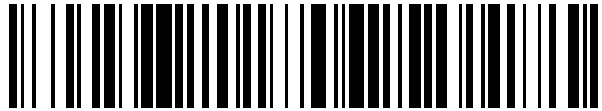


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 854**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2011 E 11708189 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2542894**

54 Título: **Diagnóstico y predicción precoces basados en la detección de IL-6 del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y sepsis en pacientes asintomáticos**

30 Prioridad:

02.03.2010 EP 10002190

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

06.07.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

Grenzacherstrasse, 124

4070 Basel, CH y

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT GRAZ (50.0%)

72 Inventor/es:

GRUEB, SUSANNE;

SMOLLE-JUETTNER, FREYJA-MARIA;

NEUBOECK, NICOLE y

WEINBERG, ANNELIE-MARTINA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 539 854 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

Diagnóstico y predicción precoces basados en la detección de IL-6 del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y sepsis en pacientes asintomáticos

5 A pesar de los avances de la medicina moderna, el SRIS y la sepsis representan un síndrome común y devastador de frecuencia creciente en todo el mundo. Es una de las causas más frecuentes de muerte entre pacientes bajo cuidados intensivos.

10 Las evaluaciones epidemiológicas han encontrado que varias condiciones pueden describirse como en riesgo de desarrollo de sepsis y sepsis grave. Los factores de riesgo descritos son género (hombre), raza (negra), etnicidad (hispana), edad avanzada y las comorbilidades siguientes: diabetes mellitus, neoplasias, alcoholismo, infección por VIH, tratamiento con agentes inmunosupresores (Hodgin K.E., Moss M., The epidemiology of Sepsis, Current Pharm. Design 14:1833-1839, 2008). Además, un suceso real, por ejemplo cirugía mayor, traumatismos o quemaduras que resultan en heridas en grandes superficies representan un riesgo adicional. El SRIS sin infección puede producirse en sucesos tales como la pancreatitis, el choque, la isquemia y los politraumatismos.

20 Desde el 1991, el American College of Chest Physicians (ACCP) y la Society of Critical Care Medicine (SCCM) ha proporcionado un marcado conceptual y práctico para definir la respuesta inflamatoria sistémica a la infección (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis, Crit. Care Med. 20(6):864-74, junio de 1992). Anteriormente se utilizaban intercambiablemente diversas terminologías, causando mucha confusión. La contribución principal de la conferencia fue el desarrollo de definiciones uniformes para los diversos estadios de la sepsis que pudiesen aplicarse universal e uniformemente a los pacientes que sufren de estos trastornos.

25 En el momento en que aparecen los signos clínicos, ya se ha iniciado el desarrollo y agravamiento del SRIS.

30 IL-6 pertenece a una familia de citoquinas gp 130. Todos los miembros de la familia comparten una estructura proteica de 4 hélices y ejercen su señalización mediante un complejo de receptores que contiene por lo menos una subunidad de la glucoproteína receptora transductora de señales gp130. IL-6 se une al receptor de IL-6 (IL-6R) en primer lugar y este complejo IL-6/IL-6R se une a gp130, conduciendo a una homodimerización y posterior activación de la ruta de transducción de señales de Jak/Stat y Ras/Map/Akt (Taga T., Kishimoto T. Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines, Annu. Rev. Immunol. 15:797-819, 1997; Drucker C., Gewiese J., Malchow S., Scheller J., Rose-John S., Impact of Interleukin-6 Classic- and Trans-signaling on Liver Damage and Regeneration, J. Autimm., 2009, en prensa). Se han descrito dos rutas de señalización diferentes, una en la que IL-6 se une al receptor de IL-6 unido a membrana que conduce a la dimerización y activación de la proteína transductora de señales gp130. Esta ruta se encuentra restringida a las células que expresan el receptor de IL-6 sobre su superficie, lo que sólo se produce en algunas poblaciones celulares. Sin embargo, existe una ruta alternativa en la que IL-6 se une a un IL-6R soluble natural (IL-6R_s) y este complejo IL-6/IL-6R_s activa gp130. De esta manera, las células sin el receptor de IL-6 unido a membrana pueden responder a IL-6. Esta segunda ruta denominada de señalización trans también afecta a células que expresan receptores de IL-6 unidas a membrana, por ejemplo hepatocitos. En este contexto, la activación de la señalización trans de IL-6 puede incrementar los efectos de estimulación de IL-6. En 1988 se propuso denominar la citoquina IL-6, ya que algunos estudios adicionales demostraron que la proteína muestra actividades no sólo sobre las células B sino también sobre las células T, las células madre hematopoyéticas, hepatocitos y células cerebrales (Kishimoto T., Hirano T., A New Interleukin with Pleiotropic Activities, BioEssays 9(1):11-15, julio de 1988).

50 Ya en 1989 se había informado de que los líquidos corporales de pacientes con infección aguda local y el suero de los pacientes con bacteremia Gram-negativa y Gram-positiva contenía niveles elevados de IL-6 biológicamente activa. Se consideró que la presencia de IL-6 en el suero durante la infección aguda sugería que esta citoquina probablemente participaba en una cascada de sucesos locales y sistémicos que ayudaban a limitar el daño a los tejidos (Helfgott D.C., Tatter S.B., Santhanam U., Clarick R.H., Bhardwaj N., May L.T., Sehgal P.B., Multiple Forms of IFN-β2/IL-6 in Serum and Body Fluids during Acute Bacterial Infection, J. Immunology 142:948-953, 1989).

55 Las mediciones secuenciales de IL-6 en suero o plasma de pacientes ingresados en la UCI (unidad de cuidados intensivos) que ya presentaban signos clínicos de sepsis demostraron ser útiles en la evaluación de la gravedad del SRIS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), la sepsis y el choque séptico y en la predicción del resultado clínicos de estos pacientes (Pinsky M.R., Vincent J.L., Alegre M., Dupont E., Serum Cytokine Levels in Human Septic Shock. Relation to Multiple Organ Failure and Mortality, Chest 103:565-575, 1993; Oda S., Hirasawa H., Shiga H., Nakanishi K., Matsuda K., Nakamura M., Sequential measurements of IL-6 blood levels in patients with SIRS/sepsis, Cytokine 29:169-175, 2005; Marti L., Cervera C., Filella X., Martin J.L., Almela M., Moreno A., Cytokine-release patterns in elderly patients with systemic inflammatory response syndrome, Gerontology 53(5):239-44, 2007).

65 Mokart *et al.* (British Journal of Surgery 89:1450-1456, 2002) dan a conocer la determinación de IL-6 en muestras obtenidas antes de la cirugía y 1, 2, 3, 4 o 5 días después de la cirugía.

Mokart D. *et al.* (Br. J. Anaesth. 94(6):767-7, junio de 2005) dan a conocer que, basándose en la detección de PCT e IL-6 en pacientes sometidos a cirugía para el cáncer, en la que se muestrea IL-6 durante la mañana previa a la cirugía además de la mañana después de la cirugía, es decir, un intervalo de tiempo superior a por lo menos 20 h. Basándose en las mediciones de PCT e IL-6 se predice la sepsis en pacientes que manifiestan SRIS y 1 día después de la cirugía, es decir, los niveles de IL-6 no permiten diagnosticar o predecir el riesgo de sufrir SRIS o sepsis en pacientes que no manifiestan síntomas de SRIS el día 1 después de la cirugía.

Mokart D. *et al.* (World J. Surgery 33:558-566, 2009) dan a conocer un método de identificación de pacientes en riesgo de desarrollar sepsis basado en IL-6 y PCT con una muestra de sangre recogida una vez al día.

En resumen, ninguna de las publicaciones anteriormente indicadas permite un diagnóstico de SRIS y sepsis, o la predicción del riesgo de sufrir o desarrollar SRIS y sepsis, antes de la aparición de signos y síntomas clínicos generalmente reconocidos de SRIS y sepsis, es decir, en un paciente asintomático. En consecuencia, existe una necesidad de un método diagnóstico y un método de seguimiento del tratamiento que permitan una detección sensible y precoz de SRIS o sepsis y para predecir el riesgo de sufrir o desarrollar SRIS y sepsis antes de la aparición de los signos y síntomas clínicos de SRIS.

De acuerdo con lo anterior, uno de los objetivos subyacentes a la presente invención se encuentra en la provisión de un método que resuelva por lo menos una de las desventajas de los enfoques anteriormente conocidos para la predicción de SRIS y sepsis.

El problema se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones 1 a 7.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere a un método para la detección o diagnóstico del riesgo de desarrollar un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) o sepsis en un paciente humano asintomático tras un tratamiento invasivo, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) determinar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma, que presenta una identidad de secuencia respecto a la molécula de la IL-6 humana de por lo menos 80% a lo largo de la longitud completa de la IL-6 humana en una muestra de sangre, plasma o suero aislada de un paciente después de dicho tratamiento invasivo,
- b) comparar el nivel de IL-6 o de dicha variante de la misma determinada en la etapa a) con un nivel de referencia, en el que dicho nivel de referencia se calcula multiplicando un nivel de línea base de IL-6 por un factor de por lo menos 50, en el que dicho nivel de línea base se ha obtenido del paciente antes, durante o en las seis horas posteriores a dicho tratamiento invasivo, y
- c) detectar o diagnosticar el riesgo de desarrollar un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) o sepsis,

en el que las etapas a) y b) se repiten para cada muestra, y en el que dichas muestras en la etapa a) se aísla a intervalos periódicos durante un periodo de entre 3 y 10 días, encontrándose comprendidos dichos intervalos entre 15 minutos +/- 20% y 12 horas +/- 20%, y en el que el nivel determinado en la etapa a) superior al nivel de referencia indica que el paciente humano presenta un riesgo elevado de desarrollar SRIS o sepsis.

Se da a conocer un método para la detección o el diagnóstico de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) o sepsis, o para la detección o el diagnóstico de un riesgo de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis, en un paciente asintomático, que comprende las etapas de:

- a) determinar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma, en una muestra del paciente,
- b) comparar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma, determinado en la etapa a), con un nivel de referencia,
- c) detectar o diagnosticar el SRIS, o detectar o diagnosticar un riesgo de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis, en el que la muestra se aísla por lo menos 2 veces a intervalos cortos y las etapas a) y b) se repiten para cada muestra.

Se da a conocer además un método para detectar el nivel de IL-6 en un paciente asintomático para la detección o el diagnóstico de un riesgo de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis, que comprende las etapas de:

- a) determinar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma en una muestra del paciente y
- b) comparar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma determinada en la etapa a) con un nivel de referencia, preferentemente basándose en la comparación se detecta o se diagnostica si el paciente se encuentra en riesgo de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis,

en el que la muestra se aísla por lo menos 2 veces a intervalos cortos y las etapas a) y b) se repiten para cada muestra.

