, proteínas de interacción específica, moléculas pequeñas de interacción específica.

5 La memoria descriptiva engloba una micromatriz de proteínas que comprende fragmentos de proteínas de al menos dos biomarcadores seleccionados del grupo de proteínas histonas, pro-hepcidina (pro-HEPC), receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) recubierta sobre una fase sólida.

10 La micromatriz como se describe en el presente documento comprende fragmentos de proteínas de al menos dos miembros de la familia de proteínas histonas. Preferentemente, dichas proteínas histonas están seleccionadas del grupo de histona H1.4, histona H2A (diferentes isoformas), histona H2B (diferentes isoformas), histona H3 (diferentes isoformas), histona H4 (diferentes isoformas).

15 Los procedimientos como se enseñan en el presente documento comprenden además procedimientos en los que las mediciones de cualquier combinación de los biomarcadores seleccionados del grupo de proteínas histonas, pro-hepcidina (pro-HEPC), receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) están incluidas en la creación del perfil de candidatos y de referencia. Se entenderá que también pueden incluirse biomarcadores adicionales tales como biomarcadores ya usados para el diagnóstico o pronóstico de septicemia o SRIS.

20 La memoria descriptiva proporciona además procedimientos como se ha explicado resumidamente anteriormente en los que el perfil se crea usando anticuerpos para dichos biomarcadores. En este caso los perfiles de candidatos y de biomarcadores de referencia se crearán basándose en mediciones de anticuerpos para los biomarcadores y se denominan en lo sucesivo perfiles de anticuerpos candidatos y perfiles de anticuerpos de referencia.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra los resultados de un experimento de ELISA que detecta el nivel de proteína del biomarcador X1, sTNFR2 en muestras de sujetos sanos, muestras de pacientes que tienen SRIS y de pacientes que tienen septicemia.

25 La Figura 2 ilustra los resultados de un experimento de ELISA que detecta el nivel de proteína del biomarcador X2, PTX-3, en muestras de sujetos sanos, muestras de pacientes que tienen SRIS y de pacientes que tienen septicemia.

La Figura 3 ilustra los resultados de un experimento de ELISA que detecta el nivel de proteína del biomarcador X3, M-CSF, en muestras de sujetos sanos, muestras de pacientes que tienen SRIS y de pacientes que tienen septicemia.

30 La Figura 4 ilustra los resultados de un experimento de ELISA que detecta el nivel de proteína del biomarcador X4, pro-HEPC, en muestras de sujetos sanos, muestras de pacientes que tienen SRIS y de pacientes que tienen septicemia.

La Figura 5 ilustra los resultados de un experimento de ELISA que detecta el nivel de proteína del biomarcador X5, pro-BNP, en muestras de sujetos sanos, muestras de pacientes que tienen SRIS y de pacientes que tienen septicemia.

La Figura 6 muestra el valor predictivo para discriminar entre SRIS y septicemia usando el marcador PCT solo.

La Figura 7 muestra el valor predictivo para discriminar entre SRIS y septicemia usando el marcador CRP solo.

35 La Figura 8 muestra el valor predictivo para discriminar entre SRIS y septicemia usando el marcador sTNFR2 solo.

La Figura 9 muestra el valor predictivo para discriminar entre SRIS y septicemia usando el marcador M-CSF solo.

La Figura 10 muestra el valor predictivo para discriminar entre SRIS y septicemia usando el marcador pro-HEPC solo.

La Figura 11 muestra el valor predictivo para discriminar entre SRIS y septicemia usando el marcador pro-BNP solo.

La Figura 12 muestra el valor predictivo para discriminar entre SRIS y septicemia usando el marcador PTX-3 solo.

40 La Figura 13 muestra el valor predictivo para discriminar entre SRIS y septicemia usando una combinación de los marcadores PTX-3 y pro-HEPC.

La Figura 14 muestra la correlación del valor predictivo para discriminar entre SRIS y septicemia entre el marcador PTX-3 y el marcador PCT.

Descripción detallada de la invención

45 La septicemia puede caracterizarse como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) inicial, septicemia, septicemia grave (septicemia con disfunción orgánica aguda), choque séptico (septicemia con hipotensión arterial resistente al tratamiento), disfunción o insuficiencia multiorgánica y muerte.

El "SRIS" es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica sin signos de infección. Puede caracterizarse por la

presencia de al menos dos de los cuatro siguientes criterios clínicos: fiebre o hipotermia (temperatura 100,4 °F [38 °C] o 96,8 °F [36 °C]), taquicardia (90 latidos por minuto), taquipnea (20 respiraciones por minuto o PaCO₂ 4,3 kPa [32 mm de Hg] o la necesidad de ventilación mecánica) y un número de leucocitos alterado de 12.000 células/ml, 4000 células/ml, o la presencia de 10 % de formas de bandas, respectivamente.

- 5 La "septicemia" puede definirse como SRIS con una infección. La infección puede diagnosticarse por criterios de libros de texto convencionales o, en caso de incertidumbre, por un especialista en enfermedades infecciosas.

La "septicemia grave" puede definirse como la presencia de septicemia y al menos una de las siguientes manifestaciones de perfusión o función de órganos inadecuada: hipoxemia (PaO₂ 10 kPa [75 mm de Hg]), acidosis metabólica (pH 7,30), oliguria (salida 30 ml/h), acidosis láctica (nivel de lactato en suero 2 mmol/l), o una alteración aguda en el estado mental sin sedación (es decir, una reducción de al menos 3 puntos desde el valor de referencia en la puntuación de coma de Glasgow).

10

El "choque séptico" puede definirse como la presencia de septicemia acompañada por una disminución sostenida en la tensión arterial sistólica (11998,98 pascales (90 mm de Hg), o una disminución de 5332,88 pascales (40 mm de Hg) desde la tensión arterial sistólica de referencia) a pesar de la reanimación con fluidos y la necesidad de aminas vasoactivas para mantener la tensión arterial adecuada.

15

Como muchos organismos pueden ser la causa de la septicemia, el diagnóstico frecuentemente dura tiempo y requiere probar frente a paneles de posibles agentes. La septicemia también puede producirse en muchas circunstancias diferentes y por tanto, la septicemia puede clasificarse adicionalmente por ejemplo: la septicemia encarcelada que es una infección que está latente después de la lesión primaria se ha curado aparentemente pero puede activarse por un ligero traumatismo; la septicemia por catéter que es septicemia que se produce como una complicación de cateterización intravenosa; la septicemia oral que es un estado de enfermedad en la boca o partes adyacentes que puede afectar la salud general mediante la diseminación de toxinas; la septicemia puerperal que es infección del aparato genital femenino tras el parto, aborto o aborto espontáneo; septicemia lenta que es una afección producida por infección con estreptococos a-hemolíticos, caracterizada por una enfermedad febril con endocarditis.

20

25 Para los fines de la presente invención, la expresión "septicemia" se usa más adelante para incluir todas las afecciones y fase de la progresión de la enfermedad.

Como se describe en el presente documento, la septicemia puede predecirse o diagnosticarse obteniéndose un perfil de biomarcadores de una muestra obtenida de un individuo. Los procedimientos y kits como se enseñan en el presente documento son particularmente útiles en predecir y diagnosticar septicemia en un individuo que tiene una infección, o tiene septicemia, pero todavía no se ha diagnosticado que tiene septicemia, que se sospecha que tiene septicemia, o que está en riesgo de desarrollar septicemia. Los procedimientos y kits como se enseñan en el presente documento también pueden usarse para diferenciar entre SRIS y septicemia y para detectar y diagnosticar SRIS en un individuo o para detectar que una persona no está en riesgo de desarrollar septicemia. Los procedimientos y kits como se enseñan en el presente documento también pueden usarse para detectar diversas etapas de la progresión de septicemia tales como septicemia, septicemia grave, choque séptico e insuficiencia orgánica.

30

35

Los perfiles de biomarcadores pueden crearse de varias formas y pueden ser una relación de dos o más aspectos medibles de un biomarcador. Un perfil de biomarcadores comprende al menos dos mediciones, en las que las mediciones pueden corresponderse con los mismos biomarcadores o diferentes. Un perfil de biomarcadores también puede comprender al menos tres, cuatro, cinco, 10, 20, 30 o más mediciones. Un perfil de biomarcadores puede comprender cientos, o incluso miles, de mediciones.

40

El perfil de un biomarcador obtenido de un individuo, concretamente el perfil de biomarcadores candidatos, se compara con un perfil de biomarcadores de referencia. El perfil de biomarcadores de referencia puede generarse a partir de un individuo o una población de individuos. La población, por ejemplo, puede comprender dos, diez, o muchos más, posiblemente cientos de individuos.

45 El perfil de biomarcadores de referencia y los perfiles de biomarcadores candidatos que se comparan en los procedimientos como se enseña en el presente documento pueden generarse a partir del mismo individuo para los fines de monitorización de la progresión de la enfermedad. En este caso se esperaría que los perfiles de candidatos y de referencia se generaran a partir de muestras biológicas tomadas en diferentes momentos de tiempo y en comparación entre sí. Una comparación tal puede usarse, por ejemplo, para determinar el estado de septicemia en el individuo por mediciones repetidas con el tiempo.

50

Los perfiles de biomarcadores de referencia pueden elegirse de individuos que son positivos para septicemia y que padecen una de las etapas en la progresión de la septicemia, o de individuos con riesgo elevado de desarrollar septicemia, o de poblaciones de individuos que no tienen SRIS, de individuos que no tienen SRIS pero que están padeciendo un proceso infeccioso, de individuos que están padeciendo SRIS sin la presencia de septicemia o de individuos que están padeciendo la aparición de septicemia. El perfil de biomarcadores de referencia puede generarse a partir de una población sana.

55

Los procedimientos como se enseñan en el presente documento comprenden comparar un perfil de biomarcadores

candidatos con un perfil de biomarcadores de referencia. Como se usa en el presente documento, la comparación incluye cualquier medio para determinar al menos una diferencia en los perfiles de biomarcadores candidatos y de referencia. Una comparación puede incluir una inspección visual, una comparación aritmética o estadística de mediciones. Tales comparaciones estadísticas incluyen, pero no se limitan a, aplicar una regla. Si los perfiles de biomarcadores comprenden al menos un patrón, la comparación para determinar una diferencia en los perfiles de biomarcadores también puede incluir mediciones de estos patrones, de forma que las mediciones del biomarcador se correlacionen con medidas de los patrones internos. La comparación debe permitir el pronóstico, diagnóstico y/o predicción de la presencia de septicemia de riesgo elevado de septicemia de, SRIS, o incluso la ausencia de septicemia o SRIS. Alternativamente, la comparación puede indicar la etapa de septicemia en la que un individuo puede estar.

Los procedimientos y kits como se enseñan en el presente documento se basan en la identificación de seis nuevos biomarcadores de septicemia. Sin embargo, estos puede usarse conjuntamente con otros biomarcadores y estos pueden incluir cualquier compuesto biológico tal como una proteína o fragmento de la misma, un péptido, un polipéptido, un proteoglicano, una glucoproteína, una lipoproteína, un hidrato de carbono, un lípido, un ácido nucleico u otro polímero, o cualquier molécula biológica que esté presente en la muestra biológica y que pueda aislarse de, o medirse en, la muestra biológica. Además, un biomarcador puede ser la molécula entera o puede ser parte de la misma que puede ser parcialmente funcional o reconocida, por ejemplo, por un anticuerpo, aptámero u otra molécula de unión específica. Un biomarcador es útil si es específico para septicemia y medible. Tal aspecto medible puede incluir, por ejemplo, la presencia, ausencia o concentración del biomarcador en la muestra biológica del individuo y/o su presencia como parte de un perfil de biomarcadores.

20 Biomarcadores identificados

Como es evidente a partir de los ejemplos más adelante, los presentes inventores analizaron muestras de sangre de sujetos que padecían SRIS, sujetos que padecían septicemia en varias fases de gravedad y de sujetos sanos. El estudio se ejecutó en modo de diseño de referencia en la plataforma de descubrimiento MASTermind de Pronota usando el muy conocido procedimiento Cofradic. En un estudio de diseño de referencia, cada muestra se mide frente a una muestra de referencia, normalmente un conjunto de todas las muestras del paciente. Para cada característica presente en una cierta muestra se obtiene una relación que representa la diferencia en veces de la intensidad de la característica en la referencia frente a la intensidad de la característica en la muestra. El combinar todos los datos de características de todas las muestras en una matriz de expresión permite comparar intensidades de características entre muestras y entre grupos de muestras.

Para SRIS/SEPTICEMIA se configuró un estudio de diseño de referencia 10-10 y de ahí el conjunto de referencia fue un conjunto de las 20 muestras. Se realizó un análisis de matrices intermedio después de que se ejecutara el análisis de 3 muestras de cada grupo mediante la plataforma.

Todas las muestras de suero se deslipidaron seguido de agotamiento de las proteínas más abundantes usando una columna Ig-Y12 de Beckman. La eficiencia de agotamiento se comprobó usando ELISA y análisis de transferencia de Western. El conjunto de referencia se preparó en esta fase y esta referencia se consideró una muestra normal para el resto del procedimiento. Las muestras se prepararon para análisis MASTermind según los procedimientos COFRADIC del extremo N convencionales. El conjunto de referencia y las muestras se marcaron diferencialmente por incorporación mediada por tripsina de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, en las que las diferentes muestras llevaron la marca de oxígeno pesado y la referencia el ^{16}O . Justo antes de la clasificación por COFRADIC, cada muestra se mezcló con la referencia a masas de proteína iguales. Después de la clasificación, se obtuvieron espectros de EM de separaciones NanoLC. Los datos de EM se desisotopizaron, se agruparon y las características se construyeron usando el software desarrollado internamente llamado euCatLabel. El resultado de este procesamiento de datos es una matriz de expresión que contiene todas las características de todas las muestras analizadas. Cada característica se representa por una combinación única de m/z, conjunto de clasificación por COFRADIC y tiempo de retención de NanoLC y las características pueden estar presentes en varias muestras que varían de 1 a todas. Si una característica está presente en una muestra tendrá una relación, que representa la intensidad de la característica en la muestra de referencia (es decir el pico de ^{16}O) con respecto a la intensidad en la muestra respectiva (el pico de ^{18}O). Características cuantificables recurrentes son características con una lectura de relaciones fidedignas en al menos una muestra. Para el análisis de matrices intermitentes de 3 muestras cada una, se consideró que todas las características bien estaban presentes en 5/6 muestras o bien estaban presentes en todas las 3 muestras del grupo de pacientes de SIRS y en ninguna de las muestras del grupo de pacientes de SEPTICEMIA.

Usando este enfoque, los presentes inventores identificaron seis biomarcadores que estaban presentes en cantidades diferentes en muestras obtenidas de pacientes con SRIS y pacientes con septicemia. Estos marcadores se enumeran en la siguiente Tabla 1. Con el fin de evaluar el uso de estos biomarcadores en el diagnóstico de septicemia y en la diferenciación entre SRIS y septicemia, se realizaron varias medidas de ELISA y los datos se usaron para evaluar la potencia de los biomarcadores o combinaciones de los mismos en la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto. Los seis biomarcadores identificados se describen a continuación con algún detalle más.

