

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 506 116**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2009 E 09749849 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2300829**

54 Título: **Nuevo biomarcador para diagnóstico, predicción y/o pronóstico de septicemia y usos del mismo**

30 Prioridad:

23.05.2008 EP 08156837

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

13.10.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KAS, KOEN y
VANPOUCKE, GRIET**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 506 116 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

Nuevo biomarcador para diagnóstico, predicción y/o pronóstico de septicemia y usos del mismo

Campo de la invención

5 La invención se refiere a biomarcadores a base de proteínas y/o péptidos y a moléculas que se unen específicamente a los mismos para su uso en diagnóstico, pronóstico y predicción de enfermedad o determinación de un estado particular en un sujeto. En particular, se abarcan en la invención determinados péptidos o proteínas como biomarcadores para septicemia y métodos para el uso de los mismos en diagnóstico, pronóstico y/o predicción de la aparición de septicemia incluyendo métodos que implican determinar una expresión aumentada, disminuida o alterada de dichos biomarcadores en una muestra de un sujeto.

10 Antecedentes a la invención

15 En muchas enfermedades y estados, un desenlace positivo de tratamiento y/o profilaxis se correlaciona fuertemente con un diagnóstico temprano y/o exacto de la enfermedad o el estado. Sin embargo, a menudo no existen métodos eficaces de diagnóstico temprano y por tanto los tratamientos a menudo se administran demasiado tarde, de manera inapropiada o a individuos que no se beneficiarán de los mismos. Como resultado, muchos fármacos que pueden ser beneficiosos para algunos pacientes pueden funcionar mal, no funcionar en absoluto o presentar un efecto adverso en otros pacientes. Por tanto, existe la necesidad de estrategias innovadoras que permitan la detección, predicción, pronóstico, diagnóstico y tratamiento tempranos de enfermedades y otros estados biológicos. También existe la necesidad de determinar la capacidad, o incapacidad, de un paciente a tolerar medicamentos o tratamientos.

20 La septicemia se denomina más comúnmente infección del torrente sanguíneo o toxemia. Es la presencia de bacterias (bacteriemia), organismos infecciosos o sus toxinas en la sangre u otros tejidos del cuerpo. La septicemia se produce a menudo en pacientes que padecen síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), como resultado, por ejemplo, de intervención quirúrgica, traumatismo, quemaduras, pancreatitis y otros acontecimientos no infecciosos que provocan que se produzca una inflamación. El SIRS combinado con una infección se denomina
25 septicemia y puede producirse en muchos grados diferentes de gravedad. La infección puede producirse simultáneamente con la aparición del SIRS, por ejemplo, debido a la infección de una herida o traumatismo o puede producirse más tarde debido a la presencia latente de un organismo infeccioso. La septicemia puede asociarse con síntomas clínicos de enfermedad sistémica (generalizada), tales como fiebre, escalofríos, malestar, hipotensión arterial y cambios del estado mental. La septicemia puede ser una situación grave, a menudo una enfermedad potencialmente mortal que requiere asistencia urgente y extensa. El tratamiento depende del tipo de infección, pero habitualmente empieza con antibióticos o medicamentos similares.

30 Ya que la septicemia puede ser el resultado de una infección por una amplia variedad de organismos, es un estado que es particularmente difícil de predecir y diagnosticar lo suficientemente temprano para una intervención eficaz. Es una respuesta inflamatoria en exceso y sin control en un individuo que resulta habitualmente de una respuesta inapropiada del sistema inmunitario del individuo a un organismo patógeno. Además, pueden no existir números significativos de organismos en sitios accesibles o en líquidos corporales del individuo afectado, aumentando por tanto 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 una intervención temprana y eficaz. La diferenciación entre pacientes que corren el riesgo de desarrollar septicemia y aquéllos que no, también ayudará en el manejo del estado patológico. En particular, la capacidad de distinguir SIRS de septicemia en un paciente es altamente deseable, por ejemplo en un entorno clínico para pacientes que se someten a
40 intervención quirúrgica o trasplante, que padecen traumatismo, etc. que tienen que monitorizarse durante y/o tras su estancia en el hospital.

45 Por tanto, existe una necesidad inmediata de la identificación de biomarcadores que puedan medirse y sean específicos para el estado, e indicativos del riesgo de la progresión a, o aparición temprana de, septicemia así como métodos para usar dichos marcadores en selección.

50 Los biomarcadores son indicadores biológicos que señalan un estado fisiológico cambiado debido a una enfermedad o intervención terapéutica. Se ha demostrado que determinadas sustancias, incluyendo proteínas y péptidos, se expresan de manera diferencial en muestras de tejido y líquido corporal con enfermedad en determinados estados tales como septicemia, en comparación con muestras de tejido y líquido corporal normales. Por tanto, proteína(s)/péptido(s) expresado(s) de manera diferencial presente(s) en (o ausente(s) de) muestras con enfermedad de un paciente, mientras que está(n) ausente(s) de (o presente(s) en) tejido normal, es/son biomarcador(es) candidato(s) para esa enfermedad o estado.

55 A menudo un solo biomarcador individual puede ser insuficiente para el diagnóstico exacto de una enfermedad o estado, especialmente uno tan complejo como la septicemia. Como resultado existe la necesidad continua de la identificación de biomarcadores que puedan usarse para identificar u obtener el perfil del estado en diversos estadios en su patología.

5 El único biomarcador de diagnóstico aprobado por la FDA actualmente disponible para distinguir septicemia de causas no infecciosas de síndromes de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) es la procalcitonina (PCT). Sin embargo, el rendimiento de diagnóstico y pronóstico de PCT es bastante bajo tal como se mostró en un informe reciente de Tang y colaboradores (Tang B.M.J. *et al.*, *The Lancet* vol. 7: pág. 210-217, 2007), que indica que la prueba de procalcitonina no puede distinguir con exactitud septicemia de SIRS en pacientes adultos con enfermedad crítica.

La proteína C reactiva es un marcador ampliamente usado adicional para diagnosticar septicemia, pero no puede distinguir entre septicemia y SIRS sin infección.

10 El documento WO 2005/071408 describe un método de diagnóstico de enfermedad de origen bacteriano o fúngico en un sujeto, método que comprende la etapa de medir el nivel de la forma soluble de TREK-1 (sTREM-1) en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto.

Lu *et al.* (2006, *Hybridoma*, vol. 25, n.º 1, páginas 20-26) describe la preparación y caracterización de anticuerpo monoclonal frente a la proteína transcrito similar a TREM-1 (TLT-1).

15 El documento US 2004/180409 describe moléculas de ácido nucleico aisladas, denominadas moléculas de ácido nucleico de TLT-1, que codifican para receptores inhibidores expresados en plaquetas. El documento US 2004/180409 también describe moléculas de ácido nucleico antisentido, vectores de expresión recombinante que contienen moléculas de ácido nucleico de TLT-1, células huésped en las que se han introducido los vectores de expresión y animales transgénicos no humanos en los que se ha introducido o perturbado un gen de TLT-1. El documento US 2004/180409 describe todavía adicionalmente proteínas TLT-1 aisladas, proteínas de fusión, péptidos antigénicos, anticuerpos anti-TLT-1 y métodos de diagnóstico que usan las composiciones.

20 Washington (2006, recuperado de Internet: <http://www.aniara.com/pdf/literature/aniaragrnt2006.pdf>) describe el anuncio del ganador del Aniara Grant 2006. El resumen completo describe que se espera ver una correlación positiva de la presencia del fragmento soluble (es decir de TLT-1) y la progresión de septicemia y, a medida que se recuperan los pacientes, se espera ver una disminución en la cantidad de TLT-1 soluble.

25 Ahora, los inventores han desarrollado métodos que permiten una rápida cuantificación, cualificación y comparación de perfiles de proteínas y péptidos derivados de diferentes muestras biológicas y, como resultado, han identificado biomarcadores novedosos para diagnóstico, pronóstico y/o predicción de septicemia y sus diferentes estadios.

Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona nuevos biomarcadores para la septicemia que permiten al doctor o al médico una predicción, pronóstico y diagnóstico más exactos de SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), septicemia, septicemia grave o MODS (puntuación de disfunción orgánica múltiple) o que pueden diferenciar entre dichos estados diferentes y métodos para una predicción, pronóstico y/o diagnóstico exactos, rápidos y sensibles de dichos estados diferentes a través de (1) una medición de la cantidad o calidad de uno o más de dichos biomarcadores tomados de una muestra biológica de un sujeto de referencia, ya sea un sujeto sano o un paciente que tiene SIRS, septicemia, septicemia grave o MODS para proporcionar un "perfil de biomarcadores de referencia" para dichos biomarcadores que es indicativo del estado respectivo y (2) a través de 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 SIRS, septicemia, septicemia grave o MODS o que corre el riesgo de desarrollar cualquiera de estos estados o se encuentra en un estadio particular en la progresión de septicemia.

35 Puede obtenerse un "perfil de biomarcadores de referencia" 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 un estadio particular en la progresión de septicemia o (3) que tienen SIRS sin infección. Si el perfil de biomarcadores del sujeto de prueba contiene rasgos característicos del perfil de biomarcadores de la población de referencia, entonces puede diagnosticarse respectivamente que el individuo (1) está sano, (2) corre el riesgo de desarrollar septicemia, tiene septicemia o está en el estadio particular en la progresión de septicemia o (3) tiene SIRS. El perfil de biomarcadores de referencia también puede obtenerse de diversas poblaciones de individuos incluyendo aquéllos que están padeciendo SIRS o aquellos que están padeciendo una infección pero que no están padeciendo SIRS. Por consiguiente, la presente invención permite al médico distinguir entre aquellos pacientes que tienen SIRS pero que no es probable que desarrollen septicemia grave, que tienen septicemia o que corren el riesgo de desarrollar septicemia.

40 La presente invención proporciona el contenido expuesto en una cualquiera y la totalidad de las reivindicaciones adjuntas 1 a 13. La memoria descriptiva proporciona además un método para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o de la diferenciación entre SIRS 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 transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), uno de los biomarcadores identificados en el presente documento, 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 SIRS.

5 La memoria descriptiva también proporciona un método para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o la diferenciación entre SIRS 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 transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil candidato con un perfil de biomarcadores de referencia obtenido de un sujeto sano o un paciente que tiene SIRS.

10 La memoria descriptiva proporciona además un método para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o la diferenciación entre SIRS y septicemia en un sujeto, que comprende medir el nivel de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra biológica de dicho sujeto, usando 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 SIRS.

15 La memoria descriptiva proporciona un método para el diagnóstico, pronóstico y/o predicción de septicemia o la distinción entre SIRS y septicemia en un sujeto, que comprende determinar una cantidad de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, 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; mediante lo cual un aumento o disminución en la cantidad del biomarcador seleccionado en la muestra hasta un nivel superior o inferior al intervalo de valores normales de los biomarcadores seleccionados es indicativo de septicemia.

20 La memoria descriptiva proporciona además un método para el diagnóstico, pronóstico y/o predicción de septicemia o la distinción entre SIRS y septicemia en un sujeto, que comprende determinar una cantidad de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, 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; mediante lo cual 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.

25 Alternativamente, la memoria descriptiva proporciona un método para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o la diferenciación entre SIRS 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 frente a al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil de anticuerpos candidatos con un perfil de anticuerpos de referencia.

30 La memoria descriptiva proporciona además un método para determinar si un sujeto es sensible al 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 transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil candidato con un perfil de biomarcadores de referencia.

En un ejemplo preferido, uno de los biomarcadores seleccionados para su uso en los métodos tal como se describen en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1).

35 En aún un ejemplo adicional, los biomarcadores seleccionados para su uso en los métodos tal como se describen en el presente documento se seleccionan del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1) y TREM-1, solos o en combinación con PCT, NGAL o CRP, preferiblemente PCT.

Por ejemplo, la combinación de biomarcadores para su uso en los métodos tal como se describen en el presente documento es la combinación de los marcadores transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP).

40 Muestras preferidas que van a analizarse en los métodos tal como se describen en el presente documento son sangre u orina, más preferible la muestra es suero o plasma, lo más preferiblemente es suero.

45 El método tal como se describe en el presente documento puede usar tecnología de inmunoensayo seleccionada del grupo de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA de tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA multiplex, radioinmunoanálisis o tecnologías de ELISPOT para establecer el perfil de biomarcadores. Alternativamente, el perfil de biomarcadores se establece usando métodos de análisis por espectrometría de masas de las proteínas presentes en dicha muestra.

Un objeto adicional de la memoria descriptiva es 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 transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP). Un kit de este tipo puede comprender además un perfil de referencia de biomarcadores o un valor de referencia de la cantidad de uno o más biomarcadores tal como se define en el presente documento, obtenido de un sujeto sano o un sujeto que tiene SIRS para la comparación de los resultados.

El kit tal como se describe en el presente documento, puede comprender al menos moléculas de unión que son específicas para unirse a biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP). Alternativamente, un kit de este tipo puede comprender además moléculas de unión específicas para cualquiera de los otros biomarcadores tal como se definen en el presente documento, o con cualquier otro marcador conocido para septicemia, para detectar septicemia o SIRS.

El kit tal como se describe en el presente documento, puede comprender moléculas de unión que son específicas para unirse a transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1) y TREM-1. El kit puede comprender moléculas de unión que son específicas para unirse a transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP).

El kit tal como se describe en el presente documento, puede comprender moléculas de unión que son específicas para transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), solo o en combinación con PCT, NGAL o CRP, preferiblemente PCT.

El kit tal como se describe en el presente documento, puede comprender moléculas de unión que son específicas para unirse a los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en: transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1) y TREM-1, solos o en combinación con PCT.

El kit tal como se describe en el presente documento, puede comprender moléculas de unión que son específicas para unirse a los biomarcadores transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP).

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

La memoria descriptiva también abarca una micromatriz de proteínas que comprende fragmentos de proteína de al menos dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP), recubierta sobre una fase sólida.

Los métodos tal como se enseñan en el presente documento comprenden además métodos en los que se incluyen mediciones de cualquier combinación de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en la creación del perfil candidato y de referencia. Se entenderá que también pueden incluirse biomarcadores adicionales tales como biomarcadores ya usados para el diagnóstico o pronóstico de septicemia o SIRS.