Se da a conocer además un método para la detección o diagnóstico de un riesgo de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis en un paciente asintomático seleccionado de entre un paciente traumatológico, un paciente con quemaduras, un paciente sometido a un tratamiento invasivo, un paciente sometido a cirugía, que comprende las etapas de:

- a) determinar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma en una muestra del paciente,
- b) comparar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma determinada en la etapa a) con un nivel de referencia,
- c) detectar o diagnosticar SRIS, o detectar o diagnosticar un riesgo de desarrollar o sufrir SRIS,

en el que se aísla una muestra por lo menos 2 veces a intervalos cortos y se repiten las etapas a) y b) para cada muestra, preferentemente se aísla por lo menos una muestra tras el ingreso del paciente y se aísla por lo menos una muestra tras iniciarse o terminarse un tratamiento.

5 Por ejemplo, en el caso de que el paciente asintomático se somete a un tratamiento invasivo, se aísla por lo menos una muestra antes de la intervención quirúrgica o para obtener un nivel de línea base de IL-6, después se aísla por lo menos una muestra adicional y se analiza para los niveles de IL-6 a intervalos cortos tras completar el tratamiento invasivo.

10 Preferentemente, se utiliza IL-6 o medios para detectar IL-6 con el fin de detectar o diagnosticar el riesgo de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis en un paciente asintomático, en el que el nivel de IL-6 se determina por lo menos 2 veces a intervalos cortos.

15 Inesperadamente los presentes inventores observaron que el método de la presente invención mostraba que las mediciones consecutivas próximas en el tiempo de IL-6, preferentemente desde antes de un tratamiento, por ejemplo una terapia asociada a un riesgo significativo de resultar en SRIS o sepsis, tal como una cirugía mayor, permitía una identificación clara de los pacientes asintomáticos en riesgo de sufrir o desarrollar SRIS, incluyendo sepsis, mucho antes de la aparición de signos clínicos o cambios patológicos de parámetros de laboratorio convencionalmente utilizados para diagnosticar SRIS/sepsis (ver, por ejemplo, los Ejemplos). Concretamente, la presente invención describe por primera vez la cinética de IL-6 en pacientes asintomáticos, en algunos de los cuales pudo identificarse SRIS en desarrollo. Se aclaró que un gran incremento de la concentración de IL-6 en comparación con el nivel de línea base indicaba un riesgo elevado de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis, mucho antes de manifestar síntomas o signos clínicos que apoyasen el diagnóstico de SRIS y sepsis. De esta manera, al contrario de lo anteriormente conocido, en lugar de analizar el nivel absoluto de IL-6 en la muestra, el diagnóstico del riesgo de sufrir o desarrollar SRIS o sepsis se basa esencialmente en la determinación del incremento del nivel de IL-6 durante el tiempo. Debido a las propiedades de respuesta temprana del método de la presente invención previamente a la aparición de signos y síntomas clínicos de SRIS y sepsis, ahora resulta posible iniciar los tratamientos apropiados con mayor antelación, en comparación con el método anteriormente conocido de diagnóstico de SRIS y sepsis. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la probabilidad de una terapia exitosa de SRIS o de prevención de SRIS o sepsis se incrementa y puede evitarse la muerte de pacientes como resultado del SRIS o la sepsis.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)" es generalmente conocida por el experto en la materia. La expresión preferentemente comprende SRIS tal como se define en las definiciones de consenso de la conferencia ACCP/SCCM (1992/2003) (ver, por ejemplo, American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis, Crit. Care Med. 20(6):864-74, junio de 1992). Preferentemente un paciente se considera que sufre SRIS en el caso de que manifieste por lo menos 2 síntomas de a) a d) a continuación, preferentemente de a) a e) a continuación:

- 40
- a) recuento de glóbulos blancos (RGB) >aproximadamente 12.000/ μ l o <aproximadamente 4.000/ μ l,
 - b) temperaturas corporales >aproximadamente 38°C o <aproximadamente 36°C,
 - c) tasa cardíaca >aproximadamente 90 latidos/minuto,
 - 45 d) tasa respiratoria >aproximadamente 20 respiraciones/minuto o una presión parcial de CO₂ inferior a aproximadamente 32 mmHg, y
 - e) más de 10% de glóbulos blancos inmaduros entre los glóbulos blancos en el recuento.

El recuento de glóbulos blancos habitualmente se determina utilizando dispositivos automáticos de recuento.

50 Los criterios de consenso para el diagnóstico del SRIS en niños se dan a conocer en Goldstein *et al.* (Pediatr. Crit. Care Med. 6(1):2-8, 2005; ver en particular las Tablas 2 y 3). Un paciente pediátrico asintomático en el sentido de la presente invención es un paciente que muestra menos de 2, preferentemente menos de 1 síntoma de entre los indicados en Goldstein *et al.* (*supra*).

55 El riesgo de sufrir o desarrollar SRIS se diagnostica o se detecta basándose en el nivel de IL-6 detectado en una muestra de un paciente que es superior al nivel de referencia. En este caso preferentemente no se requiere para el diagnóstico o la detección del riesgo de sufrir o desarrollar SRIS o sepsis que el paciente muestre por lo menos dos de los síntomas de SRIS anteriormente indicados (a) a (e). Preferentemente, el riesgo de sufrir o desarrollar SRIS o sepsis puede diagnosticarse o detectarse únicamente basándose en un nivel de IL-6 determinado que es superior al nivel de referencia. Resulta preferente que el valor de referencia se determine multiplicando un nivel de IL-6 determinado previamente (por ejemplo un nivel de línea base de IL-6) en un paciente dado por un factor definido en otros sitios de la presente memoria (por ejemplo un factor de por lo menos aproximadamente 50, o de por lo menos aproximadamente 100, o de por lo menos aproximadamente 500 o de por lo menos aproximadamente 1.000). Cualquier nivel de IL-6 determinado en una muestra aislada del paciente dado *después* de recoger la muestra o muestras anteriores (que preferentemente proporcionan el nivel de línea base), y el nivel de IL-6 de las cuales es superior al nivel de referencia, es indicativo de que el paciente presenta un riesgo elevado de desarrollar o sufrir

SRIS. La inesperada contribución de los presentes inventores fue descubrir que, basándose en la determinación de IL-6, resulta posible la detección y el diagnóstico precoces del riesgo de sufrir o desarrollar SRIS, preferentemente antes de que el paciente manifieste dos o más de los síntomas de SRIS anteriormente indicados (a) a (e).

- 5 En el caso de que el paciente muestre adicionalmente una infección diagnosticada, el paciente se considerará en riesgo de desarrollar o sufrir sepsis.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, para "sepsis" los criterios diagnósticos indicados para "SRIS" anteriormente resultan de aplicación mutatis mutandis; sin embargo, en la sepsis, la infección diagnosticada es el parámetro diagnóstico adicional obligatorio. Los métodos para la detección o el diagnóstico de una infección son generalmente conocidos en el campo. Como resultado del método de la presente invención, el riesgo de desarrollar sepsis preferentemente puede ahora detectarse o diagnosticarse basándose en sólo dos parámetros, es decir, un nivel de IL-6 superior al nivel de referencia y una infección diagnosticada.

15 Una "infección" en el sentido de la presente invención preferentemente es una infección vírica, fúngica o bacteriana, preferentemente una infección bacteriana asociada a bacterias seleccionadas de entre *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* o *Pseudomonas aeruginosa*. La infección puede ser también una infección por un hongo seleccionado de entre *Candida albicans*, *Candida tropicalis* o *Aspergillus fumigatus*.

20 Una infección se diagnostica basándose en ensayos y criterios generalmente conocidos médicamente. Preferentemente la infección se diagnostica basándose en un cultivo bacteriano, por ejemplo un medio de cultivo inoculado con una muestra del paciente, o basado en métodos diagnósticos moleculares. Una infección fúngica puede determinarse, por ejemplo, mediante ensayos generalmente conocidos, tales como Septifast.

25 El término "paciente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a seres humanos, preferentemente hombres o mujeres, preferentemente niños prenatales, perinatales, postnatales o neonatales.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "paciente asintomático" pretende incluir un paciente que no manifiesta signos y síntomas clínicos generalmente considerados para establecer el diagnóstico de SRIS. Preferentemente el paciente asintomático manifiesta menos de 2 síntomas, preferentemente menos de 1 síntoma de entre los siguientes:

- 35 a) recuento de glóbulos blancos (RGB) >aproximadamente 12.000/μl o <aproximadamente 4.000/μl,
 b) temperatura corporal >aproximadamente 38°C o <aproximadamente 36°C,
 c) tasa cardíaca >aproximadamente 90 latidos/minuto,
 d) tasa respiratoria >aproximadamente 20 respiraciones/minuto o una presión parcial de CO₂ inferior a aproximadamente 32 mmHg, y
 e) más de 10% de glóbulos blancos inmaduros entre los glóbulos blancos en el recuento. Preferentemente, el paciente asintomático incluye un paciente seleccionado de entre un paciente traumatológico, un paciente con quemaduras, un paciente sometido a un tratamiento invasivo, un paciente sometido a una intervención quirúrgica, preferentemente una intervención quirúrgica seleccionada de entre una intervención endoscópica o seleccionado de entre resultados de un escaneo de TC o un escaneo de TC/PET, o un paciente en riesgo de desarrollar SRIS o sepsis, tal como un paciente que cumple por lo menos uno de los criterios siguientes:

- 45 - predisposición genética de sepsis,
 - edad prematura (perinatal, neonatal) o avanzada,
 - sexo masculino,
 - etnia afroamericana,
 - comorbilidades médicas, incluyendo una enfermedad crónica (como la diabetes o la insuficiencia cardíaca congestiva), disfunción orgánica preexistentes (como la cirrosis o la insuficiencia renal), discapacidades físicas o mentales,
 50 - intervenciones clínicas anteriores (como cirugía mayor, intubación endotraqueal, antibióticos), y
 - factores sociales, religiosos o culturales,
 la totalidad de los criterios anteriormente indicados se describen en mayor detalle en Marshall J.C., "Predisposition to Sepsis", Anaesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency A.P.I.C.E., Springer Verlag, ISBN 88-470-0772-0. Es generalmente conocido que dichos factores pueden considerarse preferentemente en la puesta en práctica del método de la presente invención.

60 Opcionalmente, los pacientes asintomáticos excluyen un paciente en el que se encuentra alterada la metabolización de IL-6, tal como pacientes en los que se encuentra alterada la eliminación de IL-6 a través del órgano esplénico y renal (Garibotta *et al.*, Cytokine 37:51-54, 2007).