Tabla 1: Biomarcadores de SRIS/septicemia recientemente identificados			
ID	Nombre		N.º de acceso de Genbank
X1	sTNFR2	Receptor 2 de TNF soluble	NP_001057
X2	PTX-3	Pentraxina-3	NP_002843
X3	M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos	NP_000748
X4	Pro-HEPC	Proforma de hepcidina	NP_066998
X5	Pro-BNP	Proforma de proteína natriurética cerebral	NP_002512
X6	Histonas	Véase la Tabla 1b	

X1: receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2)

Se ha mostrado que el receptor 2 de TNF soluble (TNF-sr75 o sTNFR2) es un marcador teórico para diagnosticar septicemia por Neilson y col., 1996 (Cytokine. 1996 vol. 12:938-43). Los niveles de TNF-alfa y receptor soluble de TNF se produjeron en pacientes que llegaron a ser clínicamente sépticos y correlacionaron bien con la gravedad de la septicemia (usando la puntuación de APACHE III). En pacientes sépticos no hubo diferencia en el patrón de cambios en los dos tipos de receptor (TNF-sr55 y TNF-sr75). Sin embargo, en pacientes no sépticos TNF-sr75 fue mayor en aquellos con endotoxemia que en aquellos sin ella. Esta diferencia no se observó con TNF-sr55, lo que sugiere un mecanismo diferente de liberación o grado de sensibilidad para los dos receptores solubles. Independientemente de la gravedad de la enfermedad, los niveles de las tres moléculas (TNF-alfa y los dos receptores) parecieron empezar a subir en aproximadamente el mismo momento de tiempo. El nivel de TNF-alfa pico se alcanzó antes (2-4 h) que el de los dos TNF-sr (4-8 h). El aumento relativo en TNF-alfa fue superior al de los receptores solubles y esta diferencia fue incluso más marcada en aquellos con septicemia más grave. La relación entre TNF-alfa pico y TNF-sr pico fue no lineal y la concentración de cada TNF-sr pareció estabilizarse a los mayores niveles de TNF-alfa. Esto sugiere el agotamiento de un conjunto limitado o saturación de la tasa de liberación. Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que la septicemia se desarrolla debido a la secreción retardada e insuficiente de TNF-sr en comparación con TNF-alfa.

X2: pentraxina 3 (PTX-3)

Las pentraxinas son proteínas altamente conservadas a través de la evolución del cangrejo cacerola al hombre. Las pentraxinas clásicas son de la forma corta y se conocen como proteína C reactiva (CRP) y componente amiloide P del suero (SAP). Se producen en el hígado tras el estímulo de interleucina (IL)-6. La medición de CRP se usa rutinariamente para diagnosticar y monitorizar diversas enfermedades inflamatorias e infecciosas, mientras que SAP es una sonda útil para identificar depósitos de amiloide. La pentraxina 3 (PTX3 o gen 14 estimulado por TNF (TSG-14)) es la primera identificada llamada pentraxina larga, que consiste en un módulo de pentraxina del extremo C acoplado con un dominio del extremo N sin relacionar. Se diferencia de las pentraxinas cortas clásicas en términos de organización génica y localización, reconocimiento de ligandos, producción de células e inducción de señales. PTX3 se prepara en respuesta a señales proinflamatorias primarias (productos bacterianos, IL-1 y factor de necrosis tumoral [TNF], pero no IL-6) por diversos tipos de células, predominantemente macrófagos y células endoteliales. Como se demostró por Muller y col. (Crit Care Med 2001 Vol. 29, N.º: 7), PTX3 está elevada en pacientes con SRIS, septicemia y choque séptico. Las máximas elevaciones de PTX3 se observaron en pacientes con choque séptico. Además, los niveles de PTX3 se correlacionaron con gravedad de enfermedad como se evalúa por puntuaciones clínicas. En particular, fue evidente una diferencia espectacular en niveles de PTX3 en el ingreso o en el día 2 entre pacientes que sobrevivieron y aquellos que eventualmente murieron.

X3: factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)

M-CSF es un factor de crecimiento hepatopoyético que estimula principalmente el crecimiento, diferenciación y proliferación de células del linaje monocito-macrófago. Ören y col. 2001 (Pediatrics, 2001 vol. 108: 329-332) estudiaron los niveles de M-CSF en suero en neonatos a término sanos, sépticos e hipóxicos en el primer día de vida y examinaron la relación de niveles de M-CSF en suero y cifras de monocitos y trombocitos circulantes en estos lactantes recién nacidos. Se definieron tres grupos en este estudio prospectivo: grupo 1, neonatos sanos sin factores de riesgo (*n* 5 40); grupo 2, neonatos que tuvieron hipoxia grave (*n* 5 20); y grupo 3, neonatos que cumplieron los criterios para la septicemia de aparición temprana (*n* 5 18). Se recogieron muestras de sangre para hemograma completo y niveles de M-CSF en suero por venopunción periférica de cada lactante en las primeras 24 horas después del alumbramiento antes de cualquier terapia médica. Las edades gestacionales y pesos al nacer no se diferenciaron significativamente entre los grupos. Los niveles de M-CSF en suero de los neonatos sépticos fueron significativamente superiores a los de tanto neonatos sanos como hipóxicos, pero no se diferenciaron significativamente entre los neonatos sanos e hipóxicos. No hubo correlación significativa entre niveles de M-CSF en suero y cifras de monocitos circulantes, pero hubo una correlación inversa significativa entre niveles de M-CSF en suero y cifras de trombocitos. Cuando esta correlación se

analizó según grupos, se determinó que esta correlación inversa entre niveles de M-CSF y cifras de trombocitos era especialmente significativa en el grupo de neonatos sépticos, pero no significativa en los grupos de neonatos sanos e hipóxicos. Los niveles de M-CSF en suero son significativamente mayores en neonatos con septicemia. Los altos niveles de M-CSF en suero pueden tener una función posible en la patogénesis de trombocitopenia en neonatos con septicemia.

5 **X4: pro-hepcidina (pro-HEPC)**

La hepcidina (véase Malyszko y Mysliwiec, *Kidney Blood Press Res* 2007; 30:15-30 para una visión general) es un péptido antimicrobiano circulante principalmente sintetizado en el hígado, que se ha propuesto recientemente como factor que regula la captación de hierro dietético y su movilización de macrófagos y cálculos hepáticos. La inflamación produce un aumento de la producción de hepcidina, que es un potente mediador de anemia de enfermedades crónicas. La hepcidina (proteína hepática bactericida, *de hepatic bactericidal protein*), un péptido catiónico rico en cisteínas, pequeño recientemente descubierto de plasma, es producida por el hígado y tiene propiedades antimicrobianas.

La estructura de la hepcidina es altamente conservadora entre mamíferos, sugiriendo una función clave en funciones biológicas importantes. Las secuencias de hepcidina estrechamente relacionadas se encuentran en vertebrados de peces a seres humanos.

Después de una escisión del péptido señal del extremo N de 24 aminoácidos, la prohepcidina se transporta a través de la membrana basolateral del hepatocito a la circulación. Las principales formas bioactivas circulantes de la hepcidina consisten solo en la porción del extremo carboxi (péptidos de 25, 22 y 20 aminoácidos). La localización exacta del procesamiento de las prohormonas finales es desconocida. Las propéptido convertasas podrían localizarse en la sangre o en la membrana celular de capilares. Todavía no hay información fidedigna disponible sobre los niveles en suero normales de la hepcidina madura. Se ha hecho progreso sustancial para elucidar el mecanismo de acción de la hepcidina. En el momento presente, la principal función de la hepcidina es la regulación homeostática del metabolismo del hierro y la mediación de la defensa del huésped e inflamación. El gen hepcidina se expresa en exceso en hígados de ratones experimentalmente cargados con hierro y ratones inactivados en hepcidina desarrollan sobrecarga de hierro. La inyección de hepcidina inhibe la absorción de hierro intestinal en ratones independientemente de su estado de hierro. Se mostró que la inyección de hepcidina produce hierro en suero dependientemente de la dosis. En cambio, la ingestión de hierro en seres humanos indujo secreción de hepcidina en orina. Estas observaciones sugieren que la hepcidina desempeña una función como regulador negativo de la absorción de hierro intestinal y liberación de hierro de macrófagos. La evidencia de los modelos de ratón transgénico indica que la hepcidina es el regulador negativo predominante de la absorción de hierro en el intestino delgado, el transporte de hierro a través de la placenta y la liberación de hierro de los macrófagos. La hepcidina controla la absorción de hierro intestinal regulando la expresión de ferroportina sobre la membrana basolateral de enterocitos. La hepcidina regula directamente la expresión de la ferroportina sobre membranas celulares, actúa uniéndose a la ferroportina exportadora de hierro celular e induciendo su internalización y degradación, atrapando así hierro en enterocitos, macrófagos y hepatocitos. El efecto neto de la hepcidina es la absorción disminuida de hierro dietético, secuestro de hierro en macrófagos y secuestro de hierro en cálculos hepáticos. La ausencia de síntesis de hepcidina conduciría naturalmente a una pérdida importante del control con respecto a la liberación de hierro por enterocitos y macrófagos, seguido de sobrecarga de hierro circulatorio. La hemojuvelina es probablemente un modulador clave de la expresión de hepcidina. La hemojuvelina genera proteína morfogénica ósea, que aumenta los niveles de ARNm de hepcidina. La hepcidina también se conoce como péptido 1 antimicrobiano expresado en hígado (LEAP-1). No se ha establecido correlación con diagnóstico de septicemia o SRIS.

40 **X5: proteína natriurética cerebral (pro-BNP)**

El péptido natriurético cerebral (también conocido como *péptido natriurético tipo B* "GC-B") es un polipéptido de 32 aminoácidos secretado por los ventrículos del corazón en respuesta a un excesivo estiramiento de los miocitos (células musculares del corazón) en los ventrículos. En el momento de la liberación, un fragmento del extremo N-terminal de 76 aminoácidos co-secretado (NT-proBNP) también se libera con BNP. BNP se une a y activa NPRA de un modo similar al péptido natriurético auricular (ANP) pero con 10 veces menor afinidad. La semivida biológica de BNP, sin embargo, es dos veces más larga que la de ANP. Tanto ANP como BNP tienen capacidad limitada para unirse y activar NPRB.

El péptido natriurético cerebral se identificó originalmente en extractos de cerebro porcino, pero en seres humanos se produce principalmente en los ventrículos cardíacos.

Las acciones fisiológicas de BNP y ANP incluyen disminución en la resistencia vascular sistémica y presión venosa central, además de un aumento en la natriuresis. Así, el efecto resultante de estos péptidos es una disminución en el gasto cardíaco y una disminución en el volumen de sangre.

Poco se sabe sobre la utilidad de péptidos natriuréticos en reflejar la disfunción ventricular izquierda y predecir la supervivencia en pacientes sépticos. En el contexto de septicemia grave, un análisis por Brueckmann y colaboradores (*Circulation* 2005, Vol. 112: 527-534) mostró que BNP puede ser útil como marcador para predecir la supervivencia en pacientes que presentan septicemia grave.

X6: histonas

La proteína final que eligieron los presentes inventores en este análisis se identificó como un miembro de la familia de

5 histonas. Aunque actualmente no está claro por qué las proteínas histonas estarían presentes en mayores cantidades en muestras de sangre de pacientes que tienen septicemia con respecto a SRIS o sujetos sanos, los presentes inventores creen que podría ser debido a un mecanismo recientemente descubierto de defensa del huésped innata llamado trampas extracelulares de neutrófilos o NET (véase Brinkmann y Zychlinsky, Nature Reviews Microbiology, 2007 vol. 5: 1-6). Los neutrófilos son uno de los principales tipos de células efectoras en el sistema inmunitario innato y se sabe que destruyen eficazmente microorganismos por fagocitosis. Recientemente, sin embargo, se ha encontrado que los neutrófilos estimulados también pueden producir NET que capturan y destruyen microorganismos. El esqueleto de las NET está constituido de cromatina liberada del neutrófilo suicida y toma la forma de hebras y cables basados en ADN. Además del ADN, algunas proteínas tales como las histonas parecen formar algunos dominios globulares en estas NET. Los microorganismos son destruidos por los cultivos neutrófilos que se han estimulado para producir NET por IL-8, componentes bacterianos o el activador de la proteína cinasa C PMA y en los que la fagocitosis se evita, indicando que las NET tienen actividad antimicrobiana. Además, esta actividad puede eliminarse si las NET son alteradas tratando neutrófilos activados con DNasas. Después de una infección, los neutrófilos destruirán primero bacterias por fagocitosis y solo después por la producción de NET. Todavía no se entiende cómo los neutrófilos se han comprometido con la formación de NET, pero ambos mecanismos antimicrobianos son igualmente eficaces. La alta concentración local de agentes antimicrobianos en NET es esencial para la destrucción bacteriana. De forma interesante, casi todas las bacterias analizadas hasta la fecha parecen ser sensibles hacia la histona 2A, que es uno de los agentes antimicrobianos más eficaces. Varios investigadores identificaron histonas y fragmentos de histonas de diversas fuentes como que tienen actividad antimicrobiana. En ese momento, la eficacia biológica de esta observación no estaba clara, ya que no entendía dónde encontrarían las histonas microorganismos durante una infección. Esto puede ahora explicarse con el descubrimiento de NET. De forma interesante, las NET destruyen hongos patógenos en tanto sus formas de levadura como de hifa. Sin embargo, las histonas no participan en la destrucción de estos eucariotas y esto indica que las NET podrían contener agentes antifúngicos específicos. No se entiende la contribución específica de los péptidos antimicrobianos granulares, proteasas y otras enzimas o las histonas a la destrucción microbiana. Es posible que diferentes patógenos tengan diferentes niveles de susceptibilidad a estos componentes. Las NET también podrían hacer susceptibles los microorganismos a otros efectores antimicrobianos.

La septicemia se produce por una infección de un microorganismo y se ha demostrado que el sistema inmunitario innato se activa en pacientes en la aparición de septicemia. Esta respuesta comprende varios eventos, siendo uno de ellos la producción de NET en la sangre, que comprende columna vertebral de cromatina, recubierta con proteínas intercelulares e internucleares tales como histonas. Esto podría de hecho ser la explicación del aumento de proteína histona en la sangre de pacientes con septicemia. En muestras de pacientes con SRIS no se detectó la presencia de histona en la sangre. Esto significa que las histonas, como se identifican por el procedimiento que se describe en el presente documento, pueden ser un indicador muy claro de septicemia que permite la diferenciación entre pacientes con SRIS y septicemia.

La siguiente tabla resume todas las secuencias de péptidos modificadas con histona. Algunas de estas son únicas para un cierto subtipo de histonas mientras que otras coinciden con diferentes isoformas de tipos de histonas. Los presentes inventores detectan todas las clases de histona principales (1-4).