La memoria descriptiva proporciona además métodos tal como se explicaron de manera resumida anteriormente en los que el perfil se crea usando anticuerpos frente a dichos biomarcadores. En este caso los perfiles de biomarcadores candidatos y de referencia se crearán basándose en mediciones de anticuerpos frente a los biomarcadores y se denominan a continuación en el presente documento perfiles de anticuerpos candidatos y perfiles de anticuerpos de referencia.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Un resumen esquemático del modelo de septicemia de ratón usado para la identificación de nuevos biomarcadores para septicemia. En resumen, se infectan ratones con *Salmonella* en el día 0 (INF) o se les inyecta PBS (control) y se realiza un seguimiento durante 7 días consecutivos o hasta que mueren. La mayoría de los ratones infectados con *Salmonella* mueren entre cinco y siete días tras la infección. Se facilita mayor detalle en la configuración experimental del estudio de evolución temporal: se comparan todas las muestras tomadas en 5 puntos diferentes con una referencia interna usando la plataforma de descubrimiento MASStermind™

Figura 2: Representación esquemática del análisis de los resultados de prueba del procedimiento Cofradic™, que ilustra las restricciones usadas para seleccionar características con respuesta a largo plazo frente a respuesta a corto plazo y el número de proteínas identificadas para cada una. Se seleccionaron cuatro de estos posibles biomarcadores para su investigación adicional en vista de su relevancia biológica.

Figura 3: Representación esquemática del cambio en los niveles de expresión de uno de los biomarcadores candidatos para septicemia, NGAL tal como se mide usando Cofradic™ y ELISA. Medición con ELISA (gráfico con cuadrados grandes) usando un anticuerpo anti-NGAL de ratón en las mismas muestras usadas en el análisis de

Cofradic™, en comparación con los resultados de prueba de Cofradic™ (gráfico con círculos pequeños). Tal como puede observarse a partir de este gráfico, los resultados de Cofradic™ se confirman mediante los resultados de ELISA y ambos muestran una regulación por incremento clara de la expresión de NGAL en septicemia frente a ratones de control, comenzando ya de manera temprana en el procedimiento.

5 Figura 4: Representación de los resultados de prueba de ELISA para NGAL en muestras de ratón combinadas y muestras de ratón individuales con el fin de determinar la representatividad de la configuración experimental. Tal como puede observarse a partir de la figura, todas las muestras individuales (n.º de ratón INF) muestran un aumento muy similar en la expresión de proteína NGAL durante la progresión de septicemia, correspondiente al gráfico de la muestra combinada (combinación INF).

10 Figura 5: Gráfico de la izquierda: análisis de la expresión de NGAL mediante ELISA en muestras de seres humanos de pacientes con septicemia-MODS (n = 9), pacientes con SIRS (n = 11) y sujetos sanos (n = 4); gráfico de la derecha: correlación a la aparición de insuficiencia renal, para la cual se ha notificado que NGAL es un marcador.

15 Figura 6: Análisis de Cofradic™ de muestras de septicemia de ratón y muestras de control considerando el biomarcador candidato TREML-1. Resulta claro a partir de este gráfico que la expresión de TREML-1 se regula por disminución durante la evolución de septicemia en el sistema de modelo de ratón. Obsérvese que las razones mostradas están en escala log2. Se detectan dos péptidos, probablemente el sTREML-1 soluble y el de longitud completa.

20 Figura 7: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de las muestras de suero empobrecido (IgG, albúmina, transferrina) de ratón usando un anticuerpo anti-TREML-1 de ratón con las mismas muestras que las usadas en el análisis de Cofradic™. Queda claro que en muestras de suero de ratón la expresión de TREML-1 se reduce durante la evolución de septicemia, confirmando los resultados de Cofradic™. Obsérvese que en suero sólo se detecta el TREML-1 soluble, mientras que en plaquetas se detectan tanto el TREML-1 de longitud completa como el soluble.

25 Figura 8: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de una muestra de suero empobrecido de ratón individual del modelo de septicemia (izquierda) y de un ratón de control (derecha) que indica ausencia de cambio en la expresión de TREML-1 soluble en el ratón de control (tratado con PBS) y una reducción clara de la expresión de TREML-1 en el ratón con septicemia (n = 2; infectado con *Salmonella*).

Figura 9: Mediciones de ELISA de TREM-1 en un conjunto de muestras de ratón infectado y de control que ilustran una regulación por incremento de TREM-1 durante la evolución de la infección y el desarrollo de septicemia, es decir correlación inversa con respecto a TREML-1.

30 Figura 10: Panel A: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de suero humano y plaquetas humanas. Banda 1, inmunoprecipitación (IP) en suero de un individuo sano, usando AcM frente a TLT-1. Banda 2, IP en 1 ml de suero de un individuo sano, sin AcM frente a TLT-1 (control negativo). Banda 3, IP en lisado de plaquetas humanas, usando AcM frente a TLT-1. Panel B: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de suero humano de sujetos sanos frente a pacientes que padecen septicemia y septicemia grave. Banda 1, IP en suero de un individuo sano. Bandas 2-3, IP en suero de pacientes septicémicos. Banda 4, IP en suero de un paciente con septicemia grave. Queda claro a partir de la figura que la expresión de TLT-1 se reduce en las bandas 2-4 (sujetos septicémicos), en comparación con la banda 1 (sujeto sano).

Descripción detallada de la invención

40 La septicemia puede caracterizarse como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) inicial, septicemia, septicemia grave (septicemia con disfunción orgánica aguda), choque septicémico (septicemia con hipotensión arterial resistente al tratamiento), insuficiencia o disfunción orgánica múltiple y muerte.

45 El "SIRS" es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica sin signos de infección. Puede caracterizarse por la presencia de al menos dos de los siguientes cuatro criterios clínicos: fiebre o hipotermia (temperatura de 100,4°F [38°C] o 96,8°F [36°C]), taquicardia (90 latidos por minuto), taquipnea (20 respiraciones por minuto o PaCO₂ de 4,3 kPa [32 mm Hg] o la necesidad de ventilación mecánica) y un recuento de glóbulos blancos alterado de 12.000 células/ml, 4000 células/ml o la presencia del 10% de cayados, respectivamente.

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

50 La "septicemia grave" puede definirse como la presencia de septicemia y al menos una de las siguientes manifestaciones de perfusión o función orgánica inadecuada: hipoxemia (PaO₂ de 10 kPa [75 mm Hg]), acidosis metabólica (pH 7,30), oliguria (flujo de 30 ml/h), acidosis láctica (nivel de lactato sérico de 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).

55 El "choque septicémico" puede definirse como la presencia de septicemia acompañada de una disminución

sostenida en la tensión arterial sistólica (90 mm Hg o una disminución de 40 mm Hg desde la tensión arterial sistólica de referencia) a pesar de la reposición de líquidos y la necesidad de aminas vasoactivas para mantener una tensión arterial adecuada.

5 Ya que muchos organismos pueden ser la causa de septicemia, a menudo el diagnóstico requiere tiempo y pruebas frente a paneles de posibles agentes. La septicemia también puede producirse en muchas circunstancias diferentes y, por tanto, la septicemia puede clasificarse además por ejemplo en: septicemia atrapada que es una infección que está latente después de que la lesión primaria ha cicatrizado aparentemente pero que puede activarse mediante un traumatismo ligero; septicemia por catéter que es la septicemia que se produce como una complicación del cateterismo intravenoso; septicemia oral que es un estado patológico en la boca o partes adyacentes que puede 10 afectar a la salud general mediante la diseminación de toxinas; septicemia puerperal que es una infección del aparato genital femenino tras el parto, aborto provocado o aborto natural; o septicemia lenta, que es un estado producido por infección con estreptococos hemolíticos a, caracterizado por una enfermedad febril con endocarditis.

Para los fines de esta invención, el término "septicemia" se usa más adelante en el presente documento para incluir todos los estados y estadios de la progresión de la enfermedad.

15 Tal como se describe en el presente documento, la septicemia puede predecirse o diagnosticarse obteniendo un perfil de biomarcadores de una muestra obtenida de un individuo. Los métodos y kits tal como se enseñan en el presente documento son particularmente útiles en la predicción y el diagnóstico de septicemia en un individuo que tiene una infección, o tiene septicemia, pero al que aún no se le ha diagnosticado septicemia, que se sospecha que tiene septicemia o que corre el riesgo de desarrollar septicemia. Los métodos y kits tal como se enseñan en el 20 presente documento también pueden usarse para diferenciar entre SIRS y septicemia y para detectar y diagnosticar SIRS en un individuo o para detectar que una persona no corre el riesgo de desarrollar septicemia. Los métodos y kits tal como se enseñan en el presente documento también pueden usarse para detectar diversos estadios de la progresión de septicemia tales como septicemia, septicemia grave, choque septicémico e insuficiencia orgánica.

25 Pueden crearse perfiles de biomarcadores de varias maneras y pueden ser una razón de dos o más aspectos que pueden medirse de un biomarcador. Un perfil de biomarcadores comprende al menos dos mediciones, en el que las mediciones pueden corresponder a los mismos biomarcadores o biomarcadores 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.

30 El perfil de biomarcadores 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.

35 El perfil de biomarcadores de referencia y los perfiles de biomarcadores candidatos que se comparan en los métodos tal como se enseñan en el presente documento pueden generarse del mismo individuo para el fin de monitorizar la progresión de la enfermedad. En este caso se esperaría que los perfiles candidato y de referencia se generen de muestras biológicas tomadas en diferentes puntos de tiempo y se comparen entre sí. Una comparación de este tipo puede usarse, por ejemplo, para determinar el estado de septicemia en el individuo mediante mediciones repetidas a lo largo del tiempo.

40 Los perfiles de biomarcadores de referencia pueden elegirse de individuos que son positivos para septicemia y que padecen uno de los estadios en la progresión de septicemia, o de individuos con riesgo aumentado de desarrollar septicemia, o de poblaciones de individuos que no tienen SIRS, de individuos que no tienen SIRS pero que están padeciendo un proceso infeccioso, de individuos que están padeciendo SIRS sin la presencia de septicemia o de individuos que están padeciendo la aparición de septicemia. El perfil de biomarcadores de referencia puede generarse de una población sana.

45 Los métodos tal como se enseñan en el presente documento pueden comprender la comparación de un perfil de biomarcadores candidatos con un perfil de biomarcadores de referencia. Tal 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. Las comparaciones estadísticas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, aplicar una 50 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 modo que las mediciones del biomarcador se correlacionan con las mediciones de los patrones internos. La comparación debe permitir el pronóstico, diagnóstico y/o predicción de la presencia de septicemia, del riesgo aumentado de septicemia, de SIRS o incluso la ausencia de septicemia o SIRS. Alternativamente, la comparación puede indicar el estadio de septicemia en el que puede estar un individuo. 55

Los métodos y kits tal como se enseñan en el presente documento se basan en la identificación de nuevos biomarcadores de septicemia. Sin embargo, éstos pueden usarse junto con otros biomarcadores y éstos pueden incluir cualquier compuesto biológico tal como una proteína o fragmento de la misma, un péptido, un polipéptido, un

proteoglicano, una glicoproteína, una lipoproteína, un hidrato de carbono, un lípido, un ácido nucleico u otro polímero, o cualquier molécula biológica que está presente en la muestra biológica y que puede 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 reconocerse, por ejemplo, mediante un anticuerpo, aptámero u otra molécula de unión específica. Un biomarcador es útil si es específico para septicemia y puede medirse. Un aspecto que puede medirse de este tipo 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.

Biomarcadores identificados

Tal como queda claro a partir de los siguientes ejemplos, se analizaron muestras de sangre de un modelo de ratón de septicemia en diferentes puntos de tiempo antes y tras la infección con una cepa de *Salmonella*. El estudio de evolución temporal se ejecutó en modo de diseño de referencia en la plataforma de descubrimiento MASStermind™ de Pronota, usando el conocido bien procedimiento Cofradic™. En un estudio de diseño de referencia cada muestra se mide frente a una muestra de referencia, normalmente una combinación de todas las muestras de pacientes. Para cada característica presente en una determinada muestra se obtiene una razón 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. La combinación de todos los datos de las características de todas las muestras en una matriz de expresión permite comparar las intensidades de las características entre muestras y entre grupos de muestras.

Todas las muestras de suero se empobrecieron en cuanto a las proteínas más abundantes (por ejemplo albúmina, transferrina, IgG, etc.) usando una columna de Agilent. La eficacia de disminución se verificó usando ELISA y análisis de inmunotransferencia de tipo Western. La combinación de referencia se preparó en esta fase y se consideró esta referencia como muestra normal para el resto del procedimiento. Se prepararon muestras para el análisis MASStermind™ según los procedimientos de COFRADIC™ N-terminales convencionales. La combinación de referencia y las muestras se marcaron de manera diferencial mediante incorporación mediada por tripsina de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, en la que las diferentes muestras portaban el marcador de oxígeno pesado y la referencia el ^{16}O . Justo antes de la clasificación mediante COFRADIC™, se mezcló cada muestra con la referencia en masas de proteínas iguales. Tras la clasificación y las separaciones por nanoCL, se obtuvieron espectros de EM. Se corrigió la abundancia de isótopos de los datos de EM, se agruparon y se construyeron características usando el software desarrollado de manera interna denominado 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 mediante una combinación única de m/z, combinación de clasificación por COFRADIC™ y tiempo de retención de nanoCL y pueden estar presentes características en varias muestras que oscilan entre 1 y todas. Si una característica está presente en una muestra portará una razón, 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 razón fiable en al menos dos muestras.

Usando este enfoque, se identificaron 2 biomarcadores que mostraron un cambio en la expresión durante la evolución de la infección y el desarrollo de septicemia en este modelo de ratón. Con el fin de evaluar el uso de estos biomarcadores en el diagnóstico de septicemia en seres humanos y en la diferenciación entre SIRS y septicemia, se realizaron mediciones de ELISA y se usaron los datos para evaluar el poder de los biomarcadores o combinaciones de los mismos en la diferenciación de sujetos con o bien SIRS o bien septicemia.

Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL/Lipocalina-2 Lcn-2)

La lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) es una proteína de 21 kDa de la superfamilia de las lipocalinas. Las lipocalinas comprenden una clase de proteínas que se caracterizan por ocho cepas β que forman un barril β que define un cáliz. El cáliz une a, y transporta, moléculas de bajo peso molecular, que se piensa que definen la actividad biológica de la lipocalina. El ligando de NGAL se descubrió basándose en la observación de que NGAL recombinante, cuando se expresa en bacterias, aparece o bien incolora o bien de color rosa claro, dependiendo de la cepa bacteriana usada para la expresión de la proteína. Se encontró que este color está relacionado con la presencia de hierro y una molécula de unión a hierro pequeña denominada enteroquelina (o su producto de degradación, ácido 2,3-dihidroxibenzoico), que se produce por algunas cepas de bacterias. Las bacterias producen sideróforos para eliminar hierro del espacio extracelular y usan transportadores específicos para recuperar el complejo sideróforo:hierro, garantizando su suministro de hierro. Por consiguiente, NGAL impidió el crecimiento de las cepas bacterianas que se basan en la producción de enteroquelina para satisfacer sus demandas de hierro. La importancia biológica de este hallazgo se demostró en ratones genéticamente modificados, que son deficientes para ambas copias del gen de NGAL. Estos animales eran más sensibles a determinadas bacterias gram-negativas y murieron más rápido de septicemia que los ratones silvestres. Por tanto, NGAL comprende un componente crítico de inmunidad innata a una infección bacteriana. Parece que NGAL tiene actividades más complejas que su efecto antimicrobiano. La expresión de NGAL aumenta 1000 veces en seres humanos y roedores en respuesta a lesión tubular renal, y aparece tan rápidamente en la orina y el suero que es útil como biomarcador temprano de insuficiencia renal. La inducción de NGAL puede limitar la lesión tubular, un efecto que puede ser independiente de sus acciones bacteriostáticas. De hecho, cada vez más evidencias señalan hacia efectos del factor de crecimiento de NGAL que modulan diversas respuestas celulares, tales como proliferación, apoptosis y

diferenciación, pero esto no se entienden bien mecanísticamente. Sin embargo, algunos de estos efectos se potencian cuando NGAL se asocia con sideróforos y hierro, aumentando la posibilidad de que en ausencia de infección bacteriana, moléculas endógenas se asocien con NGAL para mediar sus propiedades de unión al hierro (para una revisión véase Schmitt-Ott *et al.*, 2007, J. Am. Soc. Nephrol. vol. 19: 407-413). NGAL se ha implicado recientemente en el diagnóstico de septicemia tal como puede observarse en la solicitud de patente internacional WO 2007/041623 A2 cuyo titular es Biosite Inc, en la que es parte de un panel de biomarcadores de septicemia junto con MIP3 y CRP.

Transcrito similar a TREM-1 (TREML1/TLT1)

TREML1 es un receptor transmembrana, que se encontró específicamente que se expresa en plaquetas. Por este motivo se ha implicado en la agregación de plaquetas. El receptor TREML1 puede estar presente en dos formas, una proteína de longitud completa unida a membrana de 30 kDa y una variante soluble secretada, que carece de la región transmembrana y que tiene un peso de 20 kDa. La forma soluble puede detectarse fácilmente en muestras de sangre o suero, mientras que la forma unida a membrana no se detecta en muestras de sangre o suero, sino sólo en las propias plaquetas tal como se muestra en los siguientes ejemplos.

TREM-1 (receptor de activación expresado en células mieloides 1)

El receptor de activación expresado en células mieloides 1 (TREM-1) desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria innata relacionada con infecciones graves y septicemia. La modulación de la activación asociada a TREM-1 mejora el desenlace en modelos de roedor para neumonía y septicemia. Sin embargo, hasta ahora se desconoce la identidad y aparición de los ligandos de TREM-1 naturales, lo que afecta al entendimiento adicional de la biología de este receptor. Se notificó anteriormente un ligando para TREM-1 en plaquetas humanas. Usando una proteína de fusión de TREM-1 recombinante, se demostró la unión específica de TREM-1 a plaquetas. Se requieren señales específicas de TREM-1 para el aumento inducido por plaquetas de funciones efectoras (provocadas por LPS) de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Sin embargo, no se requiere la interacción de TREM-1 con su ligando para la formación del complejo plaqueta/PMN, que depende de integrinas y selectinas. Tomados juntos, los resultados indican que el ligando de TREM-1 se expresa por plaquetas y que la interacción TREM-1/ligando contribuye a la amplificación de la activación de PMN inducida por LPS (Haselmayer *et al.*, 2007 Blood vol. 110 (3): 1029-35). TREM-1 se ha identificado anteriormente como un posible marcador para el pronóstico de septicemia y se regula por incremento en pacientes con SIRS o septicemia en comparación con sujetos sanos. Se consideró un nivel de TREM-1 soluble de plasma superior a 60 ng/ml como indicativo de SIRS o septicemia (Gibot *et al.*, 2004, Annals 2004 141: 9-15).

Se ha notificado que la medición combinada de concentraciones de sTREM-1 de lavado broncoalveolar (BAL) y PCT en suero son de interés en la detección de la presencia de una septicemia nosocomial y en la distinción de neumonía asociada al respirador (VAP) frente a una infección extrapulmonar por Gibot *et al.*, 2007 (Scand J Infect Dis. 39 (6-7): 604-8). Tejera A *et al.*, 2007, (Cytokine 38 (3): 117-23) notificó además la utilidad de la detección de niveles de proteína TREM-1 en suero para pronosticar septicemia.

Procalcitonina (PCT)

El biomarcador de septicemia conocido procalcitonina (PCT) es un precursor de la hormona calcitonina, que está implicado en la homeostasis del calcio, y se produce por las células C de la glándula tiroidea. Es ahí donde la procalcitonina se escinde para dar calcitonina, catacalcina y un residuo de proteína. No se libera en el torrente sanguíneo de individuos sanos. Con las perturbaciones que conlleva una infección grave con una respuesta sistémica asociada, los niveles sanguíneos de procalcitonina pueden aumentar hasta 100 ng/ml. En suero sanguíneo, la procalcitonina tiene una semivida de 25 a 30 horas. La medición de procalcitonina puede usarse como marcador de septicemia grave y en general se clasifica bien con el grado de septicemia, aunque los niveles de procalcitonina en la sangre son muy bajos. PCT tiene la mayor sensibilidad (el 85%) y especificidad (el 91%) para diferenciar pacientes con SIRS de aquéllos con septicemia, en comparación con IL-2, IL-6, IL-8, CRP y TNF-alfa. Sin embargo, la prueba no se usa de manera rutinaria y aún tiene que obtener aceptación extendida (véase Meisner *et al.*, 1999, Crit Care vol. 3 (1): 45-50).

Proteína C reactiva (CRP)

Otro biomarcador de septicemia conocido es la proteína C reactiva (CRP), que es una proteína plasmática, una proteína de fase aguda producida por el hígado y por adipocitos. Es un miembro de la familia de proteínas de pentraxina y se ha usado ampliamente como marcador para septicemia, especialmente en recién nacidos. Sin embargo, su exactitud es controvertida.

Puede usarse cualquiera de los marcadores anteriores identificados en el presente documento, por separado o en combinación en los kits, micromatrices y métodos tal como se describen en el presente documento. Puede usarse cualquier combinación de dos o más de los marcadores identificados en el presente documento juntos. Además, puede usarse cualquier combinación de uno o más de los biomarcadores recién identificados junto con otros marcadores de septicemia conocidos. Un marcador de septicemia conocido preferido es el marcador TREM-1 (soluble), el marcador PCT (procalcitonina) o el marcador CRP (proteína C reactiva).

Generación de perfiles de biomarcadores

Pueden generarse perfiles de biomarcadores mediante el uso de uno o más métodos de separación. Por ejemplo, los métodos de separación adecuados pueden incluir un método de espectrometría de masas, tal como espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-EM), ESI-EM/EM, ESI-EM/(EM)ⁿ (n es un número entero mayor que cero), espectrometría de masas con tiempo de vuelo por desorción/ionización con láser asistida por matriz (MALDI-TOF-EM), espectrometría de masas con tiempo de vuelo por desorción/ionización con láser potenciada en superficie (SELDI-TOF-EM), desorción/ionización sobre silicio (DIOS), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), cuadrupolo de tiempo de vuelo (Q-TOF), espectrometría de masas por ionización química a presión atmosférica (APCI-EM), APCI-EM/EM, APCI-EM)ⁿ, espectrometría de masas por fotoionización a presión atmosférica (APPI-EM), APPI-EM/EM y APPI-EM)ⁿ. Otros métodos de espectrometría de masas pueden incluir, entre otros, cuadrupolo, espectrometría de masas por transformadas de Fourier (FTMS) y trampa iónica. Otros métodos de separación adecuados pueden incluir reparto por extracción química, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de líquidos hidrófoba (fase inversa), isoelectroenfoque, 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 método de separación.

También pueden generarse perfiles de biomarcadores mediante métodos que no requieren separación física de los biomarcadores en sí mismos. Por ejemplo, puede usarse espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) para resolver un perfil de biomarcadores de una mezcla compleja de moléculas. En Hagberg, NMR Biomed. 11: 148-56 (1998), por ejemplo, se da a conocer un uso análogo de RMN para clasificar tumores. Los procedimientos adicionales incluyen tecnologías de amplificación de ácido nucleico, que pueden usarse para generar un perfil de biomarcadores sin separación física de biomarcadores individuales. (Véase Stordeur *et al.*, J. Immunol. Methods 259: 55-64 (2002) y Tan *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 99: 11387-11392 (2002), por ejemplo). La espectrometría de masas con tiempo de vuelo por desorción/ionización con láser puede usarse para crear un perfil de biomarcadores en el que los biomarcadores son proteínas o fragmentos de proteínas que se han ionizado y retirado por vaporización de un soporte de inmovilización mediante radiación láser incidente. Entonces se crea un perfil mediante el tiempo de vuelo característico para cada proteína, que depende de su razón de la masa con respecto a la carga ("m/z"). En la técnica se conoce una variedad de técnicas de desorción/ionización con láser. (Véase, por ejemplo, Guttman *et al.*, Anal. Chem. 73: 1252-62 (2001) y Wei *et al.*, Nature 399: 243-46 (1999)). La espectrometría de masas con tiempo de vuelo por desorción/ionización con láser permite la generación de grandes cantidades de información en un periodo de tiempo relativamente corto. Se aplica una muestra biológica a uno de varias variedades de un soporte que se une a todos los biomarcadores, o un subconjunto de los mismos, en la muestra. Se aplican directamente lisados celulares o muestras a estas superficies en volúmenes de tan sólo 0,5 µl, con o sin purificación o fraccionamiento anterior. Los lisados o la muestra pueden concentrarse o diluirse antes de la aplicación sobre la superficie del soporte. Luego se usa desorción/ionización con láser para generar espectros de masas de la muestra, o muestras, en tan sólo tres horas.

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

El ELISA directo usa el método de marcar directamente el propio anticuerpo. Se recubren placas de micropocillos con una muestra que contiene el antígeno diana, y la unión del anticuerpo marcado se cuantifica mediante un criterio de valoración colorimétrico, quimioluminiscente o fluorescente. Ya que se omite la etapa del anticuerpo secundario, 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 marcaje de cada anticuerpo que va a usarse, lo que puede ser una propuesta que requiere mucho tiempo y costosa. Además, determinados anticuerpos pueden no ser adecuados para el marcaje directo. Los métodos directos también carecen de la amplificación de señal adicional que puede conseguirse con el uso de un anticuerpo secundario.

El método de ELISA indirecto de dos etapas usa un anticuerpo secundario marcado para la detección. En primer lugar, se incuba un anticuerpo primario con el antígeno. Esto va seguido por la incubación con un anticuerpo secundario marcado que reconoce al anticuerpo primario. Para ELISA es importante que el conjugado enzima-anticuerpo tenga alta actividad específica. Esto se consigue cuando el anticuerpo se purifica por afinidad y la química de conjugación enzimática conserva la especificidad del anticuerpo así como la actividad enzimática.

El ELISA de tipo 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 en el sándwich actúan al menos dos anticuerpos. Por este motivo, los ensayos de tipo sándwich se restringen a la cuantificación de antígenos polivalentes tales como proteínas o polisacáridos. ELISA de tipo sándwich para la cuantificación de antígenos son especialmente valiosos cuando la concentración de antígenos es baja y/o están contenidos en altas concentraciones de proteína contaminante. Para utilizar este ensayo, se purifica un anticuerpo (el anticuerpo de "captura") y se une a una fase sólida normalmente fijada al fondo de un pocillo de placa. Luego se añade el antígeno

y se permite que se compleje con el anticuerpo unido. Luego se retiran los productos no unidos con un lavado, y se permite que un segundo anticuerpo marcado (el anticuerpo de “detección”) se una al antígeno, completando así el “sándwich”. Luego se cuantifica el ensayo midiendo la cantidad del segundo anticuerpo marcado unido a la matriz, mediante el uso de un sustrato colorimétrico. Ventajas principales de esta técnica son que el antígeno no necesita purificarse antes de su uso, y que estos ensayos son muy específicos. Sin embargo, una desventaja es que no pueden usarse todos los anticuerpos. Las combinaciones de anticuerpos monoclonales deben cualificarse como “pares correspondientes”, lo que significa que pueden reconocer epítomos separados en el antígeno de modo que no impiden la unión uno del otro. Los kits de ELISA son suficientemente buenos para alcanzar una sensibilidad de detección a un nivel inferior al nanogramo por ml y son útiles para seleccionar dianas de proteínas y cuantificar su expresión en diferentes estados. Para una mayor sensibilidad de detección necesaria, pueden introducirse adicionalmente anticuerpos monoclonales en el kit de ELISA para emparejarlos con IgY policlonal como anticuerpos o bien de captura o bien de detección.