65 En el contexto del método de la presente invención, "interleuquina-6 (IL-6)" preferentemente pretende comprender IL-6, tal como es conocido de la técnica. Preferentemente IL-6 comprende interferón-2, el factor de crecimiento del plasmacitoma, el factor estimulante de hepatocitos y el factor estimulante 2 de células B humanas (FEB2). IL-6 preferentemente es una proteína producida a partir de un único gen codificante de un producto de 212 aminoácidos, más preferentemente el péptido IL-6 de 184 aminoácidos que es cortado en el extremo N-terminal del péptido de

212 aminoácidos (ver Song M., Kellum J.A., Interleukin-6, Crit. Care Med. 33(supl. 12):463-465, 2005, y la secuencia del NCBI del precursor de IL-6 de 212 aminoácidos de longitud, número de acceso NP_000591). Preferentemente IL-6 comprende IL-6 libre que no se encuentra unido a su receptor, IL-6R. Además, IL-6 puede comprender además IL-6 en el estado del complejo IL-6/IL-6R (ver Taga T., Kishimoto T., Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines, Annu. Rev. Immunol. 15:797-819, 1997; Drucker C., Gewiese J., Malchow S., Scheller J., Rose-John So, Impact of Interleukin-6 Classic- and Trans-signaling on Liver Damage and Regeneration, J. Autimm, 2009, en prensa). Preferentemente IL-6 es la proteína IL-6 que puede encontrarse unida o se encuentra unida al anticuerpo monoclonal anti-IL-6 M-BE8 (tal como se define en la patente nº EP0430193, es decir, un anticuerpo producido por la línea celular BE-8, o en Klein B. *et al.*, Murine and anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia, Blood 78:1198-1204, 1991) o M-23C7. Preferentemente IL-6 es la IL-6 que puede encontrarse unida o que se encuentra unida al anticuerpo del ensayo de IL-6 de Roche para la utilización en los sistemas de inmunoensayo Elecsys y Cobas (Roche). El término IL-6 preferentemente comprende además una variante de la IL-6 anteriormente indicada, preferentemente de la IL-6 humana. La variante comprende una proteína o péptido sustancialmente similar a la molécula de referencia específica IL-6, preferentemente a la IL-6 humana. La expresión sustancialmente similar es bien entendida por el experto en la materia. En particular, una variante de IL-6 puede ser una isoforma o alelo que muestra por lo menos un intercambio de aminoácidos (y preferentemente hasta aproximadamente 25, más preferentemente hasta aproximadamente 15, más preferentemente hasta aproximadamente 10, más preferentemente hasta aproximadamente 5, más preferentemente hasta aproximadamente 3 intercambios de aminoácidos) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la molécula de referencia específica IL-6. Preferentemente, dicha variante de IL-6 presenta una identidad de secuencia respecto a la molécula de referencia específica IL-6 de por lo menos aproximadamente 80%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 85%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 98%, preferentemente con respecto a la IL-6 humana, todavía más preferentemente a lo largo de la longitud completa de la IL-6 humana. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante algoritmos bien conocidos de la técnica. Preferentemente, el grado de identidad debe determinarse mediante la comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la que el fragmento de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (por ejemplo huecos o extremo protuberantes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en la s que se observa el residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, mediante la división del número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y la multiplicación del resultado por 100, para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencias. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Add. APL. Math. 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineación por homologías de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444, 1988, mediante implementaciones computerizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para la comparación, preferentemente se utilizan GAP y BESTFIT para determinar su alineación óptima y, de esta manera, el grado de identidad. Preferentemente se utilizan los valores por defecto de 5,00 para el peso de hueco y de 0,30 para la longitud de peso de hueco. Las variantes a las que se ha hecho referencia anteriormente puede ser variantes alélicas o cualesquiera otros homólogos, parálogos u ortólogos específicos de especie. La variante de expresión comprende además productos de degradación, por ejemplo productos de degradación proteolítica, que todavía se reconocen mediante medios diagnósticos o mediante ligandos dirigidos contra la proteína o péptido de longitud completa respectiva. El término "variantes" también pretende cubrir las variantes de procesamiento. El término "variante" se refiere además a un péptido modificado post-traduccionalmente, tal como un péptido glucosilado. Una "variante" también es un péptido que ha sido modificado tras la recolección de la muestra, por ejemplo mediante unión covalente o no covalente de un marcaje, particularmente un marcaje radioactivo o fluorescente, al péptido. Preferentemente, la variante de IL-6 presenta esencialmente las mismas propiedades inmunológicas y/o biológicas del péptido de referencia específico, preferentemente las mismas propiedades inmunológicas y/o biológicas, que la IL-6 humana, todavía más preferentemente las mismas propiedades inmunológicas y/o biológicas que la IL-6 humana. Preferentemente la variante de IL-6 muestra por lo menos aproximadamente 70%, preferentemente por lo menos aproximadamente 80%, preferentemente por lo menos aproximadamente 90%, preferentemente por lo menos aproximadamente 95%, preferentemente por lo menos aproximadamente 98% de la actividad de la IL-6 humana. La actividad de la IL-6 preferentemente es la actividad de unión del receptor de IL-6 (ver Taga T., Kishimoto T., Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines, Annu. Rev. Immunol. 15:797-819, 1997; Drucker C., Gewiese J., Malchow S., Scheller J., Rose-John S., Impact of Interleukin-6 Classic- and Trans-signaling on Liver Damage and Regeneration, J. Autimm, 2009, en prensa). Preferentemente la variante de IL-6 muestra una actividad de unión de receptor de IL-6 humano de por lo menos aproximadamente 80%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 95% de la IL-6 humana.

Según la exposición se determina por lo menos un marcador o parámetro adicional indicativo de SRIS o sepsis que incluye por lo menos un parámetro seleccionado de entre un marcador de inflamación como CRP, otra interleuquina

tal como IL-1 y/o IL-8, procalcitonina, recuento de glóbulos blancos, temperatura corporal, tasa cardíaca, tasa respiratoria y/o diagnóstico de infección, preferentemente una infección bacteriana y/o fúngica.

5 Además, el método puede comprender etapas además de las indicadas explícitamente indicadas. Por ejemplo, las etapas adicionales puede referirse a la recolección de muestras, a pretratamientos de las muestras o a la evaluación de los resultados obtenidos mediante el método. El método puede utilizarse además para el seguimiento, la confirmación, la subclasificación y la evaluación del riesgo de desarrollar o sufrir SRIS y para el seguimiento terapéutico de las enfermedades dadas a conocer. Se da a conocer además que por lo menos un marcador o parámetro adicional puede determinarse aparte de los dos indicados en la etapa a), preferentemente con el fin de obtener información diagnóstica adicional más allá de la detección o el diagnóstico de SRIS o sepsis. Dicho parámetro adicional puede ser, por ejemplo, la tasa de filtración glomerular estimada, el nivel de NGAL o creatinina, que permiten diagnosticar adicionalmente si el paciente sufre de eliminación renal alterada.

15 El método puede llevarse a cabo manualmente y/o asistida mediante automatización. Preferentemente las etapas (a), (b) y/o (c) puede estar asistidas, totalmente o en parte, mediante automatización, por ejemplo con equipos robóticos y sensoriales adecuados para la determinación en la etapa (a) o una comparación implementada mediante ordenador en la etapa (b) y/o (c).

20 El término "muestra" se refiere a una muestra de un líquido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o de un órgano. Pueden obtenerse muestras de líquidos corporales mediante técnicas bien conocidas y entre ellas se incluyen, preferentemente, muestras de sangre, plasma, suero, líquido corporal u orina, más preferentemente muestras de sangre, plasma o suero. Las muestras de líquido corporal preferentemente se obtienen mediante venipunción, punción arterial o punción ventricular. Las muestras de tejidos o de órganos pueden obtenerse de cualquier tejido u órgano, por ejemplo mediante biopsia. Las células separadas pueden obtenerse a partir de líquidos corporales o los tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como la centrifugación o la separación celular. Preferentemente las muestras de células, tejidos u órganos se obtiene de aquellas células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos a los que se hace referencia en la presente memoria.

30 Los métodos pueden comprender una etapa de recolección de una muestra, que opcionalmente puede ser una etapa invasiva. La muestra puede recogerse mediante una etapa invasiva, preferentemente una etapa invasiva mínima, tal como mediante venipunción. La recolección mínimamente invasiva también comprende el caso en que se recoge la muestra mediante la utilización de una aguja (lanceta) que al ser aplicada en la piel, preferentemente la piel de un dedo, induce un flujo de salida de un volumen reducido de sangre que seguidamente puede ser recogido para determinar la cantidad de los marcadores en la muestra. La muestra preferentemente se recoge invasivamente o de manera mínimamente invasiva mediante un procedimiento rutinario seguro, preferentemente por personas que no requieren una elevada capacitación médica ya la recolección de las muestras preferentemente no supone ningún riesgo sanitario significativo para la persona sometida a la recolección de muestras.

40 Preferentemente el método de la presente invención es un método *ex vivo* o *in vitro*.

45 Las muestras en la etapa a) del método de la presente invención se aíslan a intervalos periódicos durante un periodo de entre 3 y 10 días, siendo dichos intervalos de entre 15 minutos +/- 20% y 12 horas +/- 20%, preferentemente de entre aproximadamente 15 minutos y 6 horas, preferentemente de entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 3 horas, preferentemente de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 12 horas, preferentemente de entre aproximadamente 1 hora y 6 horas, preferentemente de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 3 horas. Más preferentemente, el intervalo corto es un intervalo de aproximadamente 15 minutos, preferentemente de aproximadamente 30 minutos, preferentemente de aproximadamente 1 hora, preferentemente de aproximadamente 2 horas, preferentemente de aproximadamente 3 horas, preferentemente de aproximadamente 4 horas, preferentemente de aproximadamente 5 horas, preferentemente de aproximadamente 6 horas.

50 Preferentemente, las muestras se aíslan del paciente durante un periodo de hasta aproximadamente 10 días, preferentemente durante un periodo de hasta aproximadamente 7 días, preferentemente durante un periodo de hasta aproximadamente 5 días, preferentemente durante un periodo de hasta aproximadamente 3 días. Según el estado y el desarrollo de la condición del paciente, el aislamiento de las muestras y la detección de IL-6 pueden prolongarse adicionalmente, por ejemplo en el caso d que el paciente desarrolle SRIS o sepsis, el muestreo puede extenderse hasta completar con éxito la terapia del SRIS o la sepsis o incluso unos cuantos días después de este punto temporal. Preferentemente las muestras se extraen por lo menos aproximadamente una vez, preferentemente por lo menos aproximadamente dos veces antes de llevar a cabo un tratamiento y por lo menos una vez, preferentemente por lo menos aproximadamente dos veces después del tratamiento. El tratamiento es un tratamiento invasivo tal como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, antes de llevar a cabo el tratamiento, se obtienen uno o dos niveles de IL-6. Tras el tratamiento, se extraen varias muestras a intervalos periódicos, de por ejemplo 3 a 6 horas durante un periodo de, por ejemplo, 3 a 10 días, en los que se determina IL-6 y preferentemente también el estado clínico del paciente.