Tabla 1b: Proteínas histonas identificadas

Proteína	Secuencia de péptidos modificada	posición
Histona H1.4	<Acetil (extremo N)>SETAPAAPAAPAPAEKTPVKKKAR	1-24
Histona H2A (diferentes isoformas)	AGLQFPVGR	21-29
Histona H2B (diferentes isoformas)	<Acetil (extremo N)>AVTKAQKKDGKKR	17-29
Histona H3 (diferentes isoformas)	<Acetil (extremo N)>SAPATGGVKKPHR	28-40
Histona H3 (diferentes isoformas)	<Acetil (extremo N)>YQKSTELLIR	54-63
Histona H3 (diferentes isoformas)	<Piro-glu (E del extremo N)>EIAQDFKTDLR	73-83
Histona H3 (diferentes isoformas)	<Acetil (extremo N)>KSTGGKAPR	9-17
Histona H4	DNIQGITKPAIR	24-35

Cualquiera de los marcadores anteriores identificados en el presente documento (X1-X6) puede usarse por separado o en combinación en los kits, micromatrices y procedimientos como se describen en el presente documento. Cualquier combinación de dos o más de los marcadores identificados en el presente documento pueden usarse juntos. Además, cualquier combinación de uno o más de los biomarcadores recientemente identificados pueden usarse junto con otros marcadores de septicemia conocidos. Un marcador de septicemia conocido preferido es el marcador PCT (procalcitonina) o el marcador CRP (proteína C reactiva). Combinaciones preferidas de los marcadores son las siguientes:

Pro-BNP + PTX-3; pro-BNP + pro-HEPC; pro-BNP + sTNFR2; pro-BNP + M-CSF; pro-BNP + proteínas histonas; PTX-3 + pro-HEPC; PTX-3 + sTNFR2; PTX-3 + M-CSF; PTX-3 + proteínas histonas; pro-HEPC + sTNFR2; pro-HEPC + M-CSF; pro-HEPC + proteínas histonas; M-CSF + sTNFR2; M-CSF + proteínas histonas; sTNFR2 + proteínas histonas y cualquiera de estas combinaciones + PCT o CRP.

- 5 Pro-BNP + PTX-3 + pro-HEPC; Pro-BNP + PTX-3 + sTNFR2; Pro-BNP + PTX-3 + M-CSF; pro-BNP + pro-HEPC + sTNFR2; pro-BNP + pro-HEPC + M-CSF; pro-BNP + sTNFR2 + M-CSF; PTX-3 + pro-HEPC + sTNFR2; PTX-3 + pro-HEPC + M-CSF; PTX-3 + sTNFR2 + M-CSF; pro-HEPC + sTNFR2 + M-CSF; proteínas histonas + Pro-BNP + PTX-3; proteínas histonas + Pro-BNP + pro-HEPC; proteínas histonas + Pro-BNP + sTNFR2; proteínas histonas + Pro-BNP + M-CSF; proteínas histonas + PTX-3 + pro-HEPC; proteínas histonas + PTX-3 + sTNFR2; proteínas histonas + PTX-3 + M-CSF; proteínas histonas + pro-HEPC + sTNFR2; proteínas histonas + pro-HEPC + M-CSF; proteínas histonas + M-CSF + sTNFR2 y cualquiera de estas combinaciones + PCT o CRP.

Por ejemplo, la combinación siempre comprende uno o más miembros de la familia de las proteínas histonas como biomarcador en combinación con uno cualquiera o varios de otros biomarcadores de septicemia o SRIS.

Las combinaciones más preferidas son PTX-3 + pro-HEPC; y PCT + pro-HEPC + sTNFR2.

15 Procalcitonina (PCT)

La procalcitonina (PCT) es un precursor de la hormona calcitonina, que participa en la homeostasis del calcio y se produce por las células C de la glándula tiroides. Es aquí que la procalcitonina se escinde en calcitonina, katalcalcina y un residuo de proteínas. No se libera en la corriente sanguínea de individuos sanos. Con los desarreglos que trae consigo una infección grave con una respuesta sistémica asociada, los niveles en sangre de procalcitonina pueden ascender a 100 ng/ml. En suero en sangre, la procalcitonina tiene una semivida de 25 a 30 horas. La medición de la procalcitonina puede usarse como marcador de septicemia grave y generalmente se modifica a escala bien con el grado de septicemia, aunque los niveles de procalcitonina en la sangre son muy bajos. La PCT tiene la mayor sensibilidad (85 %) y especificidad (91 %) para diferenciar pacientes con SRIS de aquellos con septicemia, cuando se compara con IL-2, IL-6, IL-8, CRP y TNF-alfa. Sin embargo, la prueba no se usa rutinariamente y todavía tiene que ganar una amplia aceptación (véase Meisner y col., 1999, Crit Care vol. 3(1): 45-50).

Proteína C reactiva (CRP)

La proteína C reactiva (CRP) es una proteína del plasma, una proteína de fase aguda producida por el hígado y por adipocitos. Es un miembro de la familia pentraxina de proteínas y se ha usado ampliamente como marcador para septicemia, especialmente en neonatos. Su exactitud es, sin embargo, controvertida.

30 Generación de perfiles de biomarcadores

Los perfiles de biomarcadores pueden generarse por el uso de uno o más procedimientos de separación. Por ejemplo, procedimientos de separación adecuados pueden incluir un procedimiento de espectrometría de masas, tal como espectrometría de masas por ionización por electropulverización (EM-ESI), EM-ESI/EM, EM-ESI/(EM)ⁿ (n es un número entero superior a cero), espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (EM-TOF-MALDI), espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser potenciada por superficie (EM-TOF-SELDI), desorción/ionización sobre silicio (DIOS), espectrometría de masas de ion secundario (SIMS), tiempo de vuelo de cuadrupolo (Q-TOF), espectrometría de masas por ionización química a presión atmosférica (EM-APCI), EM-APCI/EM, APCI-(EM)ⁿ, espectrometría de masas por fotoionización a presión atmosférica (EM-APPI), EM-APPI/EM y APPI-(EM)ⁿ. Otros procedimientos de espectrometría de masas pueden incluir, entre otros, espectrometría de masas de transformada de Fourier de cuadrupolo (FTMS) y trampa de iones. Otros procedimientos de separación adecuados pueden incluir reparto por extracción química, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de líquidos hidrófoba (fase inversa), isoelectroenfoco, electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional (PAGE), electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE) u otra cromatografía, tal como cromatografía en capa fina, de gases o de líquidos, o cualquier combinación de las mismas. La muestra biológica puede fraccionarse antes de la aplicación del procedimiento de separación.

También pueden generarse perfiles de biomarcadores mediante procedimientos que no requieren separación física de los propios biomarcadores. Por ejemplo, puede usarse espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) para resolver un perfil de biomarcadores de una mezcla compleja de moléculas. Un uso análogo de RMN para clasificar tumores se desvela, por ejemplo, en Hagberg, NMR Biomed. 11: 148-56 (1998). Procedimientos adicionales incluyen tecnología de amplificación de ácidos nucleicos, que puede usarse para generar un perfil de biomarcadores sin separación física de biomarcadores individuales (véanse, por ejemplo, Stordeur y col., J. Immunol. Methods 259: 55-64 (2002) y Tan y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 11387-11392 (2002)). La espectrometría de masas de tiempo de vuelo por desorción/ionización puede usarse para crear un perfil de biomarcadores en los que los biomarcadores son proteínas o fragmentos de proteínas que se han ionizado y vaporizado de un soporte de inmovilización por radiación láser incidente. Después se crea un perfil por el tiempo de vuelo característico para cada proteína, que depende de su relación masa a carga ("m/z"). Se conocen una variedad de técnicas de desorción/ionización láser en la técnica (véase, por ejemplo, Guttman y col., Anal. Chem. 73: 1252-62 (2001) y Wei y col., Nature 399: 243-46 (1999)). La espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser permite la generación de grandes cantidades de información en

un periodo de tiempo relativamente corto. Una muestra biológica se aplica a una de varias diversidades de un soporte que se une a todos los biomarcadores, o un subconjunto de los mismos, en la muestra. Los lisados celulares o muestras se aplican directamente a estas superficies en volúmenes tan pequeños como 0,5RL, con o sin purificación o fraccionamiento anterior. Los lisados o muestra pueden concentrarse o diluirse antes de la aplicación sobre la superficie del soporte. Entonces se usa desorción/ionización láser para generar espectros de masas de la muestra, o muestras, en tan solo tres horas.

El perfil de biomarcadores de proteína como se describe en el presente documento puede establecerse usando tecnologías de inmunoensayo tales como ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA múltiplex, radioinmunoensayo, tecnologías de ELISPOT y otras técnicas similares conocidas en la técnica.

El ELISA directo usa el procedimiento de marcar directamente el propio anticuerpo. Las placas de micropocillos están recubiertas con una muestra que contiene el antígeno diana y la unión de anticuerpo marcado se cuantifica por un punto final colorimétrico, quimioluminiscente o fluorescente. Como la etapa de anticuerpo secundario se omite, el ELISA directo es relativamente rápido y evita posibles problemas de reactividad cruzada del anticuerpo secundario con componentes en la muestra de antígeno. Sin embargo, el ELISA directo requiere el marcado de cada anticuerpo que va a usarse, que puede ser una propuesta que requiere tiempo y cara. Además, ciertos anticuerpos pueden ser inadecuados para el marcado directo. Los procedimientos directos también carecen de la amplificación de señales adicional que puede lograrse con el uso de un anticuerpo secundario.

El procedimiento de ELISA de dos etapas indirecto usa un anticuerpo secundario marcado para la detección. Primero, un anticuerpo primario se incuba con el antígeno. Esto va seguido de incubación con un anticuerpo secundario marcado que reconoce el anticuerpo primario. Para ELISA es importante que el conjugado de anticuerpo-enzima sea de alta actividad específica. Esto se logra cuando el anticuerpo se purifica por afinidad y la química de conjugación enzimática preserva la especificidad del anticuerpo, además de la actividad enzimática

El ELISA de sándwich mide la cantidad de antígeno entre dos capas de anticuerpos. Los antígenos que van a medirse deben contener al menos dos sitios antigénicos que pueden unirse al anticuerpo, ya que al menos dos anticuerpos actúan en el sándwich. Por este motivo, los ensayos tipo sándwich están limitados a la cuantificación de antígenos multivalentes tales como proteínas o polisacáridos. Los ELISA tipo sándwich para la cuantificación de antígenos son especialmente valiosos cuando la concentración de antígenos sea baja y/o estén contenidos en altas concentraciones de proteína contaminante. Para utilizar este ensayo, un anticuerpo (el anticuerpo de "captura") se purifica y se une a una fase sólida normalmente unida al fondo de un pocillo de placa. Después el antígeno se añade y se deja que forme un complejo con el anticuerpo unido. Después los productos sin unir se eliminan con un lavado y un segundo anticuerpo marcado (el anticuerpo de "detección") se deja unirse al antígeno, completando así el "sándwich". Después el ensayo se cuantifica midiendo la cantidad de segundo anticuerpo marcado unido a la matriz, mediante el uso de un sustrato colorimétrico. Las principales ventajas de esta técnica son que el antígeno no necesita purificarse antes de uso y que estos ensayos son muy específicos. Sin embargo, una desventaja es que no todos los anticuerpos pueden usarse. Las combinaciones de anticuerpos monoclonales deben cualificarse como "pares coincidentes", lo que significa que pueden reconocer epítopes separados sobre el antígeno de manera que no dificultan la unión de cada uno. Los kits de ELISA son suficientemente buenos para alcanzar la sensibilidad de detección al nivel de sub-nanogramo por ml y son útiles para cribar dianas de proteína y cuantificar su expresión en diferentes condiciones. Para mayor sensibilidad de detección necesitada, los anticuerpos monoclonales pueden introducirse adicionalmente en el kit de ELISA para aparearse con IgY policlonal bien como anticuerpos de captura o bien como anticuerpos de detección.

Cuando dos anticuerpos "de par coincidente" no están disponibles para una diana, otra opción es el ELISA competitivo. La ventaja del ELISA competitivo es que pueden usarse anticuerpos primarios no purificados. Aunque hay varias configuraciones diferentes para el ELISA competitivo, un reactivo debe conjugarse con una enzima de detección, tal como peroxidasa de rábano picante. La enzima puede ligarse tanto al antígeno como al anticuerpo primario. Un ejemplo de un competidor tal es un antígeno marcado. En este tipo de ELISA hay una relación inversa entre la señal obtenida y la concentración del analito en la muestra, debido a la competición entre el analito libre y el conjugado de ligando-enzima para el anticuerpo que recubre la microplaca, es decir cuanto más analito menor será la señal. Brevemente, un anticuerpo primario purificado sin marcar se recubre sobre los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después este anticuerpo primario se incuba con patrones sin marcar y desconocidos. Después de esta reacción se deja que llegue al equilibrio, se añade antígeno conjugado. Este conjugado se unirá al anticuerpo primario en cualquier sitio en el que sus sitios de unión no estén ya ocupados por antígeno sin marcar. Así, cuanto más antígenos sin marcar haya en la muestra o patrón, menor será la cantidad de antígeno conjugado unido. Después la placa se desarrolla con sustrato y se mide el cambio de color.

El ELISA múltiplex es un ensayo de matrices de proteínas basado en ELISA en placa de microtitulación que permite la detección simultánea de múltiples analitos en múltiples direcciones de la matriz dentro de un único pocillo. Hay diferentes tipos de ELISA múltiplex que se han desarrollado y en práctica. Uno de los ejemplos es medir antígenos recubriendo o imprimiendo anticuerpos de captura en un formato de matriz dentro de un único pocillo para permitir la construcción de ensayos de cuantificación de ELISA tipo "sándwich". Generalmente, el ELISA múltiplex también puede lograrse mediante matriz de anticuerpos, donde diferentes anticuerpos primarios pueden unirse a una fase sólida por ejemplo una placa de vidrio para capturar antígenos correspondientes en una muestra biológica. El procedimiento de detección puede ser directo o indirecto, sándwich o competitivo, de marcado o sin marcar, dependiendo de las tecnologías de matriz de

anticuerpos.

El ensayo de puntos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISpot) emplea el enfoque de ensayo tipo sándwich del enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), con algunas variaciones. El anticuerpo de captura está recubierto asépticamente sobre una placa de micropocillos apoyada sobre poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF). La placa se bloquea con proteínas del suero, las células de interés se siembran a densidades variables, junto con antígeno o mitógeno y las placas se incuban a 37 °C. La citocina secretada por células activadas se captura localmente por el anticuerpo recubierto sobre la membrana de PVDF de alta área superficial. Los pocillos se lavan para eliminar células, residuos y componentes de los medios. Un segundo anticuerpo (biotinilado) reactivo con un epítotope distinto de la citocina diana se emplea para detectar la citocina capturada. La citocina detectada se visualiza entonces usando avidina-HRP y un sustrato precipitante (por ejemplo AEC). El producto final coloreado (punto) representa una célula productora de citocinas individual. Los puntos puede contarse manualmente (por ejemplo, con un microscopio de disección) o usando un lector automatizado para capturar las imágenes de micropocillos y para analizar el número y tamaño de puntos.

El radioinmunoensayo (RIA) implica mezclar cantidades conocidas de antígeno radiactivo (frecuentemente marcado con isótopos radiactivos gamma de yodo unidos a tirosina) con anticuerpo para ese antígeno, luego añadir antígeno sin marcar o “frío” y medir la cantidad de antígeno marcado desplazado. Inicialmente, el antígeno radiactivo se une a los anticuerpos. Cuando se añade el antígeno “frío” (sin marcar, de búsqueda), los dos compiten por sitios de unión a anticuerpo – a mayores concentraciones de antígeno “frío”, más se une al anticuerpo, desplazando la variante radiactiva. Los antígenos unidos se separan de los sin unir.