Cuando no están disponibles dos anticuerpos de “pares correspondientes” para una diana, otra opción es el ELISA competitivo. La ventaja del ELISA competitivo es que pueden usarse anticuerpos primarios no purificados. Aunque existen varias configuraciones diferentes para ELISA competitivo, un reactivo debe conjugarse a una enzima de detección, tal como peroxidasa del rábano. La enzima puede ligarse o bien al antígeno o bien al anticuerpo primario. Un ejemplo de un competidor es un antígeno marcado. En este tipo de ELISA, existe una relación inversa entre la señal obtenida y la concentración del analito en la muestra, debido a la competencia entre el analito libre y el conjugado ligando-enzima para el anticuerpo que recubre la microplaca, es decir cuanto más analito hay menor es la señal. En resumen, se recubre un anticuerpo primario purificado no marcado sobre los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Luego se incuban este anticuerpo primario con patrones y muestras no marcados. Después de dejar que esta reacción llegue al equilibrio, se añade un antígeno conjugado. Este conjugado se unirá al anticuerpo primario donde sus sitios de unión no estén ya ocupados por un antígeno no marcado. Por tanto, cuantos más antígenos no marcados hay en la muestra o el patrón, menor cantidad de antígeno conjugado se une. Luego se revela la placa con sustrato y se mide el cambio de color.

ELISA multiplex es un ensayo de matriz de proteínas basado en ELISA de placas de microtitulación que permite una detección simultánea de múltiples analitos en múltiples direcciones de matriz dentro de un único pocillo. Se han desarrollado diferentes tipos de ELISA multiplex y se emplean en la 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 de tipo “sándwich”. En general, también puede conseguirse un ELISA multiplex mediante matriz de anticuerpos, en el que diferentes anticuerpos primarios pueden fijarse a una fase sólida, por ejemplo una placa de vidrio, para capturar antígenos correspondientes en una muestra biológica. El método de detección puede ser directo o indirecto, de tipo sándwich o competitivo, con marcaje o sin marcaje, dependiendo de las tecnologías de matriz de anticuerpos.

El ensayo de punto de inmovilización ligado a enzimas (ELISpot) emplea el enfoque del ensayo de tipo sándwich del ensayo de inmovilización ligado a enzimas (ELISA), con algunas variaciones. El anticuerpo de captura se recubre de manera aséptica sobre una placa de micropocillos con soporte de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF). Se bloquea la placa con proteínas séricas, se siembran en placa células de interés en densidades variables, junto con antígeno o mitógeno, y se incuban las placas a 37°C. La citocina secretada por células activadas se captura localmente mediante el anticuerpo recubierto sobre la membrana de PVDF de alta área superficial. Se lavan los pocillos para eliminar células, residuos y componentes de los medios. Se emplea un segundo anticuerpo (biotinilado) reactivo con un epítipo diferenciado de la citocina diana para detectar la citocina capturada. Luego se visualiza la citocina detectada usando avidina-HRP y un sustrato de precipitación (por ejemplo AEC). El producto final coloreado (punto) representa una célula que produce citocinas individual. Las manchas pueden 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 manchas.

El radioinmunoanálisis (RIA) implica mezclar cantidades conocidas de antígeno radiactivo (con frecuencia marcado con isótopos radiactivos gamma de yodo unidos a tirosina) con anticuerpo frente a ese antígeno, luego añadir antígeno no marcado o “no radiactivo” y medir la cantidad de antígeno marcado desplazado. Inicialmente, el antígeno radiactivo se une a los anticuerpos. Cuando se añade antígeno “no radiactivo” (no marcado, de búsqueda), los dos compiten por los sitios de unión de anticuerpos (a concentraciones mayores de antígeno “no radiactivo”, más cantidad de éste se une al anticuerpo, desplazando la variante radiactiva). Los antígenos unidos se separan de los no unidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “perfil” incluye cualquier conjunto de datos que representa las características distintivas o características asociadas con un estado de septicemia. El término abarca 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. Los ejemplos de perfiles de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, un perfil genotípico, perfil del número de copias génicas, perfil de expresión génica, perfil de metilación de ADN y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de perfiles de proteínas incluyen un perfil de expresión proteica, perfil de activación proteica, perfil de escisión proteica 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 con un estado de septicemia. De manera similar, un “perfil del

número de copias génicas” incluye un conjunto de datos del número de copias génicas que representa la amplificación de uno o más genes asociados con un estado 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 con un estado 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 con un estado de septicemia. Además, un “perfil de expresión proteica” incluye un conjunto de datos de expresión proteica que representa los niveles de una o más proteínas asociadas con un estado de septicemia. Además, un “perfil de activación proteica” incluye un conjunto de datos que representa la activación (por ejemplo, estado de fosforilación) de una o más proteínas asociadas con un estado de septicemia. Un “perfil de escisión proteica” incluye un conjunto de datos que representa la escisión proteolítica de una o más proteínas asociadas con un estado 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” tal como se usa en el presente documento incluye cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto. Las muestras incluyen, sin limitación, sangre completa, plasma, suero, glóbulos rojos, glóbulo blancos (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica), saliva, orina, deposiciones (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 de células, productos de secreción celular, líquido de inflamación, semen y secreciones vaginales. La muestra puede ser sangre completa o un componente fraccionario de la misma tal como plasma, suero o un sedimento celular. Preferiblemente la muestra se obtiene fácilmente mediante métodos mínimamente invasivos. Las muestras también pueden incluir muestras tisulares y biopsias, homogeneizados tisulares y similares.

Con respecto a esto, la memoria descriptiva proporciona un método de establecimiento de un perfil de biomarcadores de referencia sano que comprende las etapas de:

(a) determinar una cantidad de al menos dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra obtenida de un sujeto que no tiene un estado relacionado con septicemia o SIRS; y

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

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

(a) determinar una cantidad de al menos dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra obtenida de un sujeto que tiene un estado de SIRS; y

(b) almacenar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra de SIRS en forma de un perfil de biomarcadores de referencia.

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

(a) determinar una cantidad de al menos dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra obtenida de un sujeto que tiene un estado relacionado con septicemia; y

(b) almacenar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra de septicemia en forma de un perfil de biomarcadores de referencia.

En uno cualquiera de los métodos definidos en el presente documento, se prefiere el uso del marcador TLT-1, solo o en combinación con uno cualquiera de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en: NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP).

En uno cualquiera de los métodos definidos en el presente documento, se prefiere la combinación de TLT-1 y NGAL.

Especialmente con respecto a las descripciones de Gibot *et al.*, 2007 (Scand J Infect Dis. 39 (6-7): 604-8) y Tejera *et al.*, 2007, (Cytokine 38 (3): 117-23), queda claro que el uso combinado del biomarcador TREM-1 o bien en BAL o bien en suero puede ser indicativo de septicemia.

Por tanto, tal como se describe en el presente documento, se preferiría altamente combinar el uso del biomarcador TREM-1 y TLT-1 para el pronóstico de septicemia. Esto es aún más cierto debido al comportamiento opuesto de los niveles de expresión del biomarcador TLT-1 y TREM-1 en sujetos sanos frente a sujetos con septicemia. Tal como se notificó anteriormente en la bibliografía, el marcador TREM-1 se regula por incremento en sujetos con septicemia

frente a sujetos sanos, mientras la presente invención muestra que la expresión de TLT-1 se regula por disminución en sujetos con septicemia frente a sujetos sanos. Ambos biomarcadores son detectables en suero y forman, debido a su comportamiento opuesto, una herramienta de pronóstico mejorada para septicemia cuando se usan en combinación.

- 5 En uno cualquiera de los métodos definidos en el presente documento, se prefiere particularmente la combinación de TLT-1 y TREM-1.

En uno cualquiera de los métodos definidos en el presente documento, también se prefiere la combinación de TLT-1 y TREM-1 en combinación con uno cualquiera de los marcadores restantes seleccionados del grupo que consiste en: NGAL, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP).

- 10 En uno cualquiera de los métodos definidos en el presente documento, se prefiere particularmente la combinación de TLT-1, TREM-1 y procalcitonina (PCT).

Kits

- 15 La memoria descriptiva también proporciona kits para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia en un sujeto. Los kits tal como se enseñan en el presente documento comprenden al menos un biomarcador tal como se define en el presente documento o moléculas que se unen específicamente al mismo. Biomarcadores específicos que son útiles en los métodos y kits tal como se enseñan en el presente documento son aquéllos seleccionados del grupo que consiste en: transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) pero un kit puede incluir uno o dos o tres o cuatro o todos los biomarcadores indicados en el mismo con o sin otros biomarcadores adicionales.

- 20 El biomarcador o biomarcadores en cada kit pueden ser parte de una matriz, o el/los biomarcador(es) puede(n) acondicionarse por separado y/o individualmente. El kit también puede comprender al menos un patrón que va a usarse en la generación de los perfiles de biomarcadores tal como se describen en el presente documento. Los kits tal como se enseñan en el presente documento también pueden contener reactivos que pueden usarse para marcar de manera detectable biomarcadores contenidos en las muestras biológicas 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 seleccionados del grupo que consiste en: transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y/o cualquier otro biomarcador que se incluye en la creación del perfil.

- 25 La memoria descriptiva también proporciona un método y un kit para evaluar la aparición y estadio o gravedad de la septicemia en un sujeto, que puede oscilar desde la misma aparición de septicemia hasta un choque septicémico y eventualmente la muerte del sujeto, midiendo la cantidad de uno o de una combinación de uno o más de los biomarcadores tal como se definen en el presente documento, seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en combinación con biomarcadores conocidos para septicemia o SIRS, en la muestra del sujeto y comparando las mediciones del biomarcador con respecto a las de una muestra obtenida de un sujeto sano o sin septicemia. La memoria descriptiva proporciona medios para que un médico estime el grado de septicemia en una evaluación inicial y monitorice el cambio en el estado de la septicemia (empeorando, mejorando o permaneciendo igual) basándose en la cantidad detectada del uno o más biomarcadores en la muestra del sujeto.

- 30 Normalmente, el médico establecería un protocolo de recoger y analizar una cantidad de una muestra reciente del paciente a intervalos seleccionados. Normalmente la muestra se obtiene de manera intermitente durante un periodo recomendado. El periodo de tiempo entre el muestreo intermitente puede estar dictado por el estado del sujeto, y puede oscilar entre una muestra cada 24 horas y una muestra tomada de manera continua, más normalmente entre cada 4 horas y cada 30 minutos.

- 35 Usando los métodos y las técnicas descritos en el presente documento, tanto puede analizarse y estimarse un nivel cualitativo de uno o más de los biomarcadores presentes en la muestra, como puede analizarse y medirse un nivel cuantitativo de uno o más de los biomarcadores presentes en la muestra. El médico seleccionaría el método cualitativo, el método cuantitativo, o ambos, dependiendo del estado del paciente. Normalmente, la cantidad de muestra que va a recogerse es de menos de 10 mililitros, menos de 1 mililitro y más normalmente menos de 10 μ l. Una muestra típica puede oscilar entre aproximadamente 1 μ l y aproximadamente 1 ml. Normalmente las cantidades mayores de muestra (aproximadamente 10 ml) se usan para ensayos cuantitativos. Normalmente, estas cantidades pequeñas de muestra están disponibles o pueden obtenerse fácil y rápidamente de sujetos clínicos que o bien son propensos a desarrollar septicemia o bien han desarrollado septicemia.

- 40 Una vez que se ha detectado una indicación de septicemia, y se ha comenzado la intervención y tratamiento de la enfermedad o el estado, el médico puede emplear el método y el kit tal como se enseñan en el presente documento para monitorizar la progresión del tratamiento o la intervención. Normalmente, se tomarán y analizarán una o más muestras después del tratamiento posteriores para determinar la presencia de uno o más de los biomarcadores mientras comienza y continúa el tratamiento del estado de septicemia. Se continúa el tratamiento hasta que la presencia de uno o más de los biomarcadores tal como se definen en el presente documento, en muestras después

del tratamiento posteriores, se normaliza en comparación con una muestra obtenida de un sujeto sano o sin septicemia. Puesto que el tratamiento y la intervención mejoran el estado, la expresión de uno o más de los biomarcadores, y su presencia en la muestra, se alterará y normalizará cuando en comparación con una muestra de un sujeto sano o sin septicemia. El grado de mejora se expresará mediante un nivel normalizado de manera correspondiente de uno o más de los biomarcadores, detectado en una muestra. A medida que el estado se acerca a una recuperación completa, el método puede usarse para detectar la normalización completa de uno o más de los biomarcadores tal como se definen en el presente documento, señalando la finalización de ciclo de tratamiento.

El término “molécula de unión” se refiere a todas las moléculas de unión adecuadas que se unen o interaccionan específicamente con uno de los biomarcadores tal como se definen en el presente documento, y que pueden usarse en los métodos y kits tal como se enseñan en el presente documento. Ejemplos de agentes de unión adecuados son anticuerpos, aptámeros, moléculas pequeñas de interacción específica, proteínas de interacción específica y otras moléculas que se unen específicamente a uno de los biomarcadores. Tanto anticuerpos monoclonales como policlonales que se unen a uno de los biomarcadores tal como se definen en el presente documento son útiles en los métodos y kits tal como se enseñan en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales y policlonales pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica y a menudo están comercialmente disponibles.

Aptámeros que se unen específicamente a los biomarcadores tal como se definen en el presente documento, pueden obtenerse usando el denominado método SELEX o evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial. En este sistema desarrollado por Larry Gold y colaboradores y descrito en la patente estadounidense 6.329.145, pueden usarse múltiples rondas de selección y amplificación para seleccionar moléculas de ADN o ARN con alta especificidad por una diana de elección. Recientemente, en la patente estadounidense 6.458.539 del grupo de Larry Gold, se ha descrito un método más perfeccionado de diseñar los denominados fotoaptámeros con especificidad incluso superior.

También se conocen en la técnica métodos de identificación de agentes de unión tales como proteínas de interacción y moléculas pequeñas. Ejemplos son análisis de dos híbridos, métodos 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 método para detectar el complejo de uno o más de los biomarcadores y la molécula de unión o el anticuerpo primario comprende las etapas de: separar cualquier material no unido de la muestra del complejo anticuerpo de captura-biomarcador; poner en contacto el complejo anticuerpo de captura-biomarcador con un segundo anticuerpo para detectar el biomarcador, para permitir la formación de un complejo entre el biomarcador y el segundo anticuerpo; separar cualquier segundo anticuerpo no unido del complejo biomarcador-segundo anticuerpo; y detectar el segundo anticuerpo del complejo biomarcador-segundo anticuerpo.