65 La expresión "detectar y diagnosticar SRIS" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a valorar, identificar, evaluar o clasificar si un paciente asintomático sufre de SRIS, preferentemente de sepsis.

La expresión "detectar y diagnosticar un riesgo de desarrollar o sufrir SRIS" pretende comprender la predicción del riesgo en un paciente humano asintomático de desarrollar SRIS, incluyendo sepsis, dentro de una ventana temporal definida (ventana de predicción) en el futuro. La ventana de predicción es un intervalo en el que el sujeto desarrollará SRIS u opcionalmente morirá según la probabilidad predicha. Sin embargo, preferentemente la ventana de predicción es un intervalo de hasta aproximadamente 20 días, preferentemente de hasta aproximadamente 10 días, preferentemente de hasta aproximadamente 7 días, preferentemente de hasta aproximadamente 5 días, preferentemente de hasta aproximadamente 4 días, preferentemente de hasta aproximadamente 3 días, preferentemente de hasta aproximadamente 2 días, (i) después de la aplicación del método de la presente invención, o (ii) después de la obtención de la primera muestra en la que el nivel de IL-6 detectado era superior al nivel de referencia, o (iii) después del ingreso del paciente, o (iv) después de la obtención/aislamiento del primer nivel de línea base de IL-6, o (v) después de que el tratamiento, por ejemplo el tratamiento invasivo, se haya iniciado o terminado, o (vi) después del aislamiento de la primera muestra post-tratamiento para la determinación del nivel de IL-6.

Preferentemente, el paciente identificado como en riesgo de desarrollar SRIS presenta una probabilidad elevada de desarrollar SRIS. Preferentemente, la probabilidad elevada es de por lo menos aproximadamente 30%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 40%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 50%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 60%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 70%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 80%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%. Opcionalmente, una probabilidad elevada de desarrollar SRIS o sepsis comprende una probabilidad de 100%, es decir, el paciente desarrollará o sufre actualmente de SRIS o sepsis.

Alternativamente, el paciente presenta una probabilidad baja de desarrollar SRIS o sepsis. Preferentemente la probabilidad baja es de hasta aproximadamente 30% o de menos de aproximadamente 30%, preferentemente de hasta aproximadamente 20%, preferentemente de hasta aproximadamente 10%, preferentemente de hasta aproximadamente 5%. Opcionalmente, una probabilidad baja de desarrollar SRIS o sepsis comprende una probabilidad de 0%, es decir, el paciente no desarrollará SRIS o sepsis. Los métodos para la determinación del % de riesgo de sufrir o desarrollar SRIS o sepsis son generalmente conocidos. Preferentemente la predicción del % de riesgo se lleva a cabo dentro de la ventana de predicción indicada anteriormente.

Preferentemente, la magnitud del riesgo de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis se correlaciona con la medida en que el nivel de IL-6 detectado es superior al nivel de referencia. El riesgo de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis preferentemente es bajo en el caso de que el nivel de IL-6 detectado sea inferior al nivel de referencia. Preferentemente el riesgo de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis es elevado en el caso de que el nivel de IL-6 detectado sea igual o superior al valor de referencia.

Tal como entenderá el experto en la materia, dicha evaluación habitualmente no pretende ser correcta para el 100% de los sujetos que deben analizarse. Sin embargo, se requiere que la evaluación resulte válida para una porción estadísticamente significativa de los sujetos que deben analizarse. El experto en la materia podrá determinar si una porción es estadísticamente significativa sin ningún otro procedimiento utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes son de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98% o de por lo menos 99%. Los valores de p son preferentemente 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferentemente la probabilidad contemplada por el método de la presente invención permite que la predicción sea correcta para preferentemente por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de los sujetos de una cohorte dada.

La determinación del nivel de IL-6 o de una variante de la misma se refiere a la medición de la cantidad o la concentración, preferentemente de manera semicuantitativa o cuantitativa. La medición puede llevarse a cabo directa o indirectamente. La medición directa se refiere a la medición de la cantidad o concentración del péptido o polipéptido basada en una señal que se obtiene del péptido o polipéptido mismo y la intensidad del cual se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presente en la muestra. Dicha señal, en ocasiones denominada en la presente memoria señal de intensidad, puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta incluye la medición de una señal obtenida de un componente secundario (es decir un componente que no es el péptido o polipéptido mismo) o un sistema de lectura biológico, por ejemplo respuestas celulares, ligandos, marcajes o productos de reacción enzimática medibles.

Según el método e la presente invención, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido de IL-6 puede llevarse a cabo mediante todos los medios conocidos de determinación de la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos de inmunoensayo y métodos que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo de tipo sándwich, competitivos u otros formatos. Dichos ensayos desarrollan una señal que es indicativa de la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la fuerza de la

señal puede, preferentemente, correlacionarse directa o indirectamente (por ejemplo puede ser inversamente proporcional) a la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Algunos métodos adecuados adicionales comprenden medir una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido, tal como su masa molecular exacta o el espectro de RMN. Dichos métodos comprenden, preferentemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos de cromatografía. Además, entre los métodos se incluyen métodos basados en ELISA de microplacas, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (disponibles, por ejemplo, en los analizadores ElecsysTM de Roche), EUC (un ensayo enzimático de unión al cobalto, disponible, por ejemplo, en analizadores Roche-HitachiTM) y ensayos de aglutinación con látex (disponibles, por ejemplo, en analizadores Roche-HitachiTM), inmunoensayos homogéneos y heterogéneos, e inmunoensayos competitivos y no competitivos.

Preferentemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido de IL-6 comprende las etapas de: (a) poner en contacto una célula capaz de inducir una respuesta celular la intensidad de la cual es indicativa de la cantidad del péptido o polipéptido, con dicho péptido o polipéptido durante un periodo de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular. Para medir las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada preferentemente se añade a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión medible de un gen informador o la secreción de una sustancia, por ejemplo un péptido, polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia generará una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad del péptido o polipéptido.

También preferentemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido de IL-6 comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica obtenible del péptido o polipéptido en la muestra, preferentemente en una muestra seleccionada de entre sangre, suero, plasma o líquido corporal. Tal como se ha indicado anteriormente, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada a una m/z variable específica para el péptido o polipéptido observado en los espectros de masas o en un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido de IL-6 puede comprender, preferentemente, las etapas de: (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) (opcionalmente) eliminar el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una señal de intensidad. La unión incluye tanto la unión covalente como la no covalente.

Un ligando según la presente exposición puede ser cualquier compuesto, por ejemplo un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña, que se une al péptido o polipéptido indicado en la presente memoria. Entre los ligandos preferentes se incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos, tales como receptores o parejas de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos que comprenden los dominios de unión para los péptidos IL-6, y aptámeros, por ejemplo aptámeros de ácidos nucleicos o péptidos. Los métodos para preparar dichos ligandos son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también es ofrecida por proveedores comerciales. Al experto en la materia le resultarán familiares los métodos para desarrollar derivados de dichos ligandos de afinidad o especificidad más alta. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. A continuación, estos derivados pueden someterse a ensayo para la unión según procedimientos de cribado conocidos de la técnica, por ejemplo la expresión fágica.

Los medios para la detección de IL-6 son generalmente conocidos de la técnica y entre ellos preferentemente se incluyen los anticuerpos anti-IL-6, incluyendo los anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos tales como los fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unirse al antígeno o hapteno de IL-6. Los medios para la detección de IL-6 incluyen además anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos híbridos humanizados quiméricos, en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que muestra una especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. También se encuentra incluido un anticuerpo anti-IL-6 de una especie de mamífero, preferentemente un anticuerpo seleccionado de entre el ser humano, la rata, el ratón, la cabra, la oveja, la vaca y el camello. Preferentemente el anticuerpo anti-IL-6 es el anticuerpo anti-IL-6 M-BE8 o M-23C7 reconocido por el anticuerpo M-BE8 y/o M-23C7. Las secuencias donantes habitualmente incluyen por lo menos los residuos aminoácidos de unión a antígeno del donante, aunque pueden comprender también otros residuos aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos pueden prepararse mediante varios métodos bien conocidos de la técnica. Preferentemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido de IL-6. La expresión unión específica se refiere a que el ligando o agente debe unirse sustancialmente ("reaccionar cruzadamente") a otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra que debe analizarse. Preferentemente, el péptido o polipéptido de IL-6 unido específicamente debe unirse con una afinidad por lo menos 3 veces más alta, más preferentemente por lo menos 10 veces más alta y todavía más preferentemente por lo menos 50 veces más alta que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable en el caso de que todavía pueda distinguirse y medirse inequívocamente, por ejemplo según su tamaño en una transferencia western, o según su abundancia relativamente más alta en la muestra. La unión del ligando puede medirse mediante cualquier método conocido de la técnica. Preferentemente dicho método es semicuantitativo o cuantitativo. Se describen los métodos adecuados a continuación.

En primer lugar, la unión de un ligando puede medirse directamente, por ejemplo mediante RMN o resonancia del plasmón superficial.

5 En segundo lugar, en el caso de que el ligando sirva también como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, puede medirse un producto de reacción enzimática (por ejemplo puede medirse la cantidad de proteasa mediante la medición de la cantidad de sustrato cortado, por ejemplo en una transferencia western). Alternativamente, el ligando puede mostrar propiedades enzimáticas él mismo y el complejo "ligando/péptido o polipéptido" o el ligando unido al péptido o polipéptido, respectivamente, puede ponerse en contacto con un sustrato adecuado, permitiendo la detección mediante la generación de una señal de intensidad. Para la medición de los
10 productos de reacción enzimática, preferentemente la cantidad de sustrato es saturante. El sustrato también puede marcarse con un marcaje detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para la producción de una cantidad de producto detectable, preferentemente medible. En lugar de medir la cantidad de producto, puede medirse el tiempo necesario para la aparición de una cantidad dada (por ejemplo detectable) de
15 producto.