Como se usa en el presente documento, el término “perfil” incluye cualquier conjunto de datos que represente rasgos o características distintivas asociados a una afección de septicemia. El término engloba un “perfil de ácidos nucleicos” que analiza uno o más marcadores genéticos, un “perfil de proteínas” que analiza uno o más marcadores bioquímicos o serológicos y combinaciones de los mismos. Ejemplos de perfiles de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, un perfil genotípico, perfil del número de copias de genes, perfil de expresión génica, perfil de metilación de ADN y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de perfiles de proteínas incluyen un perfil de expresión de proteínas, perfil de activación de proteínas, perfil de escisión de proteínas y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un “perfil genotípico” incluye un conjunto de datos genotípicos que representa el genotipo de uno o más genes asociados a una afección de septicemia. Similarmente, un “perfil del número de copias de genes” incluye un conjunto de datos del número de copias de genes que representa la amplificación de uno o más genes asociados a una afección de septicemia. Asimismo, un “perfil de expresión génica” incluye un conjunto de datos de expresión génica que representa los niveles de ARNm de uno o más genes asociados a una afección de septicemia. Además, un “perfil de metilación de ADN” incluye un conjunto de datos de metilación que representa los niveles de metilación de ADN (por ejemplo, estado de metilación) de uno o más genes asociados a una afección de septicemia. Además, un “perfil de proteínas de expresión” incluye un conjunto de datos de expresión de proteínas que representa los niveles de una o más proteínas asociadas a una afección de septicemia. Además, un “perfil de activación de proteínas” incluye un conjunto de datos que representa la activación (por ejemplo, estado de fosforilación) de una o más proteínas asociadas a una afección de septicemia. Un “perfil de escisión de proteínas” incluye un conjunto de datos que representa la escisión proteolítica de una o más proteínas asociadas a una afección de septicemia.

El término “sujeto” o “paciente” normalmente incluye seres humanos, pero también puede incluir otros animales tales como, por ejemplo, otros primates, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.

El término “muestra” como se usa en el presente documento incluye cualquier espécimen biológico obtenido de un sujeto. Las muestras incluyen, sin limitación, sangre completa, plasma, suero, glóbulos rojos, glóbulos blancos (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica), saliva, orina, excrementos (es decir, heces), lágrimas, sudor, sebo, aspirado de pezón, lavado ductal, exudados tumorales, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, linfa, aspirado con aguja fina, líquido amniótico, cualquier otro fluido corporal, lisados celulares, productos de secreción celular, líquido de inflamación, semen y secreciones vaginales. La muestra puede ser sangre completa o un componente fraccionado de la misma tal como plasma, suero o un sedimento de células. Preferentemente la muestra se obtiene fácilmente por procedimientos mínimamente invasivos. Las muestras también pueden incluir muestras de tejido y biopsias, homogeneizados de tejido y similares.

A este respecto, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para establecer un perfil de biomarcadores de referencia sanos que comprende las etapas de:

(a) determinar una cantidad de al menos dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra obtenida de un sujeto que no tiene una afección relacionada con septicemia o SRIS; y

(b) guardar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra de sujeto sano en forma de un perfil de biomarcadores de referencia.

Además, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para establecer un perfil de biomarcadores de referencia de SRIS que comprende las etapas de:

(a) determinar una cantidad de al menos dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra obtenida de un sujeto que tiene una afección de SRIS; y

5 (b) guardar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra de sujeto sano en forma de un perfil de biomarcadores de referencia.

Alternativamente, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para establecer un perfil de biomarcadores de referencia de septicemia que comprende las etapas de:

10 (a) determinar una cantidad de al menos dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra obtenida de un sujeto que tiene una afección relacionada con septicemia; y

(b) guardar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra de sujeto sano en forma de un perfil de biomarcadores de referencia.

15 Kits

La memoria descriptiva también proporciona kits para predecir, pronosticar y/o diagnosticar septicemia en un sujeto. Los kits como se enseña en el presente documento comprenden al menos un biomarcador según se define en el presente documento o moléculas que se unen específicamente al mismo. Biomarcadores específicos que son útiles en los procedimientos y kits como se enseña en el presente documento son aquellos seleccionados del grupo de proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP), pero un kit puede incluir uno o dos o tres o cuatro o todos los biomarcadores enumerados en el presente documento con o sin otros biomarcadores adicionales.

25 El biomarcador o biomarcadores en cada kit puede ser parte de una matriz, o el (los) biomarcador(es) puede(n) envasarse por separado y/o individualmente. El kit también puede comprender al menos un patrón que va a usarse en generar los perfiles de biomarcadores como se describe en el presente documento. Los kits como se enseña en el presente documento también pueden contener reactivos que pueden usarse para marcar detectablemente biomarcadores contenidos en las muestras biológicas a partir de las que se generan los perfiles de biomarcadores. Para este fin, el kit puede comprender un conjunto de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que se unen específicamente a uno o más de los biomarcadores expuestos en la Tabla 1 y/o cualquier otro biomarcador que esté incluido en la creación del perfil.

35 La memoria descriptiva también proporciona un procedimiento y un kit para evaluar la aparición y etapa o gravedad de septicemia en un sujeto, que puede variar de la misma aparición de septicemia a choque séptico y eventualmente la muerte del sujeto, midiendo la cantidad de uno o de una combinación de uno o más de los biomarcadores según se definen en el presente documento seleccionados del grupo de las proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en combinación con biomarcadores conocidos para septicemia o, en la muestra del sujeto y comparando las mediciones de biomarcador con las de una muestra obtenida de un sujeto sano o sin septicemia. La memoria descriptiva proporciona un medio para que un profesional clínico estime el grado de septicemia en una evaluación inicial y para monitorizar el cambio en el estado de la septicemia (empeoramiento, mejora o permanencia del mismo) basado en la cantidad detectada del uno o más biomarcadores en la muestra del sujeto.

45 Normalmente, el profesional clínico establecería un protocolo de recogida y análisis de una cantidad de muestra fresca del paciente a intervalos seleccionados. Normalmente la muestra se obtiene intermitentemente durante un periodo prescrito. El periodo de tiempo entre muestreos intermitentes puede imponerse por la afección del sujeto y puede oscilar de una muestra cada 24 horas a una muestra tomada continuamente, más normalmente de cada 4 horas a cada 30 minutos.

50 Usando los procedimientos y técnicas descritos en el presente documento, tanto un nivel cualitativo de uno o más de los biomarcadores presentes en la muestra puede analizarse y estimarse, como un nivel cuantitativo de uno o más de los biomarcadores presentes en la muestra puede analizarse y medirse. El profesional clínico seleccionaría el procedimiento cualitativo, el procedimiento cuantitativo, o ambos, dependiendo del estado del paciente. Normalmente, la cantidad de muestra a recoger es inferior a 10 mililitros, inferior a 1 mililitro y más normalmente inferior a 10 µl. Una muestra típica puede oscilar de aproximadamente 1 µl a aproximadamente 1 ml. Normalmente las mayores cantidades de muestra (aproximadamente 10 ml) se usan para ensayos cuantitativos. Normalmente, estas pequeñas cantidades de muestra están fácilmente e inmediatamente disponibles u obtenibles de sujetos clínicos que bien son propensos a desarrollar septicemia, o bien han desarrollado septicemia.

Una vez se ha detectado una indicación de septicemia y se ha comenzado la intervención y tratamiento de la

enfermedad o afección, el profesional clínico puede emplear el procedimiento y kit como se enseña en el presente documento para monitorizar el progreso del tratamiento o intervención. Normalmente, se tomarán una o más muestras posteriores después del tratamiento y se analizarán para la presencia de uno o más de los biomarcadores a medida que el tratamiento de la afección de septicemia comience y continúe. El tratamiento continúa hasta que la presencia de uno o más de los biomarcadores según se define en el presente documento en las muestras posteriores después del tratamiento se normalice cuando se compara con una muestra obtenida de un sujeto sano o sin septicemia. A medida que el tratamiento y la intervención mejoran la afección, la expresión de uno o más de los biomarcadores y su presencia en la muestra, se alterará y normalizará cuando se compara con una muestra de un sujeto sano o sin septicemia. El grado de mejora se expresará por un nivel correspondientemente normalizado de uno o más de los biomarcadores, detectados en una muestra. A medida que la afección se aproxima a la recuperación completa, el procedimiento puede usarse para detectar la normalización completa de uno o más de los biomarcadores según se define en el presente documento, señalizando la completitud del transcurso del tratamiento.

El término "moléculas de unión" se refiere a todas las moléculas de unión adecuadas que se unen específicamente o interaccionan con uno de los biomarcadores según se define en el presente documento y que pueden usarse en los procedimientos y kits como se enseña en el presente documento. Ejemplos de aglutinantes adecuados son anticuerpos, aptámeros, moléculas pequeñas que interaccionan específicamente, proteínas que interaccionan específicamente y otras moléculas que se unen específicamente a uno de los biomarcadores. Tanto los anticuerpos monoclonales como policlonales que se unen a uno de los biomarcadores según se define en el presente documento son útiles en los procedimientos y kits como se enseña en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales y policlonales pueden prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica y están frecuentemente comercialmente disponibles.

Los aptámeros que se unen específicamente a los biomarcadores según se define en el presente documento pueden obtenerse usando el llamado SELEX o evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial. En este sistema, pueden usarse múltiples rondas de selección y amplificación para seleccionar moléculas de ADN o ARN con alta especificidad por una diana de elección, desarrollada por Larry Gold y colaboradores y descrita en la patente de EE.UU. 6.329.145. Recientemente se ha descrito un procedimiento más refinado de diseño de los llamados fotoaptámeros con incluso mayor especificidad en la patente de EE.UU. 6.458.539 por el grupo de Larry Gold.

Los procedimientos de identificación de aglutinantes tales como proteínas de interacción y moléculas pequeñas también se conocen en la técnica. Ejemplos son análisis de dos híbridos, procedimientos de inmunoprecipitación y similares.

Normalmente, la etapa de detectar el complejo del anticuerpo de captura y uno o más de los biomarcadores comprende poner en contacto el complejo con un segundo anticuerpo para detectar el biomarcador.

El procedimiento de detección del complejo de uno o más de los biomarcadores y el anticuerpo primario o molécula de unión comprende las etapas de: separar cualquier material sin unir de la muestra del complejo de anticuerpo de captura-biomarcador; poner en contacto el complejo de anticuerpo de captura-biomarcador con un segundo anticuerpo para detectar el biomarcador, permitir la formación de un complejo entre el biomarcador y el segundo anticuerpo; separar cualquier segundo anticuerpo sin unir del complejo de biomarcador-segundo anticuerpo; y detectar el segundo anticuerpo del complejo de biomarcador-segundo anticuerpo.

Un kit para usar en el procedimiento normalmente comprende uno o más medios que tienen fijados al mismo uno o más anticuerpos de captura o moléculas de unión, por lo que la muestra se pone en contacto con los medios para exponer el anticuerpo de captura o molécula de unión al biomarcador presente en la muestra. El kit incluye un medio de adquisición que puede comprender un instrumento tal como una espátula o una simple varilla, que tiene una superficie que comprende los medios. Los medios de adquisición también pueden comprender un recipiente para aceptar la muestra, en el que el recipiente tiene una superficie de contacto con la muestra que comprende los medios. En otro ejemplo típico, el ensayo para detectar el complejo de uno o más de los biomarcadores y el anticuerpo o molécula de unión puede comprender un ELISA y puede usarse para cuantificar la cantidad de uno o más de los biomarcadores en una muestra. En un ejemplo alternativo, los medios de adquisición pueden comprender un instrumento que comprende un casete que contiene los medios.

La detección temprana de uno o más de los biomarcadores según se define en el presente documento puede proporcionar una indicación de la presencia de la proteína en una muestra en un corto periodo de tiempo. Generalmente, un procedimiento y un kit como se enseñan en el presente documento pueden detectar el biomarcador en una muestra en el plazo de cuatro horas, más normalmente en el plazo de dos horas y lo más normalmente en el plazo de una hora, tras la afección de septicemia. Preferentemente, el biomarcador puede detectarse en el plazo de aproximadamente 30 minutos tras la afección de septicemia.

Un procedimiento rápido de una etapa de detección de uno o más de los biomarcadores según se define en el presente documento puede reducir el tiempo para detectar la afección de septicemia. Un procedimiento típico puede comprender las etapas de: obtener una muestra que se sospecha que contiene uno o más de los biomarcadores; mezclar una porción de la muestra con uno o más anticuerpos de detección o moléculas de unión que se unen cada uno específicamente a uno de los biomarcadores, de manera que se inicie la unión del anticuerpo de detección o molécula de unión a los biomarcadores en la muestra; poner en contacto la mezcla de muestra y detectar anticuerpo o molécula de unión con un anticuerpo de captura inmovilizado o molécula de unión que se une específicamente al biomarcador,

anticuerpo de captura o molécula de unión que no reacciona de forma cruzada con el anticuerpo de detección o molécula de unión, tal como para unir el anticuerpo de detección o molécula de unión al biomarcador y el biomarcador al anticuerpo de captura o molécula de unión, formar un complejo detectable; eliminar el anticuerpo de detección sin unir o molécula de unión sin unir y cualquier muestra sin unir del complejo; y detectar el anticuerpo de detección o molécula de unión del complejo. El anticuerpo detectable o molécula de unión puede marcarse con un marcador detectable, tal como una marca radiactiva, una marca fluorescente, una marca enzimática, un colorante biológico, una perla magnética, (estrept)avidina o biotina, como se conoce bien en la técnica.

Uso de los procedimientos y kits como se enseña en el presente documento en el tratamiento y diagnóstico, predicción y/o pronóstico

10 Diagnóstico, predicción y/o pronóstico de septicemia y septicemia frente a SRIS

La memoria descriptiva proporciona un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende obtener un perfil de biomarcadores candidatos de una muestra biológica tomada de dicho sujeto en el que dicho perfil de biomarcadores candidatos se basa en la medición de la cantidad de proteínas histonas en dicha muestra y comparar dicho perfil de biomarcadores candidatos con un perfil de biomarcadores de referencia obtenido de un sujeto sano o un paciente que tiene SRIS.

También se proporciona por la memoria descriptiva un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende: obtener un perfil de biomarcadores candidatos de una muestra biológica tomada de dicho sujeto en el que dicho perfil de biomarcadores candidatos se basa en al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil de candidatos con un perfil de biomarcadores de referencia obtenido de un sujeto sano o un paciente que tiene SRIS.

La memoria descriptiva proporciona además un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende medir el nivel de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra biológica de dicho sujeto; usar dichas mediciones obtenidas en la etapa a) para crear un perfil para dichos biomarcadores; y comparar dicho perfil con un perfil de biomarcadores de referencia obtenido de un sujeto sano o un paciente que tiene SRIS.

La memoria descriptiva proporciona además un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende determinar una cantidad de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra obtenida de un sujeto; y comparar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra del sujeto de prueba con un intervalo de valores normales de los biomarcadores seleccionados en sujetos de control; por lo que un aumento o disminución en la cantidad del biomarcador seleccionado en la muestra a un nivel mayor o menor que el intervalo de valores normales de los biomarcadores seleccionados es indicativo de septicemia.

La memoria descriptiva proporciona además un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende determinar una cantidad de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra del sujeto de prueba con un intervalo de valores de los biomarcadores seleccionados obtenidos de sujetos con septicemia; por lo que una cantidad comparable de los biomarcadores seleccionados en dicha muestra con el intervalo de valores de los biomarcadores seleccionados en sujetos con septicemia es indicativo de septicemia.

Alternativamente, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SRIS y septicemia en un sujeto que comprende obtener un perfil de anticuerpos candidatos de una muestra biológica tomada de dicho individuo en el que dicho perfil de anticuerpos candidatos se basa en un anticuerpo para al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil de anticuerpos candidatos con un perfil de anticuerpos de referencia.