Un kit para su uso en el método comprende normalmente uno o más medios a los que se han fijado una o más moléculas de unión o anticuerpos de captura, mediante lo cual se pone en contacto la muestra con los medios para exponer la molécula de unión o el anticuerpo de captura al biomarcador presente en la muestra. El kit incluye un medio de adquisición que puede comprender un instrumento, tal como una espátula o una vara simple, que tiene una superficie que comprende los medios. Los medios de adquisición también pueden comprender un envase para recibir la muestra, en el que el envase tiene una superficie en 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 la 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 tal como se definen en el presente documento, puede proporcionar una indicación de la presencia de la proteína en una muestra en un periodo de tiempo corto. En general, un método y un kit tal como se enseñan en el presente documento, pueden detectar el biomarcador en una muestra en un plazo de cuatro horas, más normalmente en un plazo de dos horas y lo más normalmente en un plazo de una hora, tras el estado de septicemia. Preferiblemente, el biomarcador puede detectarse en un plazo de aproximadamente 30 minutos tras el estado de septicemia.

Un método de una etapa rápido de detectar uno o más de los biomarcadores tal como se definen en el presente documento puede reducir el tiempo para detectar el estado de septicemia. Un método 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 una o más moléculas de unión o anticuerpos de detección que se unen cada uno específicamente a uno de los biomarcadores, de manera que se inicia la unión de la molécula de unión o el anticuerpo de detección a los biomarcadores en la muestra; poner en contacto la mezcla de muestra y molécula de unión o anticuerpo de detección con una molécula de unión o anticuerpo de captura inmovilizado que se une específicamente al biomarcador, molécula de unión o anticuerpo de captura que no presenta reactividad cruzada con la molécula de unión o el anticuerpo de detección, de manera que se une la molécula de unión o el anticuerpo de detección al biomarcador y el biomarcador a la molécula de unión o al anticuerpo de captura, para formar un

complejo detectable; eliminar la molécula de unión o el anticuerpo de detección sin unir y cualquier muestra no unida del complejo; y detectar la molécula de unión o el anticuerpo de detección del complejo. La molécula de unión o el anticuerpo detectable puede marcarse con un marcador detectable, tal como un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un colorante biológico, una perla magnética, (estrept)avidina o biotina, tal como se conoce bien en la técnica.

En los kits tal como se enseñan en el presente documento, se prevé preferiblemente la detección del biomarcador TLT-1, solo o en combinación con uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en: NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP), en los que se prefiere la combinación de TLT-1 y NGAL, se prefiere la combinación de TLT-1, TREM-1 y PCT y se prefiere particularmente la combinación de TLT-1 y TREM-1.

Uso de los métodos y kits tal como se enseñan en el presente documento en tratamiento y diagnóstico, predicción y/o pronóstico

Diagnóstico, predicción y/o pronóstico de septicemia y septicemia frente a SIRS

La memoria descriptiva proporciona un método para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de SIRS, septicemia, septicemia grave y MODS o para la diferenciación entre dichos estados septicémicos 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 uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP), prohepcidina (pro-HEPC) en dicha muestra, y comparar dicho perfil de biomarcadores candidatos con un perfil de biomarcadores de referencia obtenido de un sujeto sano.

La memoria descriptiva también proporciona un método para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SIRS 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 transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil candidato con un perfil de biomarcadores de referencia obtenido de un sujeto sano o un paciente que tiene SIRS.

La memoria descriptiva proporciona además un método para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SIRS y septicemia en un sujeto, que comprende medir el nivel de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, 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 SIRS.

La memoria descriptiva proporciona además la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o la diferenciación entre SIRS y septicemia en un sujeto, que comprende determinar una cantidad de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, 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; mediante lo cual un aumento o disminución en la cantidad del biomarcador seleccionado en la muestra hasta un nivel superior o inferior al intervalo de valores normales de los biomarcadores seleccionados es indicativo de septicemia.

La memoria descriptiva proporciona además un método para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o para la diferenciación entre SIRS y septicemia en un sujeto, que comprende determinar una cantidad de al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, 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; mediante lo cual 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 método para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia o la diferenciación entre SIRS 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 frente a al menos uno o dos biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, 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 método para determinar si un individuo es sensible al 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 transcrito similar a TREM-1 (TLT-

1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) y comparar dicho perfil candidato con un perfil de biomarcadores de referencia.

5 Tal como se muestra en los siguientes ejemplos, la expresión del biomarcador TLT-1 se reduce en pacientes con septicemia en comparación con sujetos sanos. Por tanto, uno de los biomarcadores seleccionados es TREML-1 (TLT-1).

Por ejemplo, la combinación de biomarcadores es TREML-1 y TREM-1 en combinación con una cualquiera de proteína C reactiva (CRP), procalcitonina (PCT) o NGAL.

Muestras preferidas que van a analizarse en el método tal como se describe en el presente documento son sangre u orina, más preferible la muestra es suero o plasma.

10 El método tal como se describe en el presente documento puede usar tecnología de inmunoensayo seleccionada del grupo de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA de tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA multiplex, radioinmunoanálisis o tecnologías de ELISPOT para establecer el perfil de biomarcadores. Alternativamente, el perfil de biomarcadores se establece usando métodos de análisis por espectrometría de masas de las proteínas presentes en dicha muestra.

15 Los métodos indicados en el presente documento son particularmente útiles para distinguir entre SIRS y septicemia.

Tratamiento

Una vez diagnosticado un estado de septicemia, la identificación de los biomarcadores tal como se definen en el presente documento puede ser útil en el tratamiento o mejora del estado de septicemia del sujeto.

20 Es posible aumentar el nivel de expresión o la abundancia de una proteína en un sujeto, administrando un biomarcador de este tipo purificado, producido por síntesis o de manera recombinante tal como se define en el presente documento, a un sujeto que tiene un nivel reducido de dicho biomarcador en comparación con un sujeto sano. Administrar agentes que aumentan la expresión o actividad de dicho biomarcador también puede ser beneficioso para el paciente. La presencia del biomarcador sTNFR2 en sangre obtenida de un sujeto que tiene septicemia, por ejemplo, se reduce drásticamente en comparación con las muestras de un sujeto que tiene SIRS o un sujeto sano.

25 Otra posibilidad puede ser la reducción del nivel o la abundancia de un determinado biomarcador tal como se define en el presente documento, en el caso de que dicho biomarcador tenga una aparición aumentada en la sangre de pacientes que tienen septicemia en comparación con las muestras de un sujeto que tiene SIRS o un sujeto sano. Ejemplos de estos biomarcadores son transcrito similar a TREM-1 (TLT-1/TREML1), NGAL, TREM-1, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP). Administrar agentes que reducen la expresión o actividad de dichas proteínas puede ser beneficioso para el sujeto.

Ejemplos

Los siguientes detalles experimentales describen la exposición completa de un ejemplo de la invención tal como se describió anteriormente y no han de considerarse limitativos en ninguna manera.

35 Ejemplo 1: Identificación de nuevos biomarcadores para septicemia en un modelo de septicemia de ratón.

Se usó un modelo de septicemia de ratón con el fin de identificar nuevos biomarcadores de septicemia. En el día 0, a los ratones se les inyectó PBS (control) o *Salmonella* (infectados). Se extrajeron muestras de sangre tanto de ratones de control como infectados cada 24 h mediante sangrado retroorbital. Los ratones del grupo infectado no muestran signos inmediatos de enfermedad justo tras la infección, pero enfermaron repentinamente tras 4-5 días y luego murieron en un plazo de 24 h. En las muestras de sangre obtenidas, se analizaron los cambios en la expresión proteica usando detección por espectrometría de masas de los niveles de proteína usando la plataforma de tecnología COFRADIC™ publicada anteriormente.

45 Se empobrecieron todas las muestras de suero en cuanto a las proteínas más abundantes usando una columna de Agilent. Se verificó la eficacia de agotamiento usando ELISA y análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se preparó la combinación de referencia en esta fase y se consideró esta referencia como muestra normal para el resto del procedimiento. Se prepararon muestras para el análisis MASStermind™ según los procedimientos COFRADIC™ N-terminales convencionales. Se marcaron de manera diferencial la combinación de referencia y las muestras mediante incorporación mediada por tripsina de ¹⁸O/¹⁶O, en la que las diferentes muestras portaban el marcador de oxígeno pesado y la referencia el ¹⁶O. Justo antes de la clasificación por COFRADIC™, se mezcló cada muestra con la referencia en masas de proteínas iguales. Tras la clasificación y las separaciones por nanoCL, se obtuvieron espectros de EM. Se corrigió la abundancia de isótopos de los datos de EM, se agruparon y se construyeron características usando el software desarrollado de manera interna denominado euCatLabel. El resultado de este procesamiento de datos es una matriz de expresión que contiene todas las características de todas las muestras analizadas. Se representa cada característica mediante una combinación única de m/z, combinación de clasificación

por COFRADIC™ y tiempo de retención de nanoCL y pueden estar presentes características en varias muestras que oscilan entre 1 y todas. Si está presente una característica en una muestra portará una razón, que representa la intensidad de la característica en la muestra de referencia (es decir el pico de ¹⁶O) con respecto a la intensidad en la muestra respectiva (el pico de ¹⁸O). Las características cuantificables recurrentes son características con una lectura de razón fiable en al menos dos muestras.

En el análisis de evolución temporal se compararon los perfiles de proteínas de controles de PBS en el día 4, ratones justo antes de la infección con *Salmonella*, en el día 1 tras la infección y en el día 4 y día 5 tras la infección (véase la figura 1). Con el fin de obtener biomarcadores para una respuesta a largo plazo, se analizaron proteínas que difirieron al menos en 2 veces entre el d1 y el d4 tras la infección, pero que no cambiaron significativamente entre el d0 y los controles de PBS o mostraron un cambio justo tras la infección (d0 frente al d1). Para biomarcadores útiles en diagnóstico a corto plazo, es decir diagnóstico de infección, se estudiaron proteínas que tenían un aumento de dos veces en la expresión entre ratones de control y ratones infectados en el d1 y no cambiaron en respuesta a la tensión del sangrado diario (control frente al d0). Este análisis produjo 80 grupos de proteínas que mostraron una tendencia durante la evolución de la infección y el desarrollo de septicemia. De estos, finalmente se retuvieron 2 biomarcadores biológicamente relevantes: lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y transcrito similar a TREM-1 (TRML1 / TLT1).

Ejemplo 2: Verificación de los resultados de COFRADIC™ en muestras de sangre obtenidas mediante el modelo de septicemia de ratón.

Con el fin de verificar los resultados de la tecnología COFRADIC™ N-terminal tal como se explicó de manera resumida anteriormente, se realizaron experimentos de ELISA y de inmunotransferencia de tipo Western con ambos marcadores en las muestras de sangre obtenidas de los ratones en la configuración de prueba (es decir ratones de control a los que se les inyectó PBS y ratones infectados con *Salmonella* en el d0, muestras de sangre extraídas en los d0-d7). Tal como puede observarse a partir de las figuras, la expresión de NGAL en las muestras de sangre de ratones aumenta entre el d1 y el d4 tras la infección (aumento de 25 veces) y continúa aumentando hasta el d5, de una manera análoga a las mediciones por COFRADIC™, confirmando así la identificación por COFRADIC™ de un cambio en el nivel de proteína durante la septicemia en el modelo de ratón. Se confirmaron adicionalmente estos resultados en un conjunto independiente de muestras de ratón.

Además, para el biomarcador transcrito similar a TREM-1, pudieron compararse los resultados de prueba obtenidos de la plataforma de tecnología COFRADIC™ con los análisis de inmunotransferencia de tipo Western de muestras de sangre obtenidas de ratones de control y de ratones infectados con *Salmonella* desde el d0 hasta el d7. De nuevo, se obtuvieron resultados comparables tanto con la plataforma de tecnología COFRADIC™ como con el análisis del nivel de proteína de inmunotransferencia de tipo Western convencional, es decir una regulación por disminución del similar a TREM-1, confirmando de nuevo la exactitud de la tecnología COFRADIC™. Obsérvese que sólo se detecta el transcrito similar a TREM-1 soluble en suero de ratones (20 kDa). Esto tiene sentido ya que el transcrito similar a TREM-1 es un receptor unido a membrana de plaqueta (longitud completa = 30 kDa), que se secreta, por lo que terminan en el suero, si se escinde el ancla de membrana del resto de la proteína, dando como resultado la parte de proteína soluble.

Ejemplo 3: Confirmación de los biomarcadores en muestras de septicemia humana.

Con el fin de poder extrapolar los resultados de prueba en el modelo de septicemia de ratón al pronóstico y diagnóstico de septicemia humana, se analizó el nivel de expresión de NGAL en muestras de seres humanos obtenidas de pacientes que tenían o bien SIRS o bien MODS septicémica. Los resultados de ELISA de la expresión de NGAL en muestras de septicemia humana en comparación con muestras sanas confirmaron de nuevo que, aunque el margen de error es bastante grande debido al tamaño de muestra pequeño, la proteína NGAL humana también se regula por incremento en muestras de SIRS y septicemia (MODS) humanos en comparación con muestras obtenidas de sujetos sanos.

Se realizó lo mismo para el transcrito similar a TREM-1, con resultados comparables, confirmando el transcrito similar a TREM-1 como un nuevo marcador de septicemia candidato.

Con el fin de aumentar la sensibilidad, se incluyó una etapa de inmunoprecipitación antes de la inmunotransferencia de tipo Western. Se realizó esta inmunoprecipitación en suero y plasma humanos de controles sanos y también en suero de pacientes que padecían septicemia y septicemia grave. Para esta inmunoprecipitación se usó un anticuerpo monoclonal de rata anti-transcrito similar a TREM-1 humano para capturar las proteínas de transcrito similar a TREM-1 sobre perlas de proteína A. Tras una etapa de unión durante la noche, se realizó una elución de las proteínas de transcrito similar a TREM-1 en condiciones no reductoras. Tras esta IP, se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo policlonal de cabra anti-transcrito similar a TREM-1 humano, seguido por un anticuerpo acoplado a HRP anti-IgG de cabra para la detección quimioluminiscente. Ya que el transcrito similar a TREM-1 es una proteína unida a una membrana que es abundante en los gránulos α de plaquetas en reposo y sobre la superficie de plaquetas activadas (Gattis *et al.*, 2006; J Biol Chem. 281, 13396-403, 2006), un lisado de plaquetas sirvió como control positivo en este experimento.