En tercer lugar, el ligando puede acoplarse covalente o no covalentemente a un marcaje que permita la detección y medición del ligando. El marcaje puede llevarse a cabo mediante métodos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcaje directamente (covalente o no covalentemente) con el ligando. El marcaje indirecto implica la unión (covalente o no covalente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario debe unirse específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario puede acoplarse con un marcaje adecuado y/o ser la diana (receptor) de la unión de un ligando terciario al ligando secundario. Es frecuente la utilización de ligandos secundario, terciario o incluso de orden superior para incrementar la señal. Entre los
20 ligandos secundarios y de orden superior adecuados pueden incluirse anticuerpos, anticuerpos secundarios y el bien conocido sistema de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también puede "etiquetarse" con una o más etiquetas tal como es conocido de la técnica. Dichas etiquetas seguidamente pueden ser dianas para ligandos de orden superior. Entre las etiquetas adecuadas se incluyen biotina, digoxigenina, etiqueta de His, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, etiqueta myc, hemaglutinina (HA) del virus de la influenza A, proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, la etiqueta preferentemente se encuentra en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Son marcajes adecuados cualesquiera marcajes detectables mediante un método de detección apropiado. Entre los marcajes típicos se incluyen las partículas de oro, las perlas de látex, éster de acridán, luminol, rutenio, marcajes enzimáticamente activos, marcajes radioactivos, marcajes magnéticos (por ejemplo "perlas magnéticas", incluyendo marcajes paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcajes
30 fluorescentes. Entre los marcajes enzimáticamente activos se incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de los mismos. Entre los sustratos adecuados para la detección se incluyen diaminobencidina (DAB), 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitroazul-tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, disponibles como solución madre lista para utilizar de Roche Diagnostics), CDP-StarTM (Amersham Biosciences), ECFTM (Amersham Biosciences). Una combinación de enzima-sustrato adecuada puede resultar en un producto de reacción de color, fluorescencia o quimioluminiscencia, que pueden medirse según métodos conocidos de la técnica (por ejemplo utilizando una película fotosensible o un sistema de cámaras adecuado). Respecto a la medición de la reacción enzimática, los criterios proporcionados anteriormente se aplican de manera análoga. Entre los marcajes fluorescentes típicos se incluyen las proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, rojo Texas, fluoresceína y los pigmentos Alexa (por ejemplo Alexa 568). Los marcajes fluorescentes adicionales se encuentran disponibles de, por ejemplo, Molecular Probes (Oregon). También se encuentran contemplada la utilización de puntos cuánticos a modo de marcaje fluorescente. Entre los marcajes radioactivos típicos se incluyen ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P y similares. El marcaje radioactivo puede detectarse mediante cualquier método conocido y apropiado, por ejemplo una película fotosensible o en un aparato Phosphor Imager. Entre los métodos de medición adecuados también se incluyen la precipitación (particularmente la inmunoprecipitación), la electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia electrogenerada), el RIA (radioinmunoensayo), el ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), los ensayos inmunoenzimáticos de tipo sándwich, los inmunoensayos de tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECL1A), el fluoroinmunoensayo de lantánidos potenciado por disociación (DELFI), el ensayo de proximidad por centelleo (EPC), la turbidimetría, la nefelometría, la turbidimetría o nefelometría potenciada por látex o los inmunoensayos en fase sólida. Pueden utilizarse métodos adicionales conocidos de la técnica (tales como la electroforesis en gel, la electroforesis en gel
45 2D, al electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), la transferencia western y la espectrometría de masas) solas o en combinación con marcaje u otros métodos de detección tales como los indicados anteriormente.

Más preferentemente, la cantidad de IL-6 se determina mediante un método de espectrometría de masas, preferentemente mediante el método de micro-HPLC-espectrometría de masas en tándem con dilución isotópica, preferentemente mediante un método descrito en los Ejemplos y en Kobold U. *et al.* (Clin. Chem. 54:1584-6, 2008).
60

La cantidad de un péptido o polipéptido IL-6 puede, también preferentemente, determinarse de la manera siguiente: (a) poniendo en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el péptido o polipéptido tal como se ha indicado anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido, y (b) midiendo la cantidad de péptido o polipéptido que se encuentra unida al soporte. El ligando, preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, preferentemente se encuentra
65

presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para fabricar soportes sólidos son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, entre otros, materiales de columna disponibles comercialmente, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, Duracytes, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede unirse a muchos portadores diferentes. Entre los ejemplos de portadores bien conocidos se incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nilón, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble. Los métodos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando son bien conocidos y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, interacciones iónicas, hidrofóbicas y covalentes, y similares. También se encuentra contemplada la utilización de "matrices en suspensión" a modo de matrices (Nolan, Trends Biotechnol. 20(1):9-12, 2002). En dichas matrices en suspensión el portador se encuentra presente en suspensión por ejemplo una microperla o microesfera. La matriz consiste de diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que portan diferentes ligandos. Los métodos para producir dichas matrices, por ejemplo basadas en química de fase sólida y grupos protectores fotolábiles, son generalmente conocidos (patente US nº .5744.305).

El término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria comprende un intervalo de +/- 20% respecto al valor, cantidad, concentración, nivel, etc. concreto, por ejemplo la indicación de un valor de "aproximadamente 100" pretende incluir un valor comprendido en el intervalo numérico de 100 +/- 20%, es decir, un intervalo de valores de entre 80 y 120. Preferentemente, el término "aproximadamente" incluye un intervalo de +/- 10% respecto al valor, cantidad, concentración, nivel, etc. concreto, más preferentemente un intervalo de +/- 5% respecto al valor, cantidad, concentración, nivel, etc. concreto.

El término "comparar" tal como se utiliza en la presente memoria comprende comparar el nivel del péptido o polipéptido de IL-6 comprendido en la muestra que debe analizarse con un nivel de una fuente de referencia adecuada especificada en otros sitios de la presente descripción. Debe entenderse que comparar tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una comparación entre los parámetros o valores correspondientes, por ejemplo se compara una cantidad absoluta con un nivel de referencia absoluto, mientras que una concentración se compara con una concentración o una señal de intensidad de referencia obtenida de una muestra de ensayo con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación a la que se hace referencia en la etapa (b) del método de la presente invención puede llevarse a cabo manualmente o asistida por ordenador. Para una comparación asistida por ordenador, el valor del nivel determinado puede compararse con valores correspondientes a referencias adecuadas que son almacenadas en una base de datos por un programa informático. El programa informático puede evaluar adicionalmente el resultado de la comparación, es decir, proporcionar automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Basándose en la comparación del nivel determinado en la etapa a) y el nivel de referencia, se determina el diagnóstico de SRIS en un paciente. Por lo tanto, el nivel de referencia debe seleccionarse de manera que una diferencia o una similitud en los niveles comparados permite la asignación de los sujetos a SRIS o a que no sufren SRIS.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la expresión "nivel de referencia" se refiere a una cantidad, concentración o valor que define un valor de corte. Una cantidad, concentración o valor del parámetro superior al valor de corte resulta en un diagnóstico diferente en la comparación con pacientes que muestran una cantidad, nivel o valor determinado del parámetro que es inferior al valor de corte. De esta manera, mediante la comparación de la cantidad, concentración o valor determinados en la práctica del parámetro IL-6, con los valores de corte respectivos resulta posible diagnosticar o detectar el riesgo en pacientes que desarrollan o sufren SRIS o sepsis.

Evidentemente el nivel de referencia aplicable para un sujeto individual puede variar dependiendo de diversos parámetros fisiológicos, tales como la edad, el género, la subpoblación, la ingesta de alcohol, infecciones recientes, así como de los medios utilizados para la determinación del polipéptido o péptido a que se hace referencia en la presente memoria. Puede determinarse un nivel de referencia adecuado mediante el método de la presente exposición a partir de una muestra de referencia que debe analizarse conjuntamente, es decir, de manera simultánea o sucesiva, con la muestra de ensayo. Se confirmaron los niveles de referencia en los Ejemplos.

Tal como entenderá el experto en la materia, dicha evaluación diagnóstica habitualmente no pretende ser correcta para todos (es decir, el 100%) de los pacientes que deben identificarse. Sin embargo, el término requiera que pueda identificarse una porción estadísticamente significativa de pacientes (por ejemplo una cohorte en un estudio de cohortes). El experto en la materia podrá determinar si una porción es estadísticamente significativa sin ningún otro procedimiento mediante la utilización de diversas herramientas bien conocidas de evaluación estadística, por ejemplo la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Pueden encontrarse los detalles en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983. Los intervalos de confianza preferente son por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99%. Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más preferentemente, mediante el método de la presente invención pueden identificarse correctamente por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de los pacientes de una población.

En general, para determinar los niveles respectivos que permitan establecer el diagnóstico deseado ("umbral", "nivel de referencia"), se determina la cantidad o cantidades/nivel o niveles o las proporciones de cantidad del péptido o péptidos respectivos en grupos de pacientes apropiados. Tal como se ha indicado anteriormente, el valor de referencia preferentemente se determina multiplicando un nivel de IL-6 determinado anteriormente (por ejemplo un nivel de IL-6 de línea base) en un paciente dado, preferentemente en el paciente sujeto de ensayo, por un factor definido en otro sitio de la presente memoria (un factor de por lo menos aproximadamente 50 o de por lo menos aproximadamente 100, o de por lo menos aproximadamente 500 o de por lo menos aproximadamente 1.000). Por ejemplo, basándose en estudios clínicos retrospectivos, tal como el descrito en los Ejemplos, en el que el resultado (no SRIS vs. SRIS vs. sepsis) se analiza y se compara con los cambios del nivel de IL-6 en los pacientes durante el tiempo, resulta fácilmente posible verificar estadísticamente qué "factores" deben multiplicarse por el nivel de IL-6 de línea base del paciente sujeto de ensayo con el fin de establecer un valor de referencia que se asocia a una probabilidad de riesgo específica de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis.

El nivel de referencia se calcula multiplicando el nivel de línea base de IL-6 por un factor de por lo menos aproximadamente 50, preferentemente por un factor de por lo menos aproximadamente 100, más preferentemente por un factor de por lo menos aproximadamente 500, todavía más preferentemente por un factor de por lo menos aproximadamente 1.000. Por ejemplo, en el caso del paciente asintomático que acude al médico o al hospital con un nivel de línea base de IL-6 de 10 pg/ml, el nivel de referencia calculado preferentemente es de 500 pg/ml (incremento de 50 veces), preferentemente de 1 ng/ml (incremento de 100 veces), preferentemente de 5 ng/ml (incremento de 500 veces) o preferentemente de 10 ng (incremento de 1.000 veces). En dicho paciente, un nivel de IL-6 detectado tras someter el paciente a un tratamiento (por ejemplo invasivo) (por ejemplo una cirugía severa) superior a los niveles de referencia indicados indica que el paciente presenta un riesgo elevado de desarrollar o sufrir SRIS.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "nivel de línea base" comprende por lo menos un nivel de IL-6 obtenido antes, durante o en las seis horas posteriores a dicho tratamiento invasivo.