La memoria descriptiva proporciona además un procedimiento para determinar si un individuo es sensible o no a tratamiento para septicemia con una sustancia, que comprende las etapas de obtener un perfil de biomarcadores candidatos de una muestra biológica tomada de dicho individuo en el que dicho perfil de biomarcadores candidatos se

basa en al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en proteínas histonas, receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil de candidatos con un perfil de biomarcadores de referencia.

- 5 El biomarcador seleccionado como se describe en el presente documento comprende uno o más miembros de la familia de las proteínas histonas. Alternativamente, este marcador o estos marcadores se combinan con uno cualquiera o más de los otros biomarcadores proporcionados en el presente documento seleccionados del grupo de: receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2), pentraxina-3 (PTX-3), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), pro-hepcidina (pro-HEPC), pro-proteína natriurética cerebral (pro-BNP), procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP)
- 10 Preferentemente, dichas proteínas histonas están seleccionadas del grupo de histona H1.4, histona H2A (diferentes isoformas), histona H2B (diferentes isoformas), histona H3 (diferentes isoformas), histona H4 (diferentes isoformas).

Por ejemplo, los biomarcadores seleccionados son pro-hepcidina (pro-HEPC) y pentraxina-3 (PTX-3).

Muestras preferidas para ser analizadas en el procedimiento como se describe en el presente documento son sangre u orina, más preferible la muestra es suero o plasma.

- 15 El procedimiento como se describe en el presente documento usa tecnología de inmunoensayo seleccionada del grupo de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA múltiplex, radioinmunoensayo o tecnologías de ELISPOT para establecer el perfil de biomarcadores. Alternativamente, el perfil de biomarcadores se establece usando procedimientos de análisis de espectrometría de masas de las proteínas presentes en dicha muestra.

- 20 Los procedimientos indicados en el presente documento son particularmente útiles para distinguir entre SRIS y septicemia.

Tratamiento

Una vez se ha diagnosticado una afección de septicemia, la identificación de los biomarcadores según se define en el presente documento podría ser de uso en el tratamiento o mejora de la afección de septicemia del sujeto.

- 25 Es posible aumentar el nivel de expresión o abundancia de una proteína en un sujeto administrando un biomarcador purificado, sintéticamente o recombinantemente producido según se define en el presente documento a un sujeto que tiene un nivel reducido de dicho biomarcador en comparación con un sujeto sano. La administración de agentes que aumentan la expresión o actividad de dicho biomarcador también puede ser beneficiosa para el paciente. La presencia del biomarcador de sTNFR2 en sangre obtenida de un sujeto que tiene septicemia por ejemplo se reduce drásticamente cuando se compara con las muestras de un sujeto que tiene SRIS o un sujeto sano.

- 30 Otra posibilidad puede ser la reducción del nivel o abundancia de un cierto biomarcador según se define en el presente documento en caso de que dicho biomarcador tenga una elevada manifestación en la sangre de pacientes que tienen septicemia cuando se compara con las muestras de un sujeto que tiene SRIS o un sujeto sano. Ejemplos de estos biomarcadores son proteínas histonas, pro-BNP, PTX-3, pro-HEPC y M-CFS. La administración de agentes que reducen la expresión o actividad de dichas proteínas puede ser beneficiosa para el sujeto.

Ejemplos

Los siguientes detalles experimentales describen la exposición completa de un ejemplo de la invención como se ha descrito anteriormente y no deben considerarse limitantes de ningún modo.

Ejemplo 1: identificación de nuevos biomarcadores para septicemia

- 40 Con el fin de encontrar nuevos biomarcadores para el diagnóstico de septicemia o SRIS, los presentes inventores determinaron el perfil de proteínas de muestras de sangre obtenidas de sujetos sanos humanos y muestras de sujetos que tienen septicemia o SRIS sin septicemia. El análisis se hizo usando detección por espectrometría de masas de niveles de proteína usando la plataforma de tecnología COFRADIC™ previamente publicada.

- 45 En un estudio de diseño de referencia cada muestra se mide frente a una muestra de referencia, normalmente un conjunto de todas las muestras de paciente. Para cada característica presente en una cierta muestra se obtiene una relación que representa la diferencia en veces de la intensidad de la característica en la intensidad de referencia frente a la intensidad de la característica en la muestra. El combinar todos los datos de características de todas las muestras en una matriz de expresión permite comparar intensidades de características entre muestras y entre grupos de muestras.

- 50 Para el SRIS/SEPTICEMIA se configuró el estudio de diseño de referencia 10-10 y de ahí el conjunto de referencia fue un conjunto de las 20 muestras. Se realizó un análisis de matrices intermedio después de que se ejecutaran 3 muestras de cada grupo mediante la plataforma.

Todas las muestras de suero se deslipidaron seguido de agotamiento de las proteínas más abundantes usando una columna Ig-Y12 de Beckman. La eficiencia de agotamiento se comprobó usando ELISA y análisis de transferencia

Western. El conjunto de referencia se preparó en esta etapa y esta referencia se consideró una muestra normal para el resto del procedimiento. Las muestras se prepararon para análisis MASTermind según los procedimientos COFRADIC del extremo N convencionales. El conjunto de referencia y las muestras se marcaron diferencialmente por incorporación mediada por tripsina de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, en la que las diferentes muestras llevaron la marca de oxígeno pesado y la referencia el ^{16}O . Justo antes de la clasificación por COFRADIC, cada muestra se mezcló con la referencia a masas de proteína iguales. Después de la clasificación se obtuvieron espectros de EM de separaciones NanoLC. Los datos de EM se desisotopizaron, se agruparon y las características se construyeron usando el software desarrollado internamente llamado euCatLabel. El resultado de este procesamiento de datos es una matriz de expresión que contiene todas las características de todas las muestras analizadas. Cada característica se representa por una combinación única de m/z, conjunto de clasificación por COFRADIC y tiempo de retención de NanoLC y las características pueden estar presentes en varias muestras que varían de 1 a todas. Si una característica está presente en una muestra tendrá una relación, que representa la intensidad de característica en la muestra de referencia (es decir, el pico de ^{16}O) con respecto a la intensidad en la muestra respectiva (el pico de ^{18}O). Características cuantificables recurrentes son características con una lectura de relaciones fidedignas en al menos una muestra. Para el análisis de matrices intermitentes de 3 muestras cada una, se consideraron todas las características que estuvieron tanto presentes en 5/6 muestras como estuvieron presentes en las 3 muestras del grupo de pacientes de SRIS y en ninguna de las muestras del grupo de pacientes de SEPTICEMIA.

Tras la comparación de los perfiles de proteínas, los presentes inventores pudieron identificar seis biomarcadores que estaban presentes en cantidades diferentes en la sangre de pacientes con y sin septicemia y parecieron prometedores como biomarcadores de diferenciación.

Los seis biomarcadores identificados son:

X1: receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2),

X2: pentraxina 3 (PTX-3),

X3: factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF),

X4: pro-HEPC (hepcidina) y

X5: proteína natriurética cerebral (pro-BNP) y

X6: varias histonas o fragmentos de histona (véase la Tabla 1b)

Ejemplo 2: medidas de ELISA de los biomarcadores recientemente identificados según se define en el presente documento en muestras de pacientes que padecen de SRIS o varias etapas de septicemia.

En el siguiente experimento, los biomarcadores obtenidos de los análisis de Cofradic se analizaron para su expresión diferencial en muestras de sangre de pacientes que padecían SRIS o varias etapas de septicemia, usando ELISA con anticuerpos específicos dirigidos a cada uno de los biomarcadores. Como puede apreciarse en la Tabla 2 de la presente solicitud, los presentes inventores compararon la cantidad de estos cinco biomarcadores de proteína en las diferentes muestras de sangre con dos biomarcadores de SRIS / septicemia conocidos procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP). De la tabla es evidente que los marcadores X1-X5 muestran una clara diferencia en la cantidad de proteína entre muestras de sujetos sanos y las muestras de sujetos que padecen SRIS o septicemia. Los resultados se muestran en las Figuras 1-5 para X1-X5, respectivamente.

Para la detección de pentraxina-3 humana, los presentes inventores usaron un anticuerpo monoclonal de ratón anti-pentraxina 3 humana (R&D Systems) como anticuerpo de captura unido a una fase sólida y un anticuerpo biotinilado de cabra anti-pentraxina 3 humana como anticuerpo de detección. Las muestras de septicemia y SRIS se diluyeron del siguiente modo: 22 μl de muestra + 198 μl de tampón de ensayo (carga 100 μl /pocillo). Las muestras sanas se diluyeron en una relación $\frac{1}{2}$.

La prohormona hepcidina humana se detectó usando un anticuerpo policlonal anti-pro-hepcidina humana (DRG) como anticuerpo de captura y un fragmento de pro-hepcidina conjugado con biotina como conjugado en una configuración de ELISA competitivo. Las muestras de septicemia y de SRIS se diluyen del siguiente modo: 60 μl de muestra + 60 μl de tampón de ensayo (carga 50 μl /pocillo). Las muestras sanas se diluyeron en una relación $\frac{1}{2}$.

Para la detección de Pro-BNP humana, un fragmento de anticuerpo anti-BNP policlonal (8-29) (Biomedica) se usó como anticuerpo de captura y un fragmento de BNP sintético acoplado a HRP se usó como conjugado en una configuración de ELISA competitivo. Las muestras de septicemia y SRIS se diluyen del siguiente modo: 150 μl de muestra + 300 μl de tampón de ensayo (carga 200 μl /pocillo). Las muestras sanas se diluyeron en una relación $\frac{1}{2}$.

M-CSF se detectó usando un anticuerpo monoclonal de ratón contra M-CSF humano (R&D systems) como anticuerpo de captura y un anticuerpo policlonal contra M-CSF humano conjugado con HRP como anticuerpo de detección. Las muestras de septicemia y SRIS se diluyen del siguiente modo: 44 μl de muestra + 176 μl de tampón de ensayo (carga 100 μl /pocillo). Las muestras sanas se diluyeron en una relación $\frac{1}{2}$.

Finalmente, sTNF-RII se detectó usando un anticuerpo monoclonal de ratón contra sTNF-RII humano (R&D systems) como anticuerpo de captura y un anticuerpo policlonal contra sTNF-RII humano conjugado con HRP como anticuerpo de detección. Las muestras de septicemia y SRIS se diluyen del siguiente modo: 14 µl de muestra + 406 µl de tampón de ensayo (carga 200 µl/pocillo). Las muestras sanas se diluyeron en una relación 1/2.

	Marcadores conocidos		Biomarcadores recientemente identificados				
Marcador	PCT (ng/ml)	CRP (µg/ml)	Pro-BNP (ng/ml)	PTX-3 (ng/ml)	Pro-HEPC (ng/ml)	sTNFR2 (ng/ml)	M-CSF (ng/ml)
Septicemia (n=11)	53	287	9,3	47,7	2,8	102	9,7
DE			3,5	28,5	1,9	40	6,3
SRIS (n=9)	6	236	4,0	8,8	1,4	157	3,3
DE			2,5	4,5	1,1	49	1,4
Sanos (n=4)			1,9	0,9	0,3	339	2,8
DE			0,3	0,3	0,1	27	0,5

n = número de sujetos probados / DE = desviación estándar

- 5 Como puede derivarse de las Figuras 1-5, los biomarcadores según se define en el presente documento son todos valiosos para distinguir afecciones de SRIS de afecciones de septicemia. De los cinco marcadores identificados según se define en el presente documento, pro-BNP (Figura 5), PTX3 (Figura 2) y pro-HEPC (Figura 4) parecen ser los más valiosos en diferenciar entre septicemia y SRIS, mientras que los resultados para M-CSF y sTNFR2 son menos convincentes debido a las altas variaciones en las mediciones entre diferentes pacientes (véanse las Figuras 3 y 1).
- 10 Aunque el número de pacientes probados es todavía bajo, los presentes inventores creen que los marcadores identificados en el presente documento muestran resultados muy prometedores y serán muy útiles en el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico para distinguir entre septicemia y SRIS.

Ejemplo 3: prueba de las características predictivas de diferentes combinaciones de los biomarcadores identificados.

- 15 Con el fin de probar la potencia predictiva de los marcadores identificados, los presentes inventores emplearon un marco de clasificación a diferencia de un enfoque estadístico de resumen. Se induce un clasificador a partir de los datos que implementan un modelo que puede entonces usarse para predecir la clase (septicemia/SRIS) de un nuevo paciente. El error de generalización (un cálculo estimado de cómo el clasificador actuará sobre nuevos pacientes) se calcula usando error dejando uno fuera. El conjunto de datos de las medidas de ELISA se facilita en la Tabla 3. Obsérvese que los
- 20 presentes inventores incluyeron medidas de ELISA de tanto PCT como CRP, dos biomarcadores conocidos y ampliamente usados para septicemia.

	Marcador	PCT	CRP	sTNFR2	PTX-3	M-CSF	Pro-HEPC	pro-BNP
Paciente	Clase			X4	X2	X5	X3	X1
HGE67	SEPTICEMIA	128,5	369	12,25	54,015	5,91	52,62	9,84
UGE22	SEPTICEMIA	226,1	224	9,59	72,085	2,727	138,19	18,21
HGE74	SEPTICEMIA	5,2	335	6,82	17,937	2,022	73,9	3,86
UGE41	SEPTICEMIA	4,5	347	7,89	15,945	3,62	105,78	5,71
UGE10	SEPTICEMIA	27,37	197	11,1	26,519	1,17	133,27	21,46
UGE14	SEPTICEMIA	51,00	297	9,96	53,807	5,69	155,26	9,13
UGE50	SEPTICEMIA	23,43	288	15,74	40,763	*	62,32	0,00
HGE73	SEPTICEMIA	46,70	225	4,3	16,94	1,19	82,69	4,68
UGE45	SEPTICEMIA	9,33	247	5,22	49,435	1,11	114,36	4,71

(continuación)

	Marcador	PCT	CRP	sTNFR2	PTX-3	M-CSF	Pro-HEPC	pro-BNP
Paciente	Clase			X4	X2	X5	X3	X1
HGE63	SEPTICEMIA	46,76	257	12,66	68,764	*	153,57	0,00
HGE81	SEPTICEMIA	11,73	373	6,24	108,419	2,07	52,01	8,79
UGE12	SRIS	2,46	174	2,54	7,012	0,91	114,81	2,71
UGE17	SRIS	1,41	177	1,72	6,837	*	173,35	0,00
UGE20	SRIS	9,62	280	2,16	3,007	0,644	220,93	1,78
UGE32	SRIS	24,86	286	5,34	17,158	0,844	149,96	2,47
UGE40	SRIS	1,10	155	9,44	13,575	2,006	85,1	5,42
UGE42	SRIS	1,39	328	3,44	7,476	0,621	186,43	4,20
UGE46	SRIS	2,99	412	6,15	12,197	3,91	203,89	2,93
UGE53	SRIS	7,30	108	2,83	5,366	0,64	182,65	4,84
UGE60	SRIS	0,21	208	2,63	6,953	1,35	95,13	2,07

* Los datos de MCF ausentes se incluyen por media de columna.