Los experimentos realizados dieron como resultado las siguientes conclusiones:

5 1. Puede detectarse transcrito similar a TREM-1 en suero humano, pero no en plasma humano. Una doble banda en las masas de 14 kDa y 12 kDa es visible en suero (figura 1, panel A), correspondiente a los datos presentados en la bibliografía por Gattis (Gattis *et al.*, 2006). El control positivo muestra 2 bandas. Una banda se encuentra a 35 kDa y representa la forma de longitud completa del transcrito similar a TREM-1, la otra banda se ubica a aproximadamente 22 kDa y representa la forma soluble del transcrito similar a TREM-1. Aún necesita esclarecerse el motivo de la masa inferior del doblete en suero en comparación con esta banda de 20 kDa en lisado de plaquetas.

10 2. Se confirmó la regulación por disminución de los niveles en suero de transcrito similar a TREM-1, tal como se muestra mediante la tecnología COFRADIC™, ya que el doblete es claramente visible en suero de los individuos sanos, sólo ligeramente visible en el suero de pacientes que padecen septicemia y no es visible en el suero del paciente que padece septicemia grave (se aplicó una carga igual y se verificó tras el desarrollo de la inmunotransferencia) (figura 1, panel B).

15 Debido a la expresión específica del transcrito similar a TREM-1 en plaquetas, podría correlacionarse la regulación por disminución de esta proteína con el recuento de plaquetas en vez de con la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, se compararon recuentos de plaquetas con los otros datos y no se encontró ninguna correlación, conduciendo a la conclusión de que los niveles en suero del transcrito similar a TREM-1 son indicativos de la gravedad de la enfermedad en septicemia.

Ejemplo 4: Correlación inversa entre la expresión de transcrito similar a TREM-1 y TREM-1 en modelos de septicemia.

20 Se conoce que TREM-1 es un marcador de septicemia, y se regula por incremento en muestras de pacientes con septicemia frente a sujetos sanos. Se ha encontrado que el nivel de la expresión de sTREML-1 se regula por disminución cuando comienza la septicemia. Usando el mismo sistema de modelo también se examinó la expresión de TREM-1 en muestras de grupos infectados y de control en diferentes puntos de tiempo tras la exposición. A partir de esto se puede observar que aunque se sTREML-1 regula por disminución durante la evolución del desarrollo de septicemia, su miembro de la familia TREM-1 muestra el cambio inverso, es decir, una regulación por incremento clara en puntos de tiempo posteriores tras la infección (véase la figura 9). Estos resultados confirman que el uso de ambos biomarcadores puede conducir a una herramienta de diagnóstico y pronóstico muy precisa para SIRS, septicemia, septicemia grave y MODS.

25 Ejemplo 5: Uso combinado de transcrito similar a TREM-1 y TREM-1 para mejorar el diagnóstico, pronóstico y/o predicción de septicemia.

Con el fin de evaluar la utilidad de la combinación de TREM-1 y transcrito similar a TREM-1 en una sola prueba de diagnóstico, se analizarán ambos marcadores en suero de un conjunto de muestras de SIRS, septicemia, septicemia grave y MODS humanas y/o en otros modelos de septicemia relevantes. Para esto, pueden usarse o bien ensayos basados en anticuerpos o bien métodos de detección basados en espectrometría de masas.

35 En vista de los resultados proporcionados en el presente documento en cuanto al marcador TLT-1, combinados con el conocimiento en cuanto al marcador TREM-1 de la bibliografía, se anticipa que la detección combinada de los biomarcadores TLT-1 y TREM-1 en muestras de suero permitirá un pronóstico más preciso del estado de septicemia en un sujeto, especialmente debido a su comportamiento opuesto (regulación por disminución de TLT-1 frente a regulación por incremento de TREM-1).

40 El cálculo de la razón de los niveles de la expresión en suero de TREM-1 y TLT-1 creará así una herramienta estadísticamente poderosa para el pronóstico eficaz y exacto de septicemia, porque se enfatizarán las diferencias en el nivel de expresión entre sujetos sanos y enfermos.

En esta solicitud se hace referencia a varias publicaciones y documentos de patentes con el fin de describir de manera más completa el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

45

REIVINDICACIONES

1. Método para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia, septicemia grave, choque septicémico, o MODS en un sujeto de prueba que comprende:
 - 5 (a) medir el nivel de transcrito de receptor similar a TREM-1 soluble (sTLT1) y TREM-1 en una muestra de sangre o suero extraída de dicho sujeto de prueba, y
 - (b) comparar dicho nivel de transcrito de receptor similar a TREM-1 soluble (sTLT1) y TREM-1 con un nivel de referencia de transcrito de receptor similar a TREM-1 soluble (sTLT1) y TREM-1 obtenido de una muestra de un sujeto sano, en la que
 - 10 (c) un nivel de expresión reducida de sTLT-1 y una expresión aumentada de TREM-1 en la muestra del sujeto de prueba en comparación con los de una muestra de un sujeto sano o sin septicemia indica que el sujeto de prueba tiene o corre el riesgo de tener septicemia, septicemia grave, choque septicémico o MODS.
2. Método según la reivindicación 1, en el que se mide adicionalmente el nivel de expresión de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en NGAL, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP) en una muestra de sangre o suero de dicho sujeto de prueba y se compara con los niveles de expresión de éstos uno o más marcadores en la muestra del sujeto sano o sin septicemia.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que
 - 20 en la etapa (b) se usan las mediciones obtenidas en la etapa a) para crear un perfil para dichos biomarcadores; y
 - en la etapa (c) se compara dicho perfil obtenido en la etapa (b) con un perfil de biomarcadores de referencia obtenido de un sujeto sano o sin septicemia.
4. Uso de un kit que comprende:
 - 25 (a) moléculas de unión al transcrito de receptor similar a TREM-1 soluble (sTLT1) y TREM-1 humanos
 - (b) también opcionalmente moléculas de unión a al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en NGAL, procalcitonina (PCT) y proteína C reactiva (CRP), y
 - (c) valor(es) de referencia de la cantidad del/de los biomarcador(es) seleccionado(s) en un sujeto sano o sin septicemia para la comparación de los resultados, para la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia, septicemia grave, choque septicémico o MODS.
5. Uso según la reivindicación 4, en el que se usa la combinación de sTLT-1, TREM-1 y PCT.
- 30 6. Uso según la reivindicación 4 ó 5, en el que la molécula de unión se selecciona del grupo de anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, aptámeros, fotoaptámeros, proteínas de interacción específicas, moléculas pequeñas de interacción específicas.
7. Método según la reivindicación 2 ó 3, en el que la etapa (c) comprende comparar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra de sangre o suero del sujeto de prueba con un intervalo de valores normales de los biomarcadores seleccionados en sujetos de control que están sanos o que no tienen septicemia; mediante lo cual un aumento o disminución en la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra de sangre o suero hasta un nivel superior o inferior al intervalo de valores normales de biomarcadores seleccionados es indicativo de septicemia, septicemia grave, choque septicémico o MODS.
- 35 8. Método según la reivindicación 2 ó 3, en el que la etapa (c) comprende comparar la cantidad de los biomarcadores seleccionados en la muestra de sangre o suero del sujeto de prueba con un intervalo de valores de los biomarcadores seleccionados obtenidos de sujetos sin septicemia, con septicemia, septicemia grave, choque septicémico o MODS respectivamente; mediante lo cual 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 ausencia de septicemia, de septicemia, septicemia grave, choque septicémico o MODS respectivamente.
- 40 9. Método según la reivindicación 1, en el que la predicción, pronóstico y/o diagnóstico de septicemia, septicemia grave, choque septicémico o MODS se evalúa obteniendo un perfil de anticuerpos candidatos obtenido de una muestra biológica tomada de dicho individuo en el que dicho perfil de anticuerpos candidatos se basa en un anticuerpo frente al transcrito de receptor similar a TREM-1 soluble humano (sTLT1), TREM-1 y opcionalmente NGAL, procalcitonina (PCT) y/o proteína C reactiva (CRP); y (b) comparar dicho perfil de anticuerpos candidatos con un perfil de anticuerpos de referencia de un sujeto
- 45
- 50

sano o sin septicemia.

10. Uso del método según la reivindicación 1, para monitorizar la progresión del tratamiento o la intervención del estado de septicemia en un individuo.
- 5 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 ó 7 a 10, en el que se usa la combinación de sTLT-1, TREM-1 y PCT.
- 10 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de expresión o perfil de biomarcadores se establece usando tecnología de inmunoensayo seleccionada del grupo de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA de tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA multiplex, radioinmunoanálisis o tecnologías de ELISPOT o métodos de análisis por espectrometría de masas de las proteínas presentes en dicha muestra.
- 15 13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de expresión del biomarcador o perfil de biomarcadores se establece usando tecnología de inmunoensayo seleccionada del grupo de ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA de tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA multiplex, radioinmunoanálisis o tecnologías de ELISPOT o métodos de análisis por espectrometría de masas de las proteínas presentes en dicha muestra.