El diagnóstico y la detección del riesgo de desarrollar SRIS o sepsis puede llevarse a cabo determinando los parámetros respectivos, preferentemente mediante la medición del nivel de IL-6, utilizando métodos analíticos validados. Los resultados que se obtienen se recogen y se analizan mediante métodos estadísticos conocidos por el experto en la materia.

Según la exposición, los valores de referencia se establecen según la probabilidad deseada de sufrir o presentar el riesgo de sufrir o desarrollar la enfermedad. Por ejemplo, puede resultar útil seleccionar la mediana del factor que multiplicará el nivel de línea base de entre los percentiles 60, 70, 80, 90, 95 e incluso 99 del colectivo de pacientes sanos y/o no sanos, para establecer el nivel o niveles de referencia.

Según la exposición, el nivel de referencia que sirve como umbral puede derivarse del límite superior normal (LSN), es decir, el límite superior del nivel fisiológico observado en una población. El LSN para una población de sujetos dada puede determinarse mediante diversas técnicas bien conocidas. Una técnica adecuada puede ser la determinación de la mediana de la población para la cantidad del péptido o polipéptido que se determinará en el método de la presente invención.

Puede establecerse y confirmarse un nivel de referencia de un marcador diagnóstico y el nivel del marcador en una muestra de pacientes simplemente compararse con el nivel de referencia. La sensibilidad y la especificidad de un ensayo diagnóstico y/o pronóstico depende de más de únicamente la "calidad" analítica del ensayo. También depende de la definición de lo que constituye un resultado anormal. En la práctica, las curvas características de receptor-operador, o curvas "ROC", se calculan típicamente dibujando en un gráfico el valor de una variable frente a su frecuencia relativa en poblaciones "normales" y "enfermas". Para cualquier parámetro particular es probable que se solape la distribución de niveles de marcador para los sujetos con y sin enfermedad. Bajo estas condiciones, un ensayo no distingue de manera absoluta entre normalidad y enfermedad con una exactitud del 100% y el área de solapamiento indica en donde el ensayo no puede distinguir normalidad de enfermedad, o riesgo elevado de riesgo bajo de sufrir o desarrollar la enfermedad. Se selecciona un umbral (valor de corte, nivel de referencia) por encima del cual (o debajo del cual, dependiendo de cómo cambia un marcador con la enfermedad) se considera que el ensayo es anormal y por debajo del cual se considera que el ensayo es normal. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permita la identificación o predicción correcta del riesgo de aparición o desarrollo de una condición. Las curvas ROC pueden utilizarse incluso cuando los resultados de ensayo no proporcionan necesariamente un número exacto. Con la condición de que puedan asignarse rangos a los resultados, puede crearse una curva ROC. Por ejemplo, los resultados de un ensayo con muestras "de enfermedad" pueden ordenarse con rangos según el grado de la enfermedad (por ejemplo 1=bajo, 2=normal y 3=alto) o la probabilidad de sufrir o desarrollar la enfermedad (por ejemplo 1=bajo, 2=normal y 3=alto). Esta ordenación con rangos puede correlacionarse con resultados obtenidos en la población "normal" y crearse una curva ROC. Estos métodos son bien conocidos de la técnica. Ver, por ejemplo, Hanley *et al.*, *Radiology* 143:29-36, 1982.

Según la exposición, los marcadores y/o paneles de marcadores se seleccionan para mostrar una sensibilidad de por lo menos aproximadamente 70%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 80%, todavía más

preferentemente de por lo menos aproximadamente 85%, todavía más preferentemente de por lo menos 90%, y todavía más preferentemente de por lo menos 95%, en combinación con una especificidad de por lo menos aproximadamente 70%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 80%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 85%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90% y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%. Tanto la sensibilidad como la especificidad pueden ser de por lo menos aproximadamente 75%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 80%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 85%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90% y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%.

Según la exposición, se utiliza una proporción de probabilidades positiva, una proporción de probabilidad negativa o cociente de probabilidad como medida de la capacidad de un ensayo de predecir el riesgo o diagnosticar una enfermedad. En el caso de una proporción de probabilidades positiva, un valor de 1 indica que es igualmente probable un resultado positivo entre sujetos en los grupos tanto "enfermo" como "de control"; un valor superior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo enfermo, y un valor inferior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de control. En el caso de una proporción de probabilidades negativa, un valor de 1 indica que un resultado negativo es igualmente probable en sujetos en los grupos "enfermo" y "de control"; un valor superior a 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de ensayo, y un valor inferior a 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de control. Según la exposición, los marcadores y/o paneles de marcadores se seleccionan preferentemente para mostrar una proporción de probabilidades positiva o negativa de por lo menos aproximadamente 1,5 o superior, o de aproximadamente 0,67 o inferior, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 2 o superior, o de aproximadamente 0,5 o inferior, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 5 o superior, o de aproximadamente 0,2 o inferior, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 10 o superior o de aproximadamente 0,1 o inferior, y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 20 o superior o de aproximadamente 0,05 o inferior. El término "aproximadamente" en el presente contexto se refiere a +/- 5% de una medición dada.

En el caso de un cociente de probabilidades, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable en sujetos en el grupo tanto "enfermo" como el grupo "de control"; un valor superior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo enfermo; y un valor inferior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de control. Según la exposición, los marcadores y/o paneles de marcadores preferentemente se seleccionan para mostrar un cociente de probabilidades de por lo menos aproximadamente 2 o superior, o de aproximadamente 0,5 o inferior, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 3 o superior, o de aproximadamente 0,33 o inferior, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 4 o superior, o de aproximadamente 0,25 o inferior, todavía más preferentemente de por lo menos de por lo menos aproximadamente 5 o superior, o de aproximadamente 0,2 o inferior, y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 10 o superior o de aproximadamente 0,1 o inferior. El término "aproximadamente" en el presente contexto se refiere a +/-5% de una medición dada.

Los paneles pueden comprender por lo menos un marcador adicional, ambos marcadores específicos de una enfermedad (por ejemplo marcadores que se encuentran incrementados o reducidos en la infección bacteriana pero no en otros estados de enfermedad) y/o marcadores no específicos (por ejemplo marcadores que se encuentran incrementados o reducidos debido a inflamación, con independencia de la causa; marcadores que se encuentran incrementados o reducidos debido a cambios en hemostasis, con independencia de la causa, etc.). Aunque determinados marcadores pueden no ser individualmente definitivos en los métodos descritos en la presente memoria, un patrón "de huella digital" particular de los cambios puede, de hecho, actuar como un indicador específico de estado de enfermedad. Tal como se ha comentado anteriormente, el patrón de cambios puede obtenerse de una sola muestra o puede considerar opcionalmente cambios temporales en uno o más elementos del panel (o cambios temporales en un valor de respuesta del panel).

Un nivel de IL-6 o una variante del mismo determinado en la etapa a) superior al nivel de referencia es indicativo de que el paciente humano presenta un riesgo elevado de desarrollar SRIS.

Se ha observado que la concentración de IL-6 difiere significativamente entre pacientes asintomáticos. Por ejemplo, los factores siguientes contribuyen a estas diferencias entre individuos: consumo reciente de alcohol, ejercicio físico, estrés, historia reciente de infecciones, lesiones y en la hiperglucemia aguda. De acuerdo con lo anterior, se determina el nivel de referencia de IL-6 individualmente para cada paciente.

Preferentemente, se realiza un seguimiento estrecho de los pacientes con niveles de IL-6 superiores al nivel de referencia para la aparición de signos y síntomas clínicos de SRIS o sepsis. Más preferentemente, los pacientes se someten a seguimiento de los parámetros siguientes: niveles de IL-6, recuento de glóbulos blancos (RGB) y determinación de las formas leucocitarias inmaduras, temperatura corporal, tasa cardíaca, tasa respiratoria, recolección de especímenes microbiológicos de drenajes, suero, secreciones traqueobronquiales y orina, y roentgenograma torácico diario. Se justifican las endoscopias de control y tratamiento radiológico mediante ultrasonidos y escaneo de TC.

Más preferentemente, los pacientes se tratan de la manera siguiente: inicio de tratamiento antibiótico de amplio espectro, tratamiento antifúngico. En el caso de duda, se programará libremente cirugía de revisión.

5 Se da a conocer además un método de seguimiento en pacientes asintomáticos del riesgo de desarrollar o sufrir SRIS o sepsis, que comprende las etapas de:

- a) determinar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma en una muestra del paciente,
- b) comparar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma determinada en la etapa a) con un nivel de referencia,
- y
- c) recomendar, decidir, iniciar, continuar, modular o interrumpir la terapia de SRIS o sepsis para el paciente basándose en la comparación de la etapa c).

15 Entre las consecuencias diagnósticas y terapéuticas del seguimiento anteriormente indicado se incluyen: especímenes microbiológicos de suero, drenajes, secreciones traqueobronquiales y orina, controles endoscópicos, procedimientos de obtención de imágenes radiológicas tales como escaneos de ultrasonidos, roentgenogramas torácicos y escaneos de TC, inicio de tratamiento antibiótico de amplio espectro o cambio del tratamiento antibiótico preexistente a uno más eficiente, y tratamiento antifúngico. En caso de duda, se programará libremente cirugía de revisión.

20 En el caso de que el nivel de IL-6 o de una variante de la misma sea superior al nivel de referencia, la muestra o una muestra recogida adicionalmente se somete a un ensayo para identificar el organismo infeccioso, por ejemplo la bacteria, hongo, etc. contenido en la muestra. Dichos ensayos son generalmente conocidos en el campo y son relevantes al diagnóstico de sepsis.

25 Se da a conocer además un método para predecir el riesgo de mortalidad en un paciente asintomático, que comprende las etapas de:

- a) determinar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma en una muestra del paciente,
- b) comparar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma determinada en la etapa a) con un nivel de referencia,
- c) predecir el riesgo de mortalidad del paciente basándose en la comparación en la etapa b).

30 A menos que se indique específicamente de otro modo, las definiciones y realizaciones preferentes indicadas con respecto al método de detección o diagnóstico del riesgo de sufrir o desarrollar SRIS, anteriormente, se aplican también, mutatis mutandis, al presente aspecto de la exposición.