Los presentes inventores predijeron la capacidad de los diferentes biomarcadores, tanto solos como en combinación, para diferenciar entre muestras de sangre obtenidas de pacientes que tienen SRIS o septicemia. Los resultados se facilitan en las Figuras 6-12. Las representaciones muestran medidas de ELISA para PCT, CRP, pro-hepcidina, M-CSF, proBNP, TNRF2 y PTX3 (en ese orden). Los rectángulos representan septicemia, los triángulos representan SRIS. La línea negra muestra el umbral óptimo calculado a partir de todos los pacientes usando entropía.

Para predecir la potencia diferenciadora de los marcadores, los presentes inventores usaron un clasificador lineal simple inducido a partir de los datos usando solo una proteína. Los árboles de decisión representan un enfoque supervisado a la clasificación. Un árbol de decisión es una estructura simple en la que nodos no terminales representan pruebas en uno o más atributos y nodos terminales reflejan resultados de decisión. J.R. Quinlan ha popularizado el enfoque de árboles de decisión con esta investigación que abarca más de 15 años. La implementación del dominio público más reciente del modelo de Quinlan es C4.5. El paquete de clasificador de Weka tiene su propia versión de C4.5 conocido como J48. El programa 1R es normal en la mayoría de los sentidos. Clasifica atributos según la tasa de errores (en el conjunto de entrenamiento), a diferencia de la medida basada en entropía usada en C4. Trata todos los atributos numéricamente evaluados como continuos y usa un procedimiento directo para dividir el intervalo de valores en varios intervalos disjuntos. Manipula valores ausentes tratando "ausente" como un valor legítimo.

Como se ha explicado anteriormente, los presentes inventores pueden calcular el error de generalización de tal clasificador usando LOO:

<i>proteína</i>	<i>J48</i>	<i>OneR</i>
PCT	20 %	15 %
CRP	35 %	45 %
sTNRF2	30 %	20 % (corregido)
M-CSF	25 %	35 %
pro-HEPC	25 %	40 %
pro-BNP	30 %	30 %
PTX3	20 %	5 %

Así, como proteína individual PTX3 parece proporcionar la mejor discriminación usando el procedimiento de inducción del clasificador OneR, seguido de PCT. Los presentes inventores también observan que no hay un mejor procedimiento de inducción. La diferencia entre ambos procedimientos está principalmente en la forma en la que se calcula el valor umbral óptimo.

5 A continuación, los presentes inventores miraron combinaciones de proteínas. Para esto los presentes inventores emplean una máquina vectorial de soporte lineal (LSVM) que implementa un procedimiento de inducción del clasificador de gran margen. La LSVM induce un clasificador de los datos que es muy similar al clasificador de línea negra mostrado anteriormente. Pero el umbral lineal se calcula en un espacio 7-dimensional (el espacio de las 7 medidas de ELISA) en lugar de un espacio 1-dimensional. Como tal, el clasificador no es una línea simple, sino un hiperplano en el espacio 7-dimensional. El clasificador de LSVM alcanza un error de LOO del 15 % si se usan las 7 medidas de ELISA (esto se diferencia del 10 % informado antes debido a permutas en los datos de M-CSF).

10 A continuación, un procedimiento de evaluación del subconjunto característico se usó para clasificar las proteínas según el rendimiento de discriminación combinado. Como los presentes inventores tienen muy pocos datos, el parámetro de coste C de LSVM se fija a un valor por defecto de 1. El resultado:

Información de la ejecución:

Evaluador: weka.attributeSelection.ClassifierSubsetEval -B weka.classifiers.functions.SMO -T -H "Haga clic para finalizar fuera o para ejemplos de prueba" -C 1.0 -E 1.0 -G 0.01 -A 250007 -L 0.0010 -P 1.0E-12 -N 0 -V -1 -W 1

Búsqueda: weka.attributeSelection.ExhaustiveSearch

15 **Relación:** ELISA-weka.filters.unsupervised.attribute.Remove-R1-weka.filters.unsupervised.attribute.Normalize

Casos: 20

Atributos: 8

PCT

CRP

20 sTNFR2

PTX3

M-CSF

proHEPC

pro-BNP

25 clase

Modo de evaluación: validación cruzada 20 veces

Selección de atributo validación cruzada 20 veces (estratificada), semilla: 1 número de atributo en veces (%)

5 (25 %)	1 PCT
9 (45 %)	2 CRP
9 (45 %)	3 sTNFR2
14 (70 %)	4 PTX3
3 (15 %)	5 M-CSF
17 (85 %)	6 proHEPC
7 (35 %)	7 pro-BNP

Sorprendentemente, la pro-hepcidina es la más relevante. Esto indica que es complementaria a las otras proteínas. PTX3 también muestra una excelente potencia de discriminación combinada.

30 Usando PTX3 y pro-HEPC en un clasificador de LSVM se consigue el 10 % de error de LOO. La adición de cualquiera de las proteínas individuales aumenta el error de LOO. La representación en la Figura 13 muestra medidas de ELISA para ambas proteínas (PTX3 = eje y; pro-HEPC = eje x), mostrando algún comportamiento complementario entre ambas proteínas. Usando PCT, pro-HEPC y sTNFR2 en un clasificador de LSVM también se consigue el 10 % de error de LOO. La representación en la Figura 14 muestra alguna correlación entre PCT y PXT3 (PTX3 = eje y). En conclusión, los
 35 presentes inventores ven que el biomarcador PTX3 muestra el mejor error de generalización individual, mejor que el conocido biomarcador PCT. La combinación de PTX3 y pro-HEPC da mejores resultados, el procedimiento de submuestreo muestra varianza del error de LOO aceptable para el clasificador de PTX3 + pro-HEPC. Una combinación del marcador de PCT conocido con los biomarcadores de pro-HEPC y sTNFR2 actúa mejor.

Ejemplo 4: prueba de la potencia predictiva de los componentes de histonas

5 También se seleccionaron proteínas histonas para estudios de validación adicionales, sin embargo, no hay ELISA disponible, de ahí que los ensayos de verificación basados en EM (MRM) se hayan fijado. El enfoque de ensayo de MRM (monitorización de múltiples reacciones) se ha aplicado previamente a la medición de péptidos específicos en mezclas complejas tales como digestos tripticos en plasma. Un ensayo tal requiere solo el conocimiento de las masas del péptido seleccionado y sus iones fragmento y una capacidad para preparar la versión marcada con isótopos estable.

10 Como la sensibilidad de estos ensayos está limitada por el intervalo dinámico del espectrómetro de masas y por la capacidad y resolución de la(s) separación/separaciones por cromatografía auxiliar, los presentes inventores también podrían usar procedimientos que acoplan ensayos de MRM con enriquecimiento de proteínas por inmunoagotamiento y cromatografía de exclusión por tamaño o enriquecimiento de péptidos por captura de anticuerpos. En esencia, el último enfoque usa el espectrómetro de masas como "segundo anticuerpo" que tiene especificidad estructural absoluta. Se ha mostrado extender la sensibilidad de un ensayo peptídico al menos dos órdenes de magnitud y con el posterior desarrollo parece que puede extenderse el procedimiento de MRM para cubrir el intervalo dinámico conocido completo del plasma (es decir, al nivel de pg/ml).

15 Varias publicaciones y documentos de patente se citan en la presente solicitud con el fin de describir más completamente el estado de la técnica a la que se refiere la presente invención.

Listado de secuencias

<110> PRNOTA N.V.

20 <120> BIOMARCADORES Y PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO, PREDICCIÓN Y/O PRONÓSTICO DE SEPTICEMIA Y USOS DE LOS MISMOS

<130> PRNO-019-EP-DIV

<150> 08850110.1

<151> 12-11-2008

<150> 07120929.0

25 <151> 16-11-2007

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 24

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<220>

35 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN

<400> 1

Ser Glu Thr Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Glu Lys
1 5 10 15

Thr Pro Val Lys Lys Lys Ala Arg
20

40 <210> 2

ES 2 486 268 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 8

5

Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys Pro Ala Ile Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. El uso de proteínas histonas como biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y/o predicción de septicemia frente a síndromes de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) en una muestra de sangre de un sujeto humano.
- 5 2. Un procedimiento de distinción entre una afección de septicemia y síndromes de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) en un sujeto humano que comprende:
 - (a) medir el nivel de proteínas histonas en una muestra de sangre tomada de dicho sujeto; y
 - (b) comparar dicho nivel de proteínas histonas con un nivel de referencia de dichas proteínas histonas obtenido de un paciente que tiene SRIS, en el que las proteínas histonas se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en histona H1.4, histona H2A, histona H2B, histona H3, histona H4 e isoformas de las mismas, en el que la elevada
 10 detección de proteínas histonas en la muestra con respecto a dicho nivel de referencia indica que el paciente está en riesgo de padecer septicemia o septicemia grave en vez de SRIS.
- 15 3. Un procedimiento de monitorización del progreso del tratamiento o intervención de un sujeto humano en el que se ha detectado septicemia, o de determinación de si un sujeto humano en el que se ha detectado septicemia es sensible o no a tratamiento para septicemia, que comprende medir la cantidad de una o más proteínas histonas en muestras de sangre del sujeto tomadas en diferentes momentos de tiempo durante el tratamiento, en el que preferentemente dichas
 15 proteínas histonas están seleccionadas del grupo que consiste en: histona H1.4, histona H2A, histona H2B, histona H3, histona H4 e isoformas de las mismas.
- 20 4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que una normalización de dicho uno o más niveles de proteína histona en dicha muestra indica recuperación de septicemia,
- 20 5. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que un perfil de proteínas histonas alterado en la muestra tomada durante el tratamiento es indicativo de la sensibilidad del sujeto al tratamiento con la sustancia.
6. El uso de un kit que comprende:
 - a) una o más moléculas de unión a proteínas histonas, seleccionadas del grupo que consiste en: histona H1.4, histona
 25 H2A, histona H2B, histona H3, histona H4 e isoformas de las mismas; y
 - (b) un valor de referencia de la cantidad de los biomarcadores seleccionados en un paciente que tiene SRIS para comparación de los resultados, para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia frente a SRIS, en el que la molécula de unión está seleccionada preferentemente del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales, anticuerpos
 25 policlonales, aptámeros, fotoaptámeros, proteínas de interacción específica y moléculas pequeñas de interacción específica.
- 30 7. El procedimiento según la reivindicación 2, que comprende:
 - (a) obtener un perfil de biomarcadores candidatos de una muestra de sangre tomada de dicho sujeto en el que dicho
 30 perfil de biomarcadores candidatos se basa en una o más proteínas histonas seleccionadas del grupo que consiste en histona H1.4, histona H2A, histona H2B, histona H3, histona H4 e isoformas de las mismas y (b) comparar dicho perfil de candidatos con un perfil de biomarcadores de referencia.
- 35 8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que el perfil de biomarcadores de referencia comprende un intervalo de valores normales de biomarcadores seleccionados en sujetos de control que tienen SRIS, por lo que un aumento en la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra a un nivel superior al intervalo de valores normales de biomarcadores seleccionados es indicativo de septicemia, o en el que el perfil de biomarcadores de referencia
 35 comprende un intervalo de valores de biomarcadores seleccionados obtenido de sujetos con septicemia, por lo que una cantidad comparable de los biomarcadores seleccionados en dicha muestra para el intervalo de valores de los biomarcadores seleccionados en sujetos con septicemia es indicativo de septicemia.
- 40 9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra es suero, o plasma.
- 45 10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de proteínas histonas o el perfil de biomarcadores se establece usando tecnología de inmunoensayo seleccionada del grupo de tecnologías de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA múltiple, radioinmunoensayo o ELISPOT, o usando procedimientos de análisis de espectrometría de masas (EM) de las proteínas presentes en dicha muestra, preferentemente monitorización de múltiples reacciones (MRM).