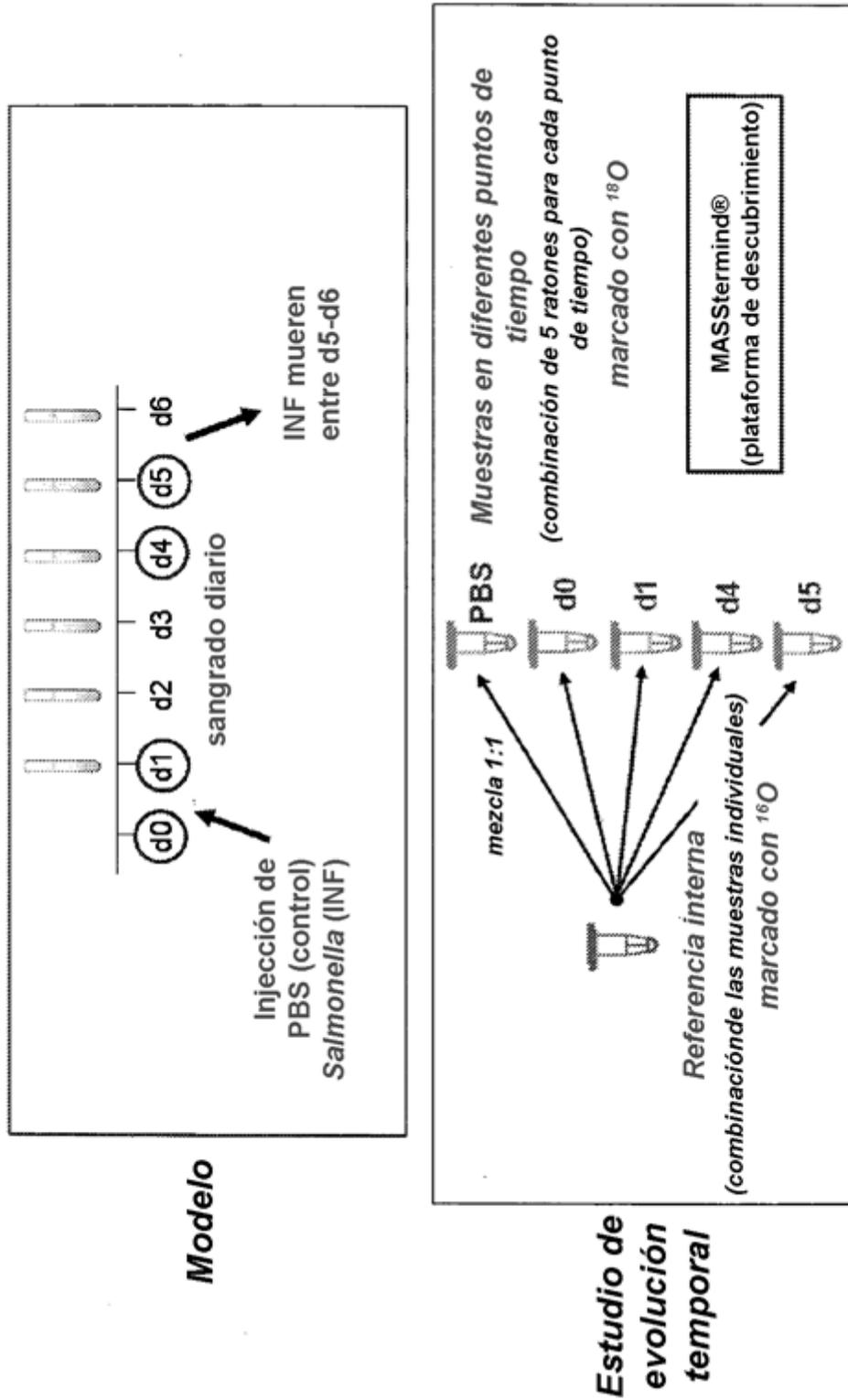


Figura 1

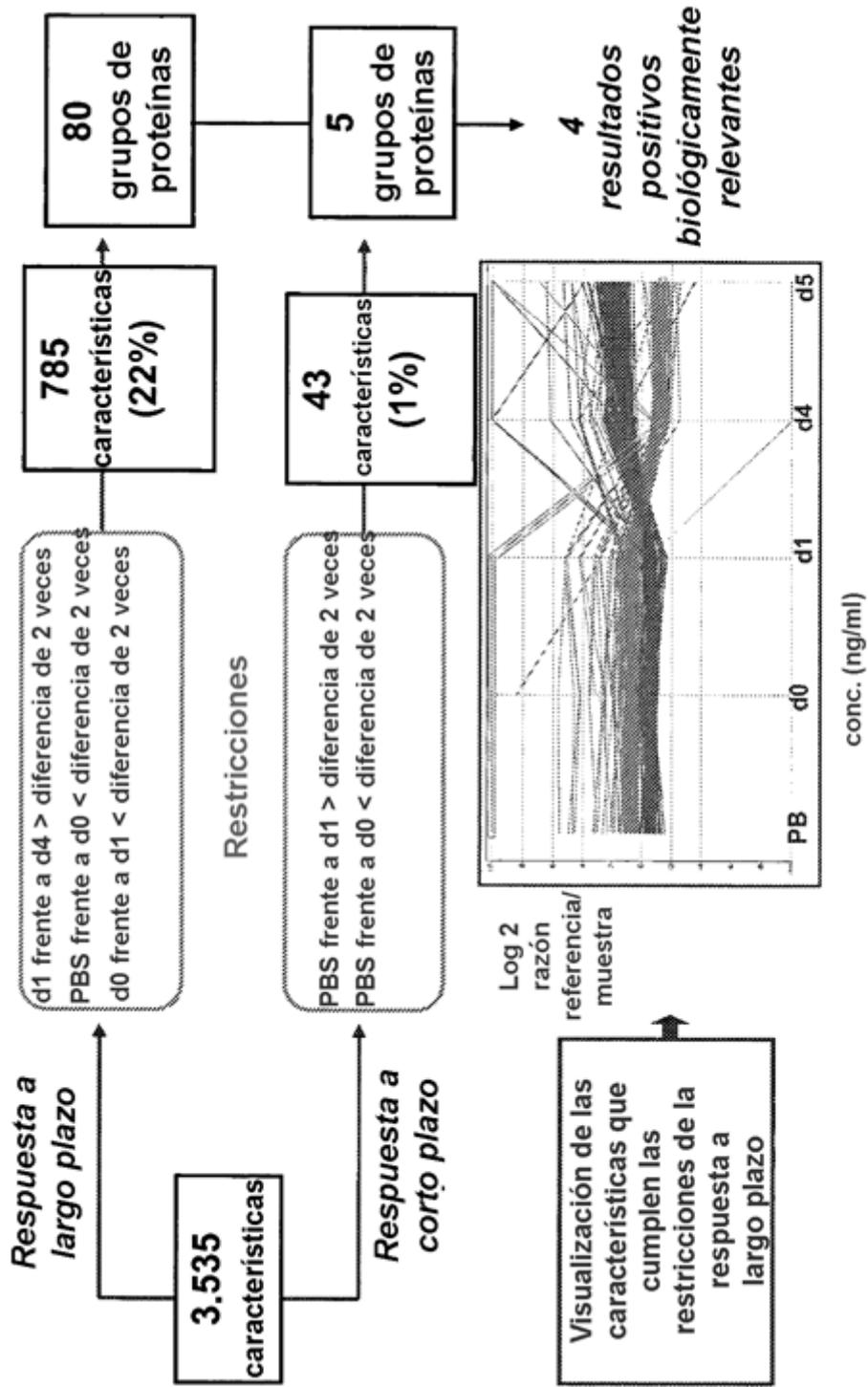


Figura 2

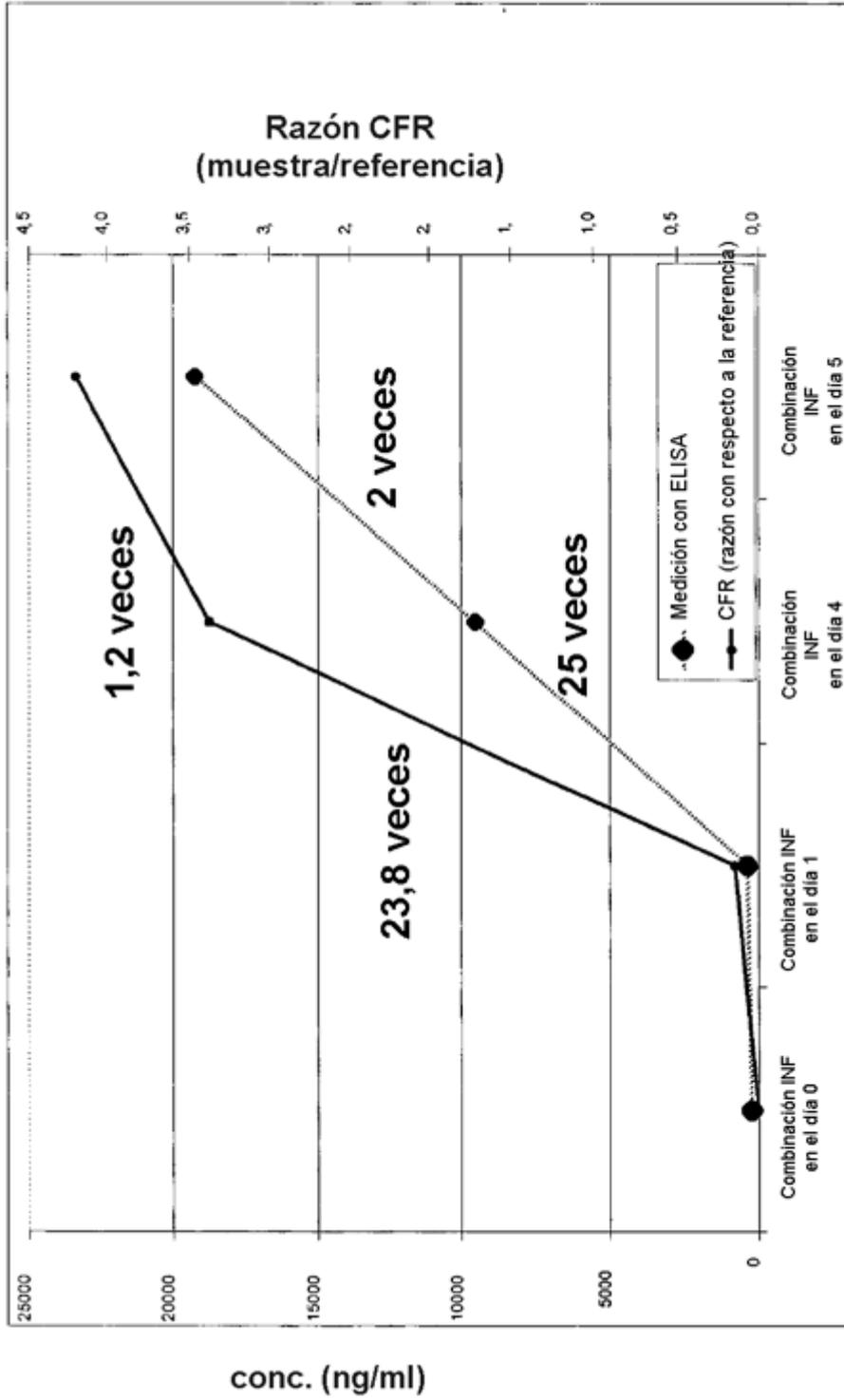


Figura 3

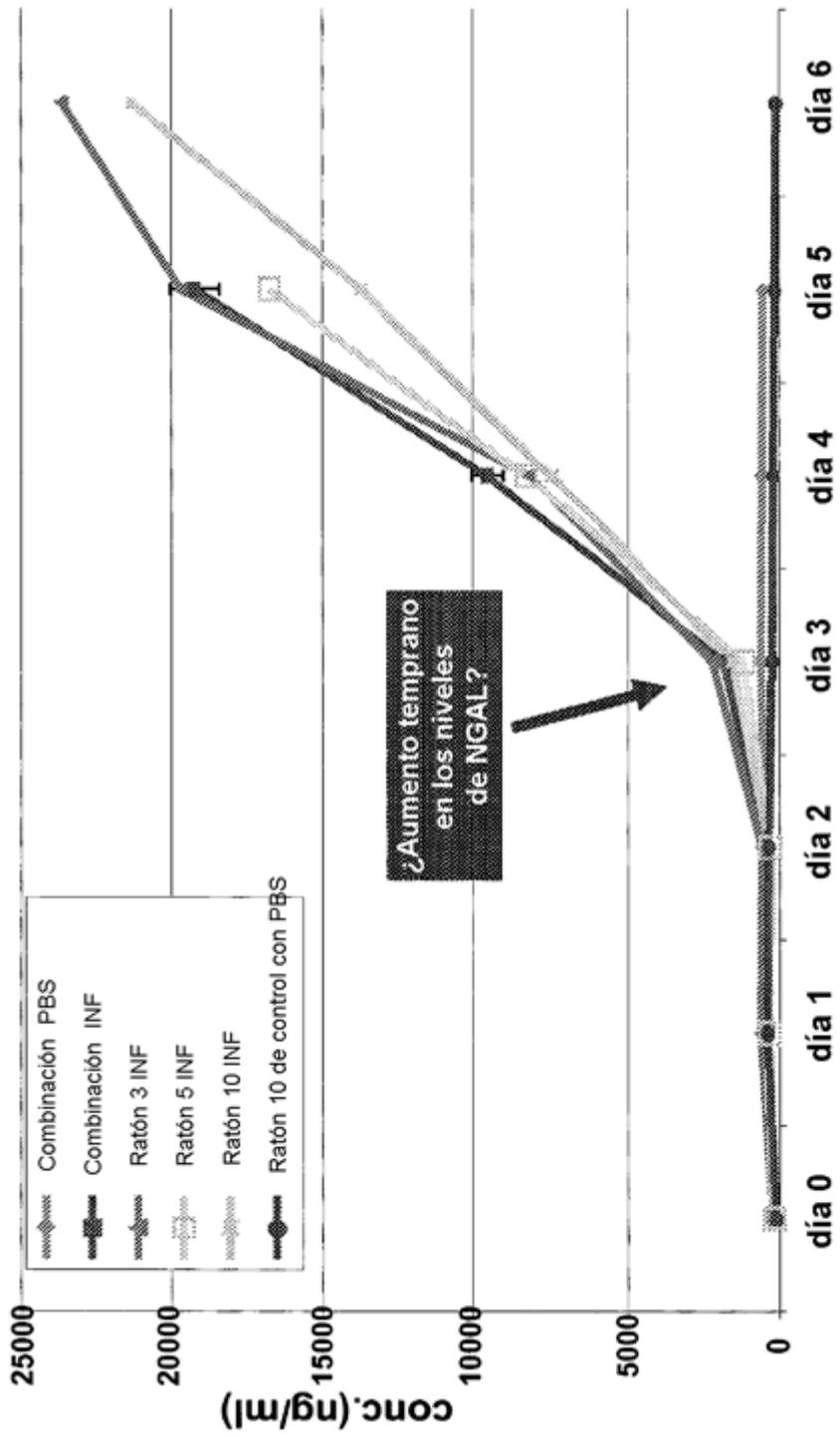


Figura 4

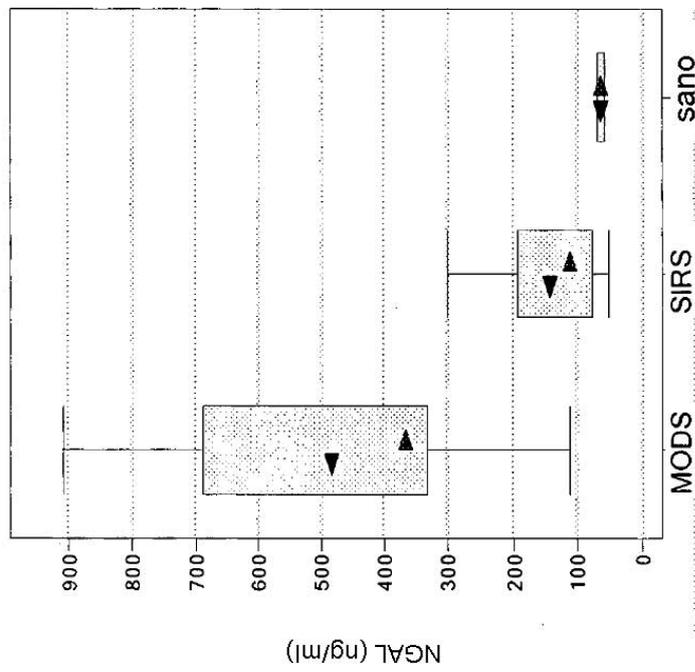
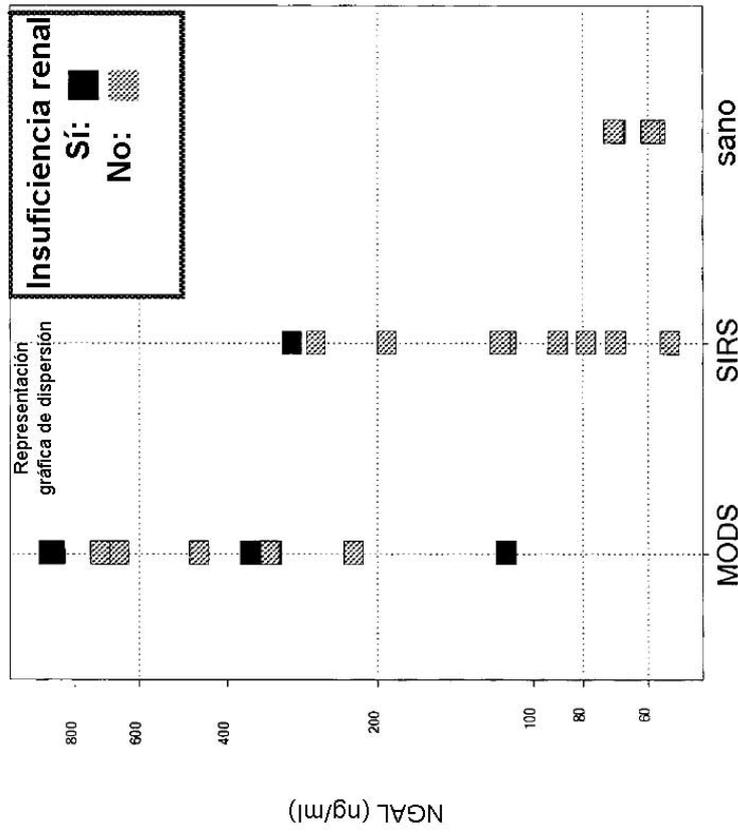