35 Según todavía otro aspecto de la exposición se proporciona un dispositivo adaptado para la detección o diagnóstico del riesgo de sufrir o desarrollar SRIS, preferentemente según un método indicado anteriormente, que comprende:

- a) una primera unidad de análisis que comprende unos medios de detección de IL-6 o de una variante de la misma, en el que la unidad de análisis está adaptada para determinar el nivel de IL-6 detectado por los medios de detección,
- b) una unidad de evaluación que comprende un ordenador que comprende tangiblemente integrado un código de programa informático para llevar a cabo la comparación de la cantidad determinada que se ha obtenido de la primera unidad de análisis con una base de datos adecuada que comprende un nivel de referencia correspondiente tal como se ha indicado anteriormente; preferentemente la primera unidad de análisis y preferentemente también las unidades de evaluación se encuentran operativamente unidas entre sí.

45 Preferentemente, el dispositivo comprende además medios para la salida del diagnóstico requerido y el tratamiento y/o prevención basado en el diagnóstico o predicción de riesgo de que el paciente sufra o desarrolle SRIS o sepsis. Más preferentemente, el dispositivo comprende además medios para la salida del progreso y/o respuesta a un tratamiento y/o terapia del SRIS o sepsis.

50 Según todavía otro aspecto de la exposición se proporciona un kit adaptado para llevar a cabo el método indicado anteriormente, que comprende:

- medios para determinar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma,
- medios para comparar el nivel determinado de IL-6 o de una variante de la misma con un nivel de referencia,
- instrucciones para llevar a cabo el método.

55 El término "kit" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una colección de los compuestos, medios o reactivos anteriormente indicados de la presente exposición que pueden o no empaquetarse juntos. Los componentes del kit pueden encontrarse comprendidos en viales separados (es decir, como kit de partes separadas) o proporcionarse en un único vial. Además, debe entenderse que el kit de la presente exposición está destinado a la
60 utilización para la puesta en práctica de los métodos los que se ha hecho referencia anteriormente en la presente memoria. Preferentemente se encuentra contemplado que todos los componentes se proporcionan de manera lista para utilizar para la puesta en práctica de los métodos a los que se ha hecho referencia anteriormente. Además, el kit preferentemente contiene instrucciones para llevar a cabo dichos métodos. Las instrucciones pueden proporcionarse mediante un manual de usuario en forma de papel o electrónica. Por ejemplo, el manual puede
65 comprender instrucciones para interpretar los resultados obtenidos al poner en práctica los métodos anteriormente indicados utilizando el kit de la presente exposición.

Según todavía otro aspecto de la exposición se proporciona un programa informático que comprende código de programa informático que resulta adecuado para llevar a cabo un método tal como se da a conocer en la presente memoria al ejecutar el programa informático en un ordenador.

5 En otro aspecto de la exposición se proporciona un medio legible por ordenador con un programa informático de la exposición almacenado en el mismo.

10 En otro aspecto de la exposición se proporciona un producto programa informático con un programa informático de la exposición almacenado en el mismo. Preferentemente, el programa informático comprende además medios para la salida de la prevención y/o terapia requerida basada en la enfermedad diagnosticada, almacenando los medios en un medio legible por ordenador.

15 A menos que se especifique de otra manera, las definiciones y realizaciones preferentes descritas con respecto al método de detección o diagnóstico de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) o para la detección o diagnóstico de un riesgo de sufrir o desarrollar SRIS, anteriormente, también se aplican al presente aspecto de la exposición.

20 En otro aspecto de la exposición se proporciona un kit adaptado para llevar a cabo el método tal como se da a conocer en la presente memoria, que comprende:

- i) medios para determinar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma,
- ii) medios para comparar el nivel determinado de IL-6 o de una variante de la misma con niveles de referencia, y opcionalmente:
- iii) instrucciones para llevar a cabo el método.

25

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Cinética de IL-6 (pg/ml) en pacientes asintomáticos pre- y post-cirugía. Los niveles de IL-6 se dibujan para la línea base (precirugía), línea base 2 (durante cirugía) y postcirugía (días 1, 2, 3 y 4; las muestras se obtuvieron a intervalos de 6 h). La figura muestra una comparación entre los pacientes agrupados que desarrollaron SRIS/sepsis y aquellos que no la desarrollaron. Se indican la mediana y los percentiles.

30

Figura 2 Concentración de IL-6 (pg/ml) dibujada respecto al tiempo para los pacientes nº 1 a nº 7. El triángulo indica el punto temporal en que se diagnosticaron signos clínicos de SRIS.

35

Figura 3 Características de los pacientes no de SRIS. Se dibujó la concentración de IL-6 (pg/ml) respecto al tiempo para los pacientes no de SRIS.

Figura 4 Cinética de CRP (mg/l) en pacientes asintomáticos pre- y post-cirugía. Se muestran los niveles de CRP para la línea base 1 (precirugía), la línea base 2 (durante la cirugía) y post-cirugía (días 1, 2, 3 y 4; las muestras se recogieron a intervalos de 6 h). La figura muestra una comparación entre los pacientes agrupados que desarrollaron SRIS/sepsis y aquellos que no la desarrollaron. Se indican la mediana y los percentiles.

40

Figura 5 CRP vs. cinética de IL-6 en pacientes asintomáticos pre- y post-cirugía. La figura muestra una comparación entre los pacientes agrupados que desarrollaron SRIS/sepsis y aquellos que no la desarrollaron. Se indican las medianas.

45

50 Los Ejemplos siguientes son meramente ilustrativos de la invención. No deben interpretarse, en modo alguno, como limitativos del alcance de la invención.

Ejemplos

55 Características de los pacientes

Se incluyeron en el estudio 48 pacientes (38 varones y 12 mujeres). La edad media de los pacientes era de 61 años, estando comprendida entre 19 y 87. Todos los pacientes habían ingresado en una división de cirugía torácica del Medizinische Universität Graz, Austria, para cirugía electiva. Treinta y siete pacientes se sometieron a cirugía pulmonar debido a diversos tipos de carcinoma; 9 pacientes recibieron una esofagoectomía debido a un carcinoma esofágico, 1 paciente se sometió a gastrectomía y 1 paciente se sometió a gastrectomía más esofagoectomía debido a quemadura química.

60

En todos los pacientes se inició un tratamiento antibiótico en la mañana del día de la cirugía.

65

En todos los pacientes se realizaron dos mediciones del nivel de línea base antes de la cirugía para determinar tanto IL-6 como parámetros de laboratorio rutinarios.

Se diagnosticó el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) basándose en las definiciones de consenso de la conferencia ACCP/SCCM (1992/2003), es decir, los pacientes diagnosticados de SRIS mostraban por lo menos 2 síntomas de entre los siguientes:

- a) un recuento de glóbulos blandos superior a aproximadamente 12.000/ μ l o inferior a aproximadamente 4.000/ μ l,
- b) una temperatura corporal superior a aproximadamente 38°C o inferior a aproximadamente 36°C,
- c) una tasa cardíaca superior a aproximadamente 90 latidos/minuto o una presión parcial de CO₂ inferior a aproximadamente 32 mmHg, y
- d) una tasa respiratoria superior a aproximadamente 20 respiraciones/minuto,
- e) más de aproximadamente 10% de glóbulos blancos inmaduros entre los glóbulos blancos en el recuento.

De entre los 48 pacientes, 10 (21%) desarrollaron SRIS dentro de la ventana temporal de seguimiento del estudio. De entre los 10 pacientes que mostraban signos clínicos de SRIS, tres presentaron además un cultivo sanguíneo positivo que confirmó la sepsis. Dos de los casos respondieron a un cambio del tratamiento antibiótico aunque sólo en un paciente se confirmó la infección mediante un cultivo sanguíneo positivo. Cinco de 10 pacientes mostraron signos de puramente SRIS sin infección durante el periodo de estudio. Uno de los pacientes desarrolló SRS poco después del final de la ventana de seguimiento. A la luz de los resultados comentados posteriormente, lo anterior demuestra que el diagnóstico y predicción basados en IL-6 no se limitan a la sepsis sino que también son aplicables al SRIS.

Materiales y métodos

Se determinó la IL-6 mediante inmunoensayo ELISA de tipo sándwich basado en el ensayo de IL-6 Cobas Elecsys de Roche (Roche, Mannheim, Alemania). Brevemente, se incubaron 30 μ l de la muestra de plasma o suero con un anticuerpo monoclonal biotinilado específico de IL-6. Tras la adición de un anticuerpo monoclonal específico de IL-6 marcado con un complejo de rutenio y micropartículas recubiertas con estreptavidina, los anticuerpos formaron un complejo de tipo sándwich con el antígeno de la muestra. A continuación, se aspiró la mezcla de reacción en la celda de medición del dispositivo de electroquimioluminiscencia Elecsys en el que se capturaron magnéticamente las micropartículas sobre la superficie del electrodo. A continuación se eliminaron las sustancias no unidas utilizando ProCell.

La aplicación de un voltaje al electrodo seguidamente indujo una emisión quimioluminiscente que se midió con un fotomultiplicador. Se determinaron los resultados con una curva de calibración que se generó específicamente para el instrumento mediante calibración de 2 puntos y una curva maestra proporcionada por el código de barras del reactivo.

La concentración de IL-6 determinada se analizó estadísticamente utilizando ensayos estadísticos estándares.

Según el protocolo de estudio, se realizó un seguimiento de los pacientes incluidos con respecto a los signos clínicos y de laboratorio de SRIS partiendo de 2 niveles de línea base obtenidos en dos puntos temporales, antes y durante la cirugía. Tras la cirugía, se realizó un seguimiento estrecho de los pacientes extrayendo muestras de sangre dos veces antes y cada 6 horas durante los 6 días posteriores a la cirugía. En cada punto temporal en que se extrajo la sangre, se registró el estado clínico según los criterios establecidos de SRIS y sepsis.

Resultados

Inesperadamente, los valores de concentración de IL-6 de los pacientes de SRIS/sepsis diferían significativamente de los valores de mediana de los pacientes que no desarrollaron SRIS. Aunque los niveles de IL-6 se incrementaron en todos los pacientes después de la cirugía, sólo los pacientes del grupo de SRIS mostraron un gran incremento de la concentración de IL-6 respecto a sus niveles de línea base respectivos, mientras que los pacientes no de SRIS sólo mostraron un incremento de la concentración de IL-6 de hasta 10 veces en comparación con los niveles de línea base respectivos (ver las figuras).