Figura 1

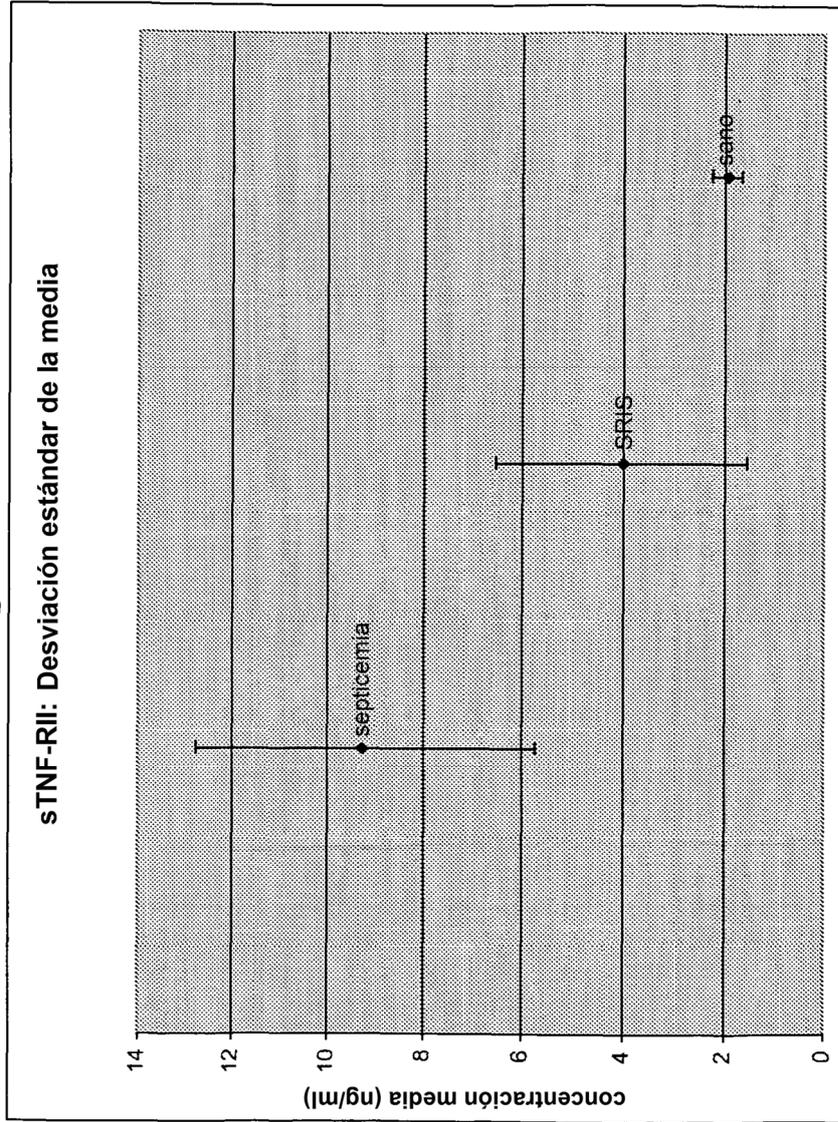


Figura 2

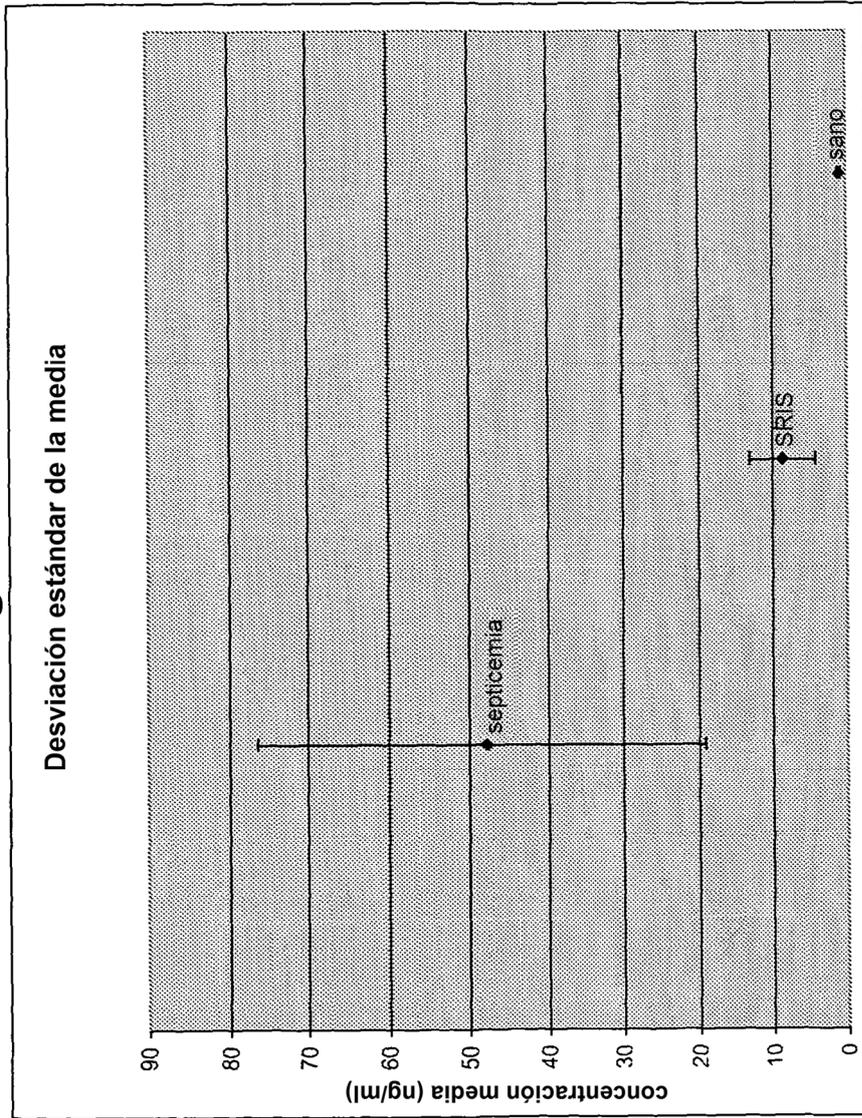


Figura 3

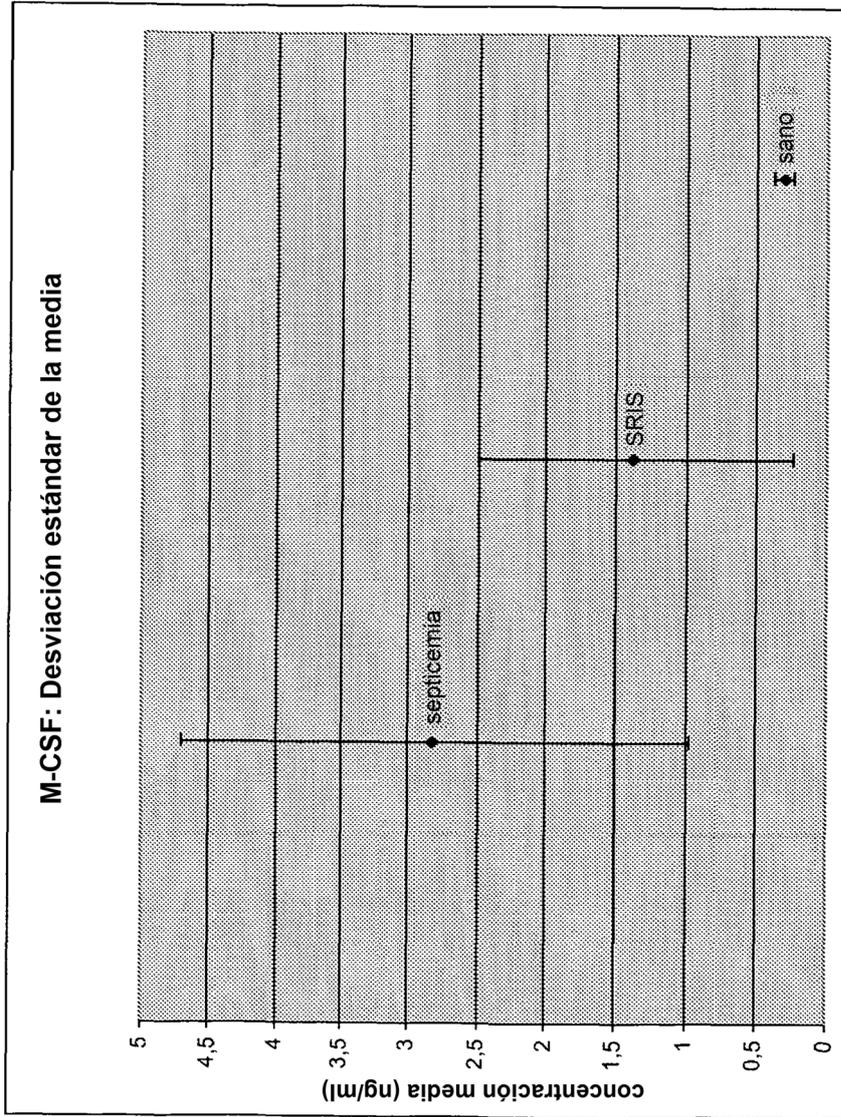


Figura 4

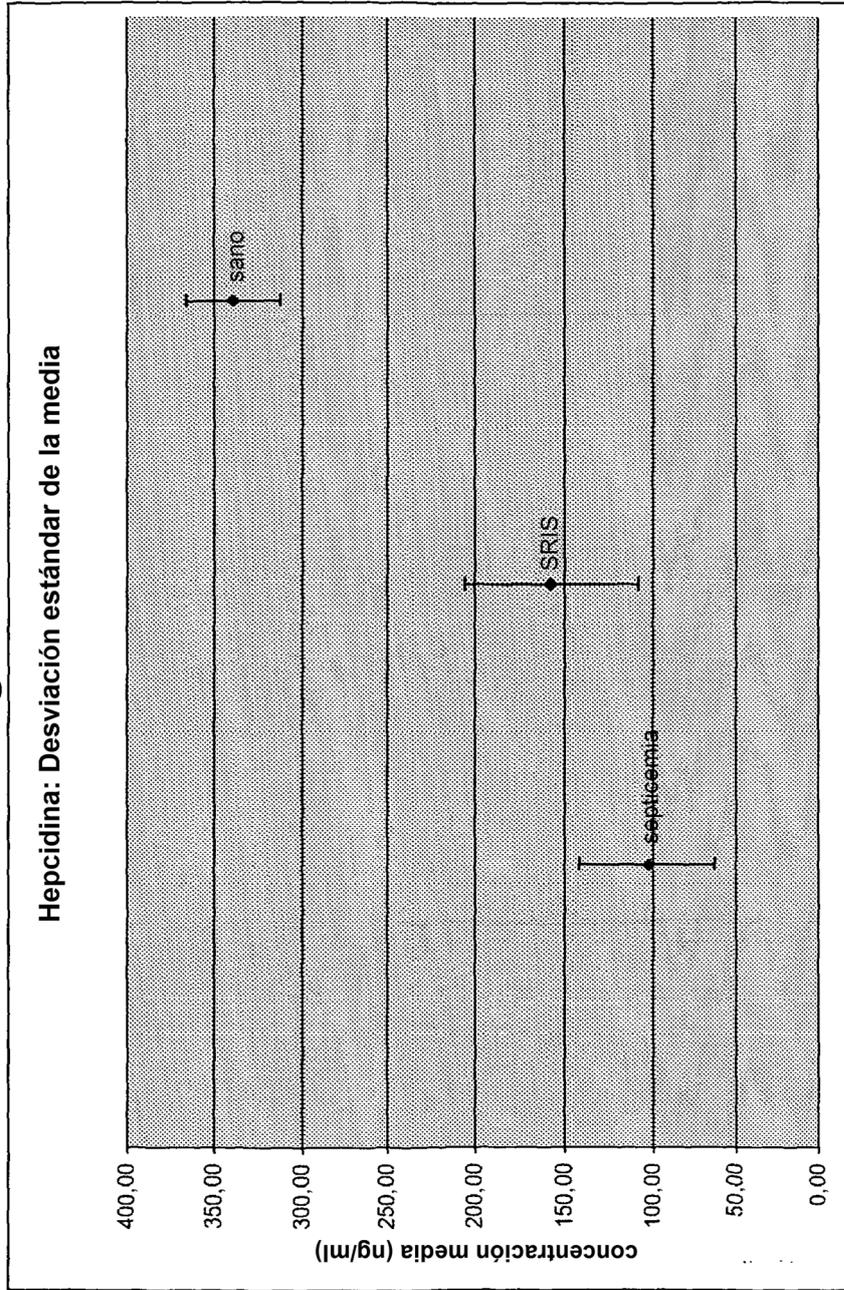


Figura 5

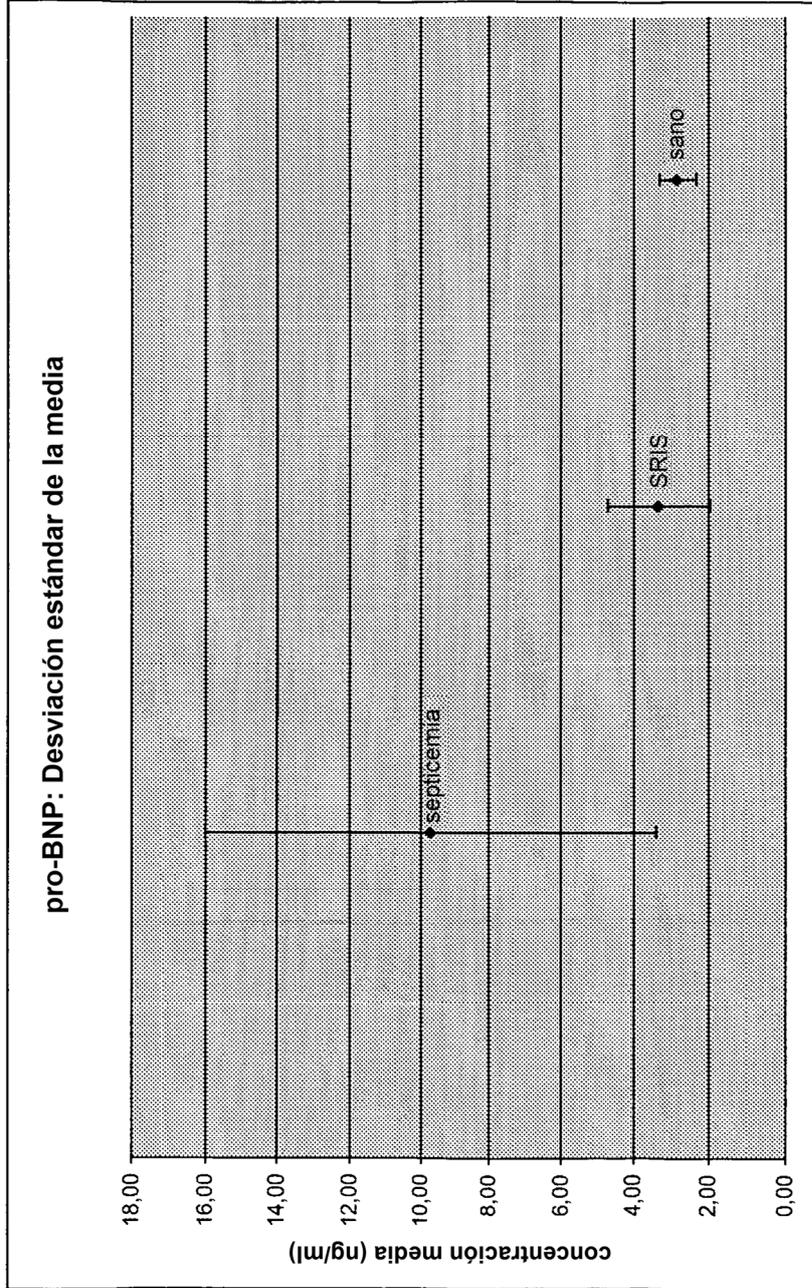


Figura 6b: logPCT

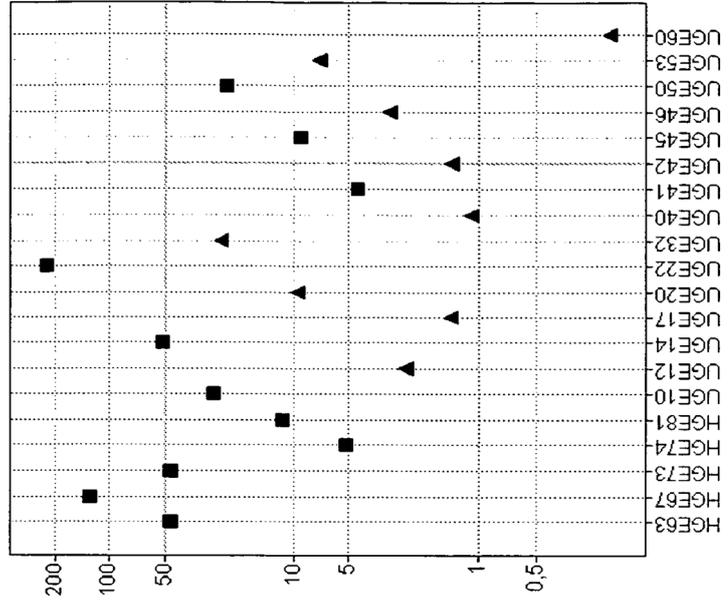


Figura 6a: PCT

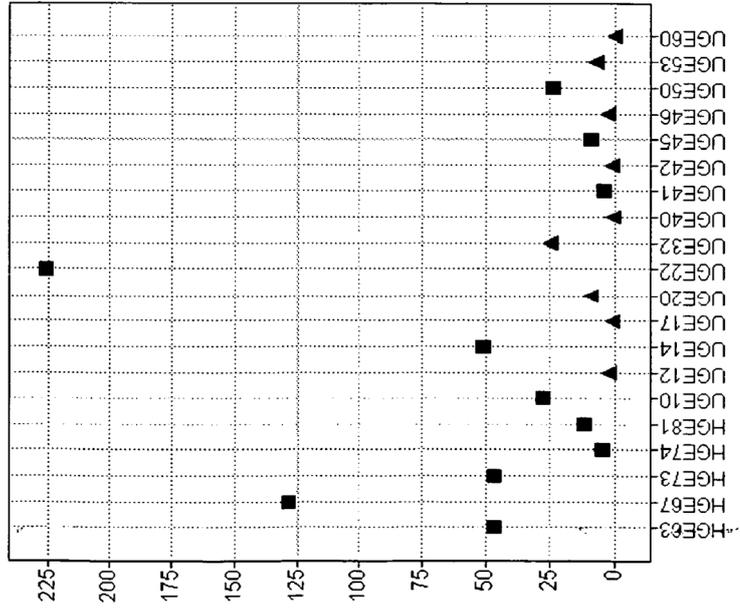


Figura 7: CRP

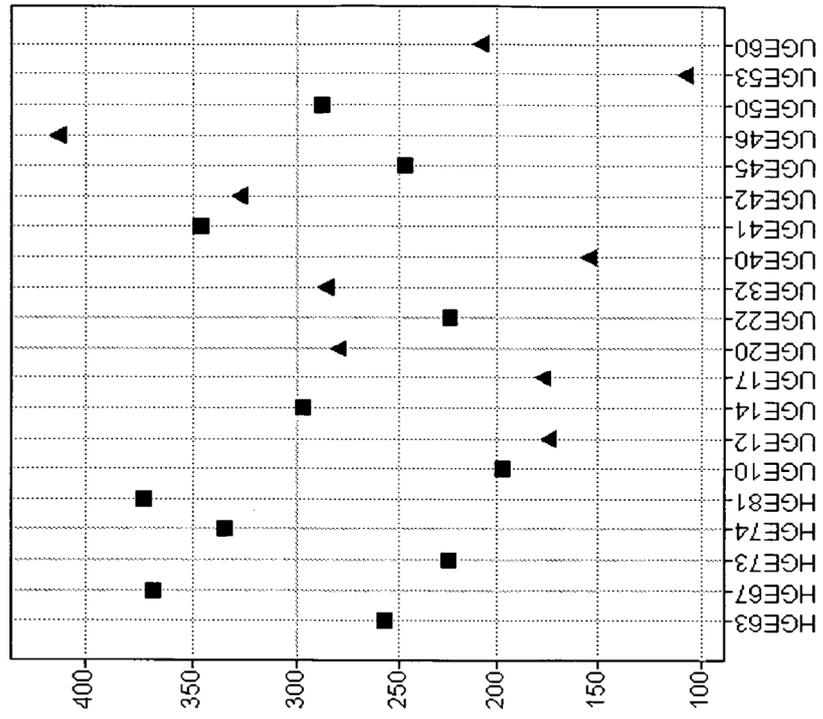


Figura 8: sTNFR2