Figura 5

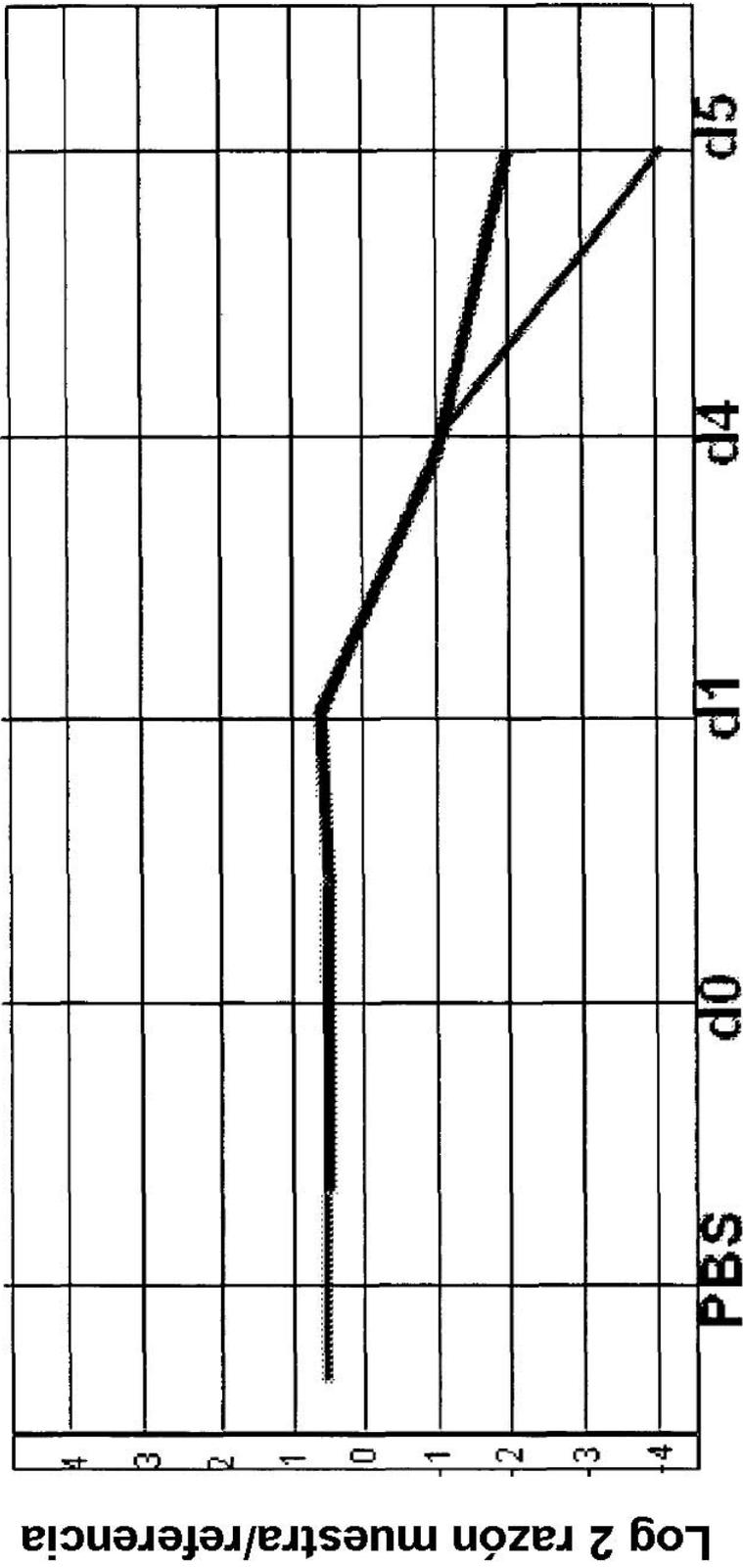


Figura 6

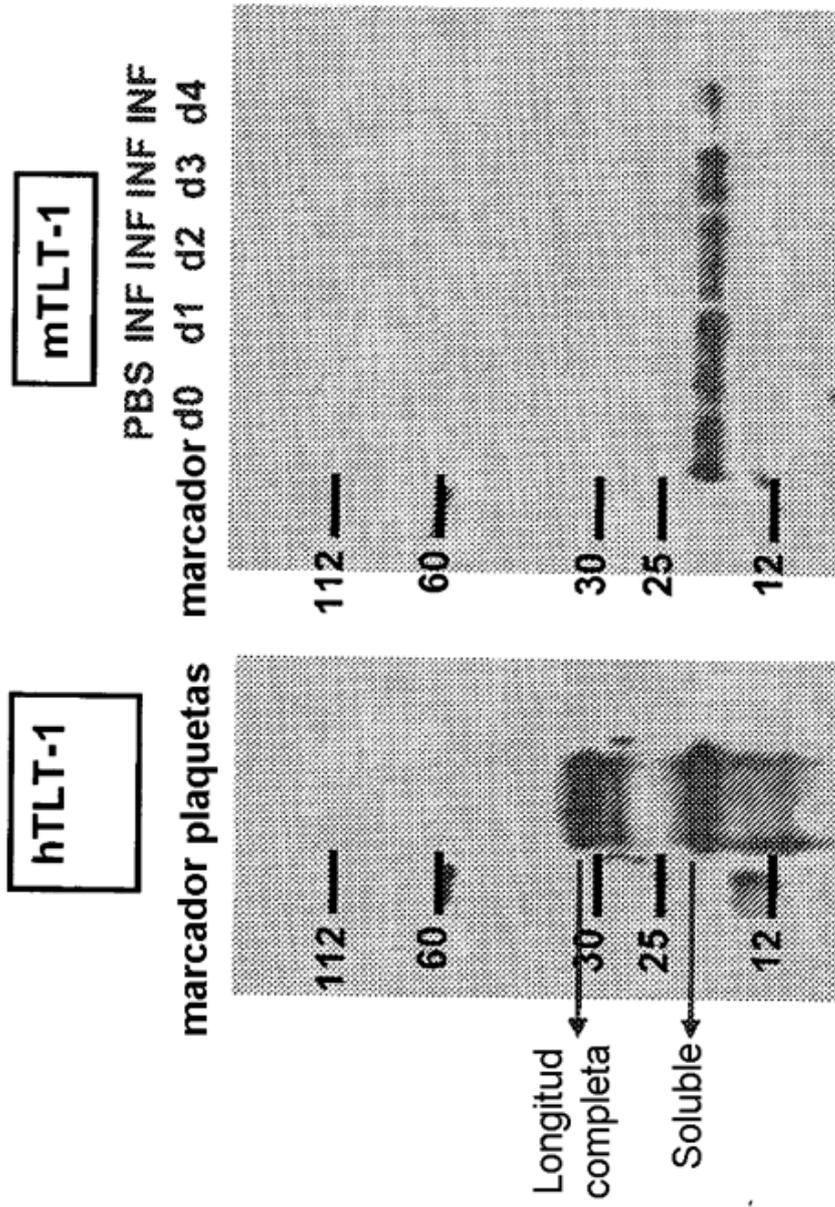


Figura 7

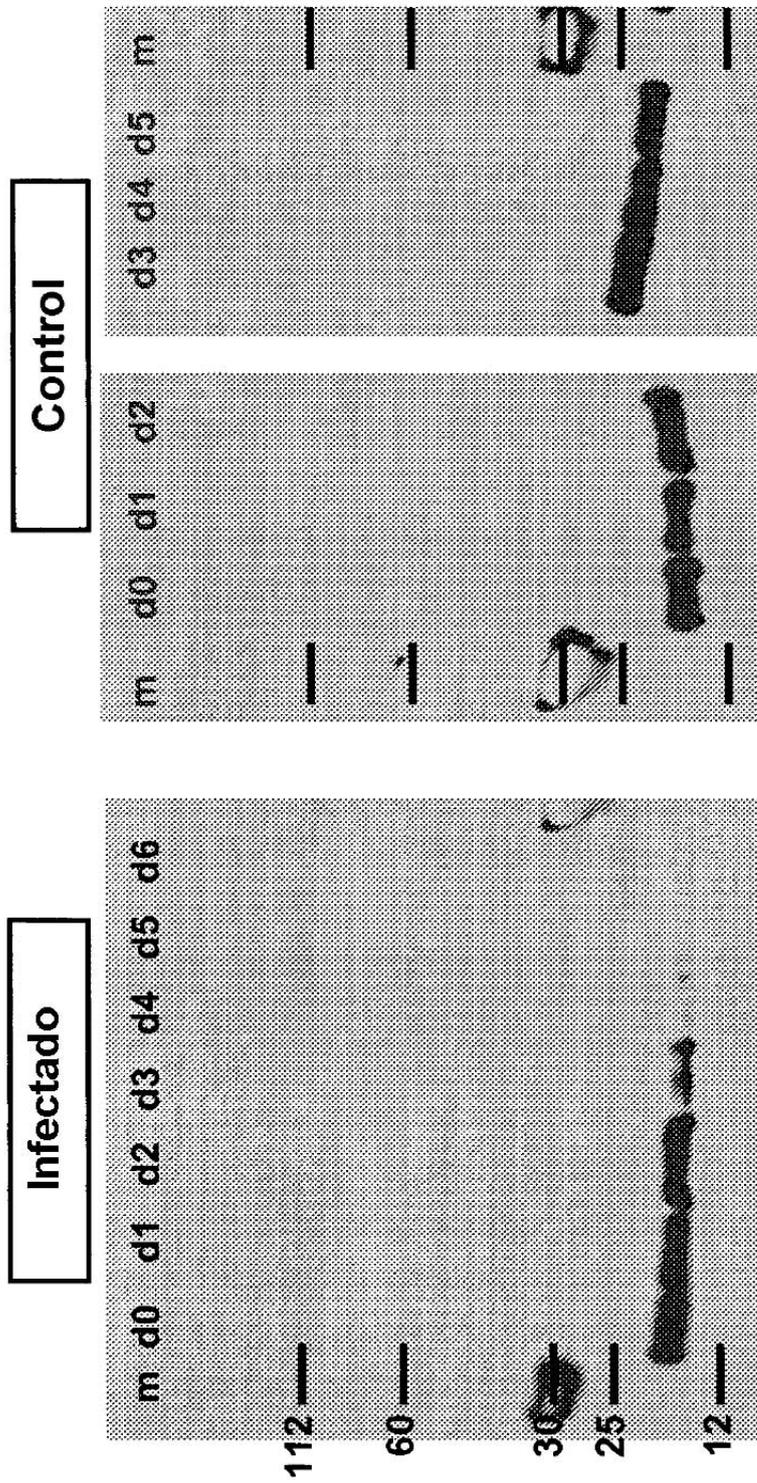


Figura 8

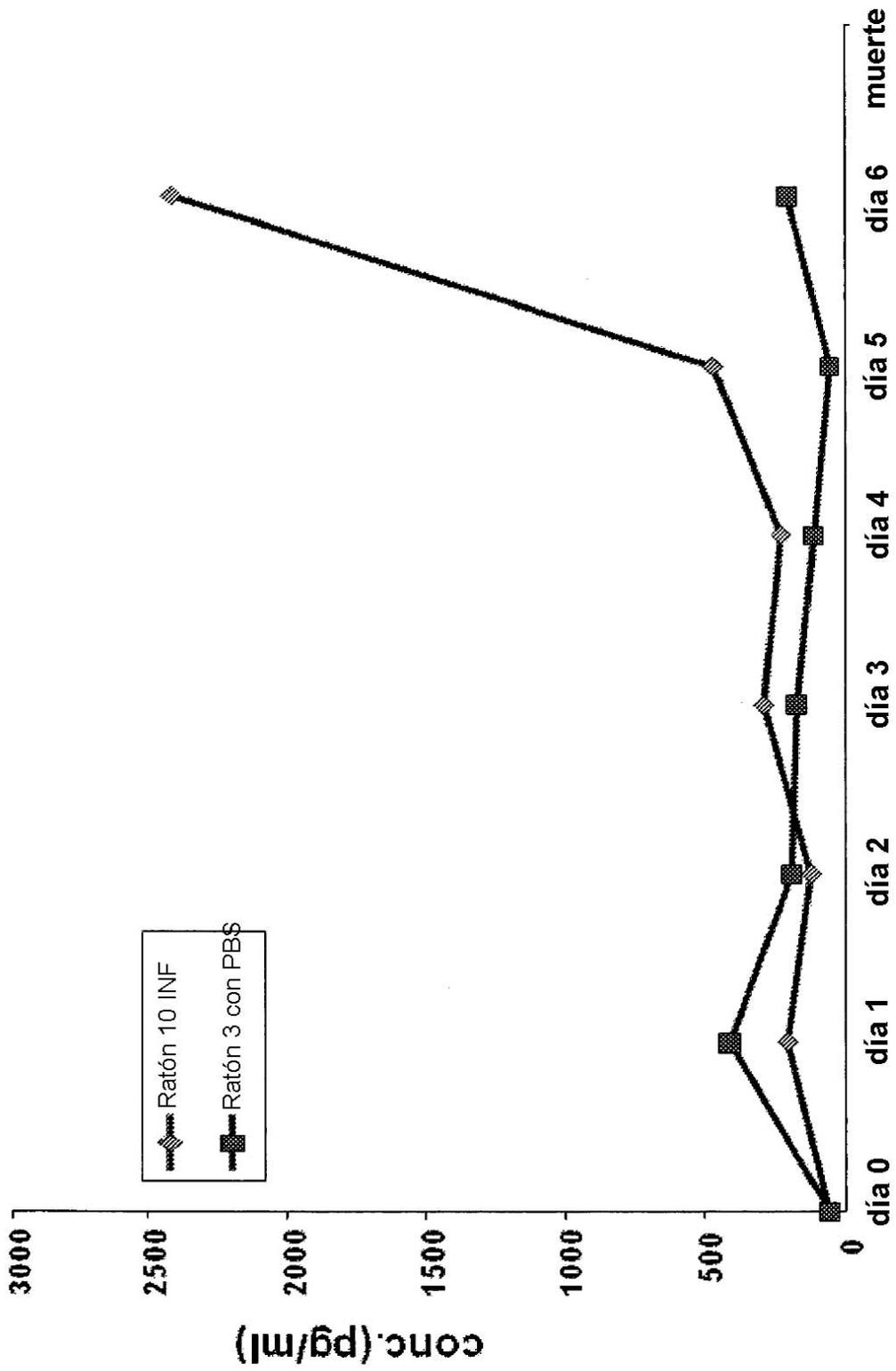


Figura 9

Figura 10