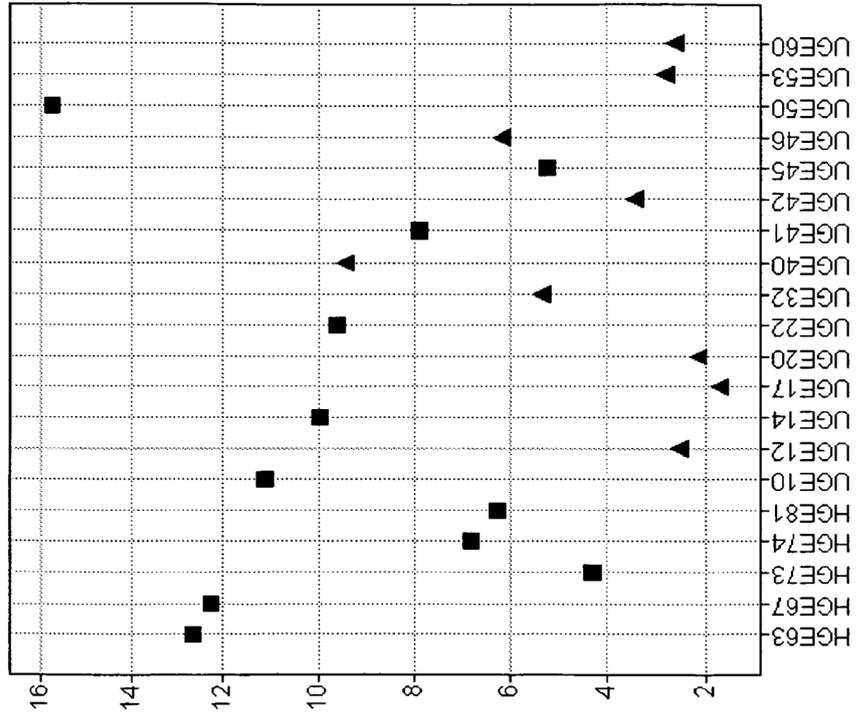


Figura 9: M-CSF

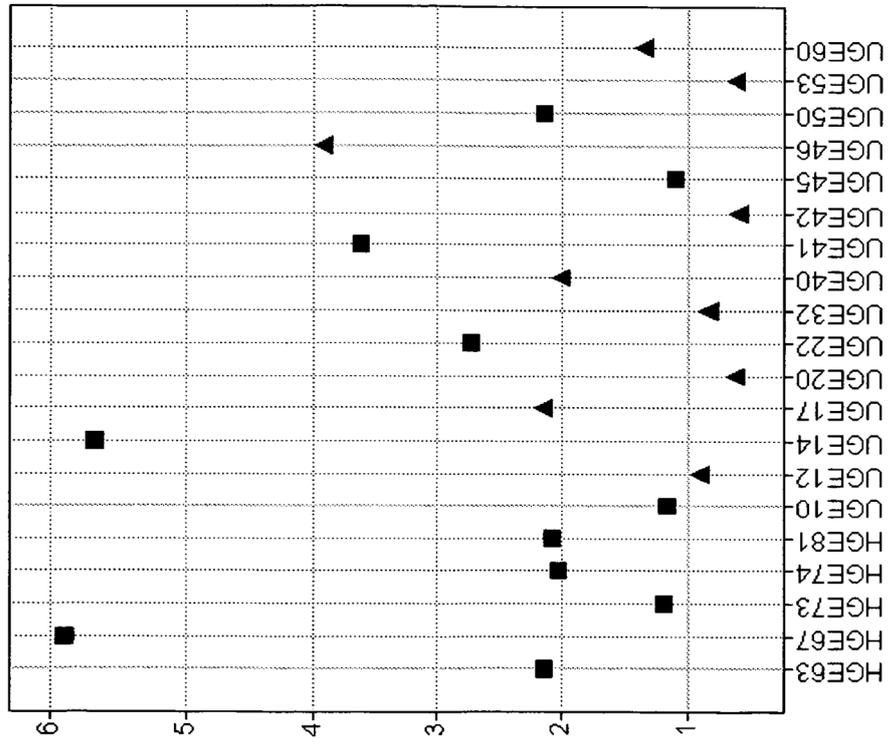


Figura 10: Pro-HEPC

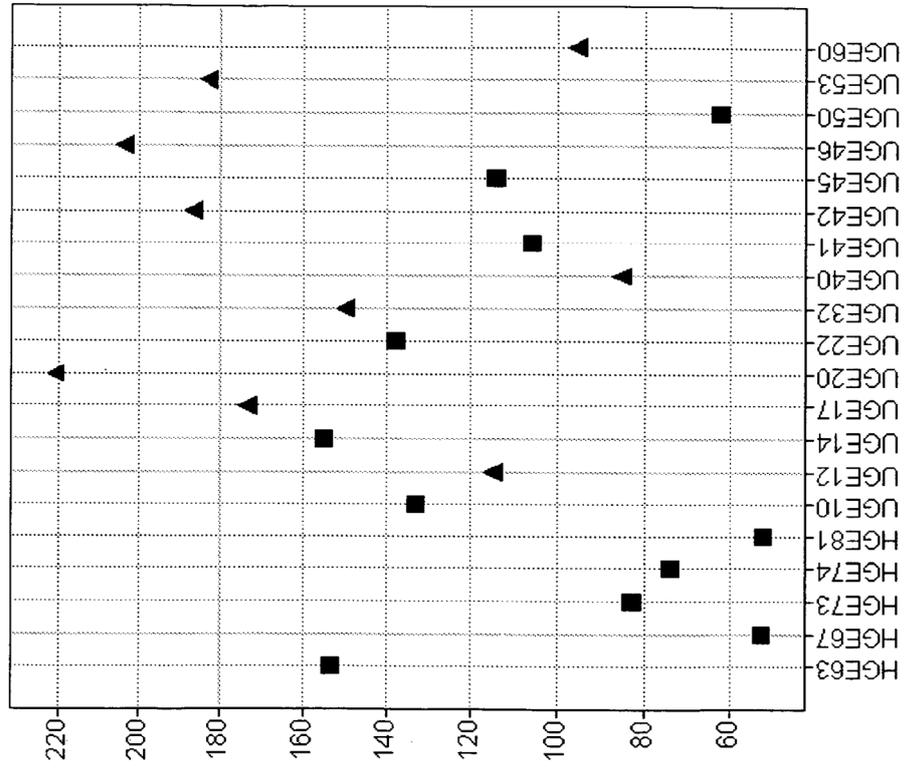


Figura 11: Pro-BNP

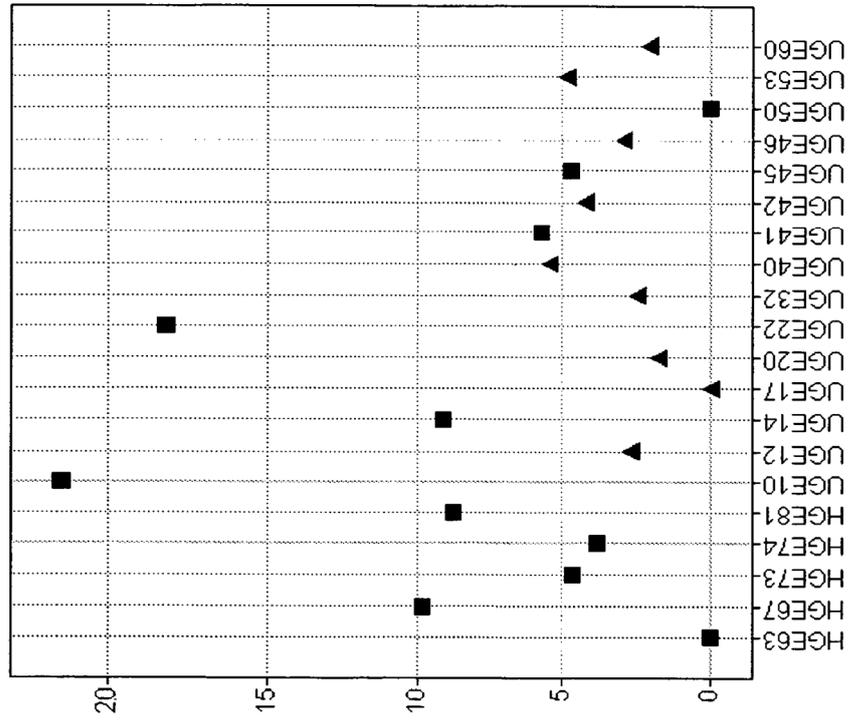


Figura 12b: logPTX3

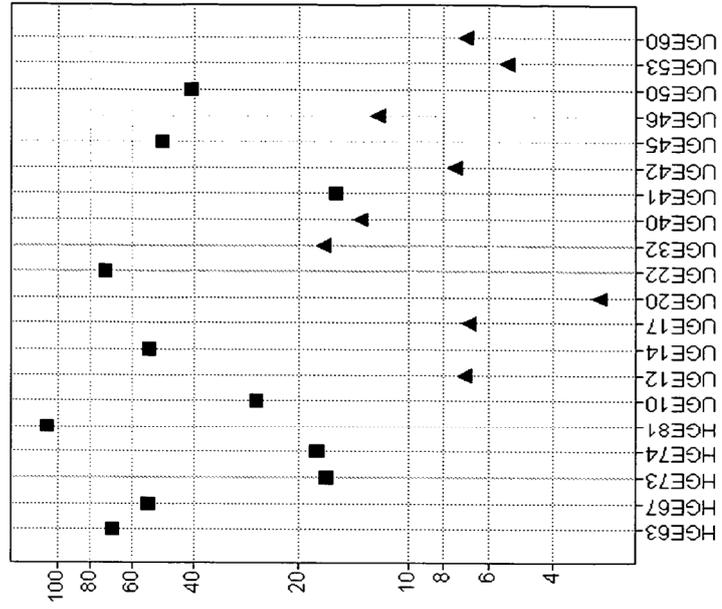


Figura 12a: PTX3

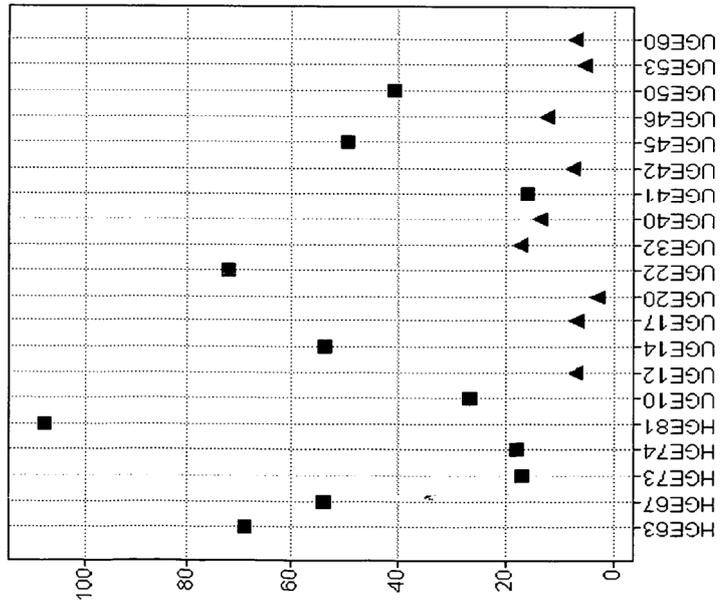


Figura 13:

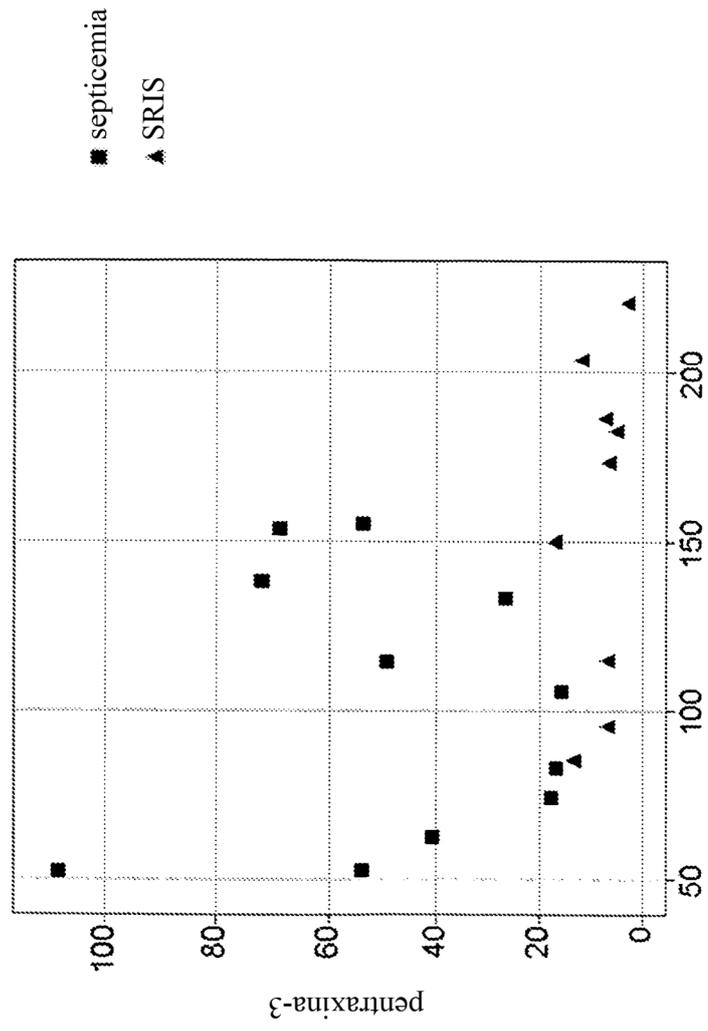


Figura 14:
Diagrama de dispersión