Características de algunos de los pacientes de SRIS (ver las figuras 1 y 2):

Las características de paciente del paciente nº 1 eran las siguientes: varón, edad 62 años, carcinoma esofágico, esofagectomía. Los parámetros de laboratorio rutinarios y los valores de IL-6 antes de la cirugía eran poco llamativos (niveles de línea base de IL-6 de 14,3 y 2,9 pg/ml). El primer día tras la cirugía se midió un nivel de línea base de 6,4 pg/ml de IL-6 al mediodía. El nivel de IL-6 seis horas después era de 2.279,00 pg/ml. Aunque los valores se redujeron con el tiempo, se mantuvieron elevados hasta el día 6, con valores de aproximadamente 500 pg/ml. Los signos clínicos de SRIS/sepsis sólo se identificaron la primera vez el día 4, cuando se documentaron un cultivo sanguíneo positivo que indicaba una infección bacteriana y una temperatura corporal incrementada de >38°C. El día 6 la tasa cardíaca era de >90 latidos/minuto. Este caso demuestra convincentemente que el seguimiento estrecho y

frecuente de IL-6 permite un diagnóstico y detección tempranos de un riesgo elevado de desarrollar o sufrir SRIS mucho antes de la aparición de los signos y síntomas clínicos, dando soporte al diagnóstico de SRIS o sepsis.

5 Las características de paciente del paciente nº 2 eran las siguientes: varón, edad 81 años, carcinoma en la unión esofagogástrica. Antes de la cirugía, el paciente presentaba un recuento leucocitario bajo. Antes de la cirugía, el paciente presentaba un recuento leucocitario bajo. El segundo nivel de línea base era de hecho <4.000 glóbulos blancos. El día 1 después de la cirugía el paciente presentaba una temperatura corporal <360°C y una tasa respiratoria >20/minuto. Se consideró que los dos signos sugerían SRIS. Simultáneamente los valores de IL-6 en la línea base 1 eran de 1,6 pg/ml y en la línea base 2, de 37,9 pg/ml se incrementaron a 1.400,00 pg/ml. Aparte del recuento de glóbulos blancos, que se incrementó a >12 entre el día 2 y el día 6, sólo se mantuvieron altos los valores de IL-6 (hasta 500 pg/ml) hasta el día 4 y después se redujeron lentamente. No se obtuvo ningún cultivo sanguíneo positivo, es decir, no se detectó ninguna infección relevante para la sepsis. Este caso demuestra que un nivel de IL-6 superior al nivel de referencia permite un diagnóstico y detección precoces de un riesgo elevado de desarrollar o sufrir SRIS.

15 Las características de paciente del paciente nº 3 eran las siguientes: varón, edad 70 años, cáncer de pulmón, neumonectomía. El paciente presentaba inicialmente (línea base 1) un recuento incrementado de glóbulos blancos de >12.000 aunque un valor normalizado en la línea base 2 una semana después. Los niveles de IL-6 de línea base también se encontraban dentro del intervalo normal de 23,5 y 16,5 pg/ml. Durante todos los puntos temporales posteriores a la cirugía, no aparecieron signos clínicos diferentes de un nivel de IL-6 elevado que apuntasen a SRIS o sepsis. Tras el día 2, el recuento de glóbulos blancos se incrementó a niveles de aproximadamente 13.000 y no se redujo. La IL-6 se incrementó tras la cirugía a valores de entre 200 y 300 pg/ml con picos intermedios de 600 pg/ml e incluso de 850 pg/ml en un punto de medición. El día 5 por la tarde el valor de IL-6 se incrementó súbitamente a 3.994,00 pg/ml tras un valor de 148,6 pg/ml 6 horas antes. Dos días después, más allá de la línea temporal del protocolo del estudio, el paciente desarrolló criterios de SRIS y desarrolló una condición crítica aunque pudo estabilizarse. Ningún otro parámetro de laboratorio o clínico aparte de IL-6 había indicado el empeoramiento agudo del paciente. De acuerdo con lo anterior, el estrechamiento estrecho de IL-6 inesperadamente permitió la detección precoz de un riesgo elevado de desarrollar SRIS o sepsis que permitió una intervención terapéutica precoz.

30 Las características de paciente del paciente nº 4 eran las siguientes: hembra, edad 50 años, condrosarcoma, metástasis en el pulmón, neumonectomía. El recuento RGB en la línea base y durante el periodo de estudio completo de 6 días se encontraban en el intervalo normal con un valor máximo de 11.000 el día 4. IL-6 se incrementó ya durante la cirugía (línea base 2) hasta un valor de 282,7 pg/ml. En la primera medición tras la cirugía (día 1/1) IL-6 se incrementó a 1.079 pg/ml y 6 horas después alcanzó un pico de 2.771 pg/ml. Desde ese punto temporal los valores se redujeron continuamente a valores de aproximadamente 70 pg/ml al final del periodo de estudio. Los criterios de SRIS temperatura>38°C y TC>90/min aparecieron en este paciente en los mismos puntos temporales en que IL-6 alcanzaba los valores más altos, lo que confirma que IL-6 es un marcador precoz fiable de SRIS.

40 Características de paciente del paciente nº 5: varón, 19 años, quemadura química de esófago y estómago. En línea base antes de la cirugía todos los parámetros se encontraban en un intervalo normal. IL-6 se incrementó ligeramente hasta 67,4 pg/ml durante la cirugía, momento en el que se extrajo la segunda muestra de sangre de línea base. La siguiente muestra de sangre extraída 6 horas después (día 1/1) ya mostraba un valor de IL-6 superior a 700 pg/ml que se incrementó adicionalmente a más de 1.000 pg/ml durante los días siguientes (días 1/1-3/1). Se registraron signos clínicos de SRIS (tasa cardíaca>100/min. y tasa respiratoria>20/min.) desde el día 5/2 hasta el final del periodo de estudio (día 6/2).

50 Características de paciente del paciente nº 6: mujer, edad 60 años, lobectomía tras cáncer de pulmón. En ambos niveles de línea base todos los parámetros se encontraban en el intervalo normal. El primer valor de IL-6 después de la cirugía (día 1/1) mostró un incremento de prácticamente 500 pg/ml. Los niveles de IL-6 se incrementaron durante todo el periodo de estudio, mostrando niveles de entre 550 y 150 pg/ml. Los leucocitos se incrementaron significativamente y alcanzaron niveles >20x10 a partir del día 1/4 y posteriormente. Conjuntamente con un incremento de la temperatura corporal a >38°C se registró como SRIS. Tras dos puntos temporales la temperatura corporal volvió a la normalidad pero se incrementó una vez más el día 6/2.

55 Características del paciente nº 7: varón, edad 48 años, cáncer de pulmón, neumectomía. Inicialmente, en la línea base, todos los parámetros se encontraban en el intervalo normal. Ya en el segundo punto temporal de línea base el paciente mostraba una tasa cardíaca incrementada >100/min. que persistió en prácticamente todos los puntos temporales del estudio. El IL-6 se incrementó significativamente el día 1/1 hasta un valor de prácticamente 400 pg/ml y cayó posteriormente a valores moderadamente incrementados de aproximadamente 70 pg/ml durante los siguientes 7 puntos temporales de muestreo. El día 4/1 IL-6 empezó a incrementarse nuevamente, alcanzando valores superiores a 500 pg/ml. Se registraron signos clínicos de SRIS (tasa cardíaca>100/min. y tasa respiratoria>20/min.) a partir del día 5/2 hasta el final del estudio, el día 6/2.

65 *Características de los pacientes no de SRIS (ver las figuras 1 y 3 a 5).*

Treinta y ocho de los 48 pacientes que no desarrollaron SRIS o sepsis según las definiciones manifestaron hasta un único síntomas de SRIS durante el periodo de observación en un determinado punto temporal pero nunca dos o más y, por consiguiente, estos pacientes fueron diagnosticados como no afectados de SRIS. Los valores de IL-6 de línea base eran comparables al de los pacientes de SRIS. Tras la cirugía, todos los pacientes no de SRIS presentaban un ligero incremento de los valores de IL-6, algunos hasta aproximadamente 100 pg/ml, algunos hasta 400, uno con un único pico de 900 pg/ml, pero no mostraron la elevación drástica de niveles de IL-6 observados en el grupo de pacientes de SRIS. El pequeño incremento observado de los niveles de IL-6 en los pacientes no de SRIS se encuentra dentro del intervalo esperable considerando la gravedad de la cirugía realizada. Basándose en el resultado (ninguna aparición de SRIS o sepsis) en estos pacientes, los datos confirman que los pacientes presentaban un riesgo bajo de sufrir o desarrollar SRIS o sepsis.

Literatura:

1. Kishimoto T, Hirano T. A New Interleukin with Pleiotropic Activities. *Bio Essays* 1988 Jul; 9(1): 11-15
2. Song M, Kellum JA. Interleukin-6. *Crit Care Med* 2005; 33 (Suppl12): 463-465.
3. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 797-819
4. Drucker C, Gewiese J, Malchow S, Scheller J, Rose-John S. Impact of Interleukin-6 Classic- and Trans-signaling on Liver Damage and Regeneration. *J Autimm* 2009, en prensa.
5. Hodgkin KE, Moss M. The epidemiology of Sepsis. *Current Pharm Design* 2008;14:1833-1839.
6. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992 Jun;20(6):864-74.
7. Helfgott DC, Tatter SB, Santhanam U, Clarick RH, Bhardwaj N, May LT, Sehgal PB. Multiple Forms of IFN- β /IL-6 in Serum and Body Fluids during Acute Bacterial Infection. *J Immunology* 1989; 142:948-953.
8. Pinsky MR, Vincent JL, Alegre M, Dupont E. Serum Cytokine Levels in Human Septic Shock. Relation to Multiple Organ Failure and Mortality. *Chest* 1993; 103: 565-575
9. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K, Nakamura M. Sequential measurements of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome(SIRS)/sepsis. *Cytokine* 2005; 29: 169-175.
10. Marti L, Cervera C, Filella X, Marin JL, Almela M, Moreno A. Cytokine-release patterns in elderly patients with systemic inflammatory response syndrome. *Gerontology.* 2007;53(5):239-44.
11. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M. Cytokine Serum Level During Severe Sepsis in Human IL-6 as a Marker of Severity. *Ann Surg* 1992; 215(4): 356-362.
12. Martins GA, Da Gloria Da Costa Carvalho M, Rocha Gattass C. Sepsis: a follow-up of cytokine production in different phases of septic patients. *Int. J Mol Med.* 2003 May;11(5):585-91.
13. Herzum I, Renz H. Inflammatory markers in SIRS, sepsis and septic shock. *Curr Med Chem.* 2008;15(6):581-7
14. Brunkhorst FM. Sepsismarker--what is useful? *Dtsch Med Wochenschr.* 2008 Nov;133(48):2512-5.
15. Ventetuolo CE, Levy MM. Biomarkers: diagnosis and risk assessment in sepsis. *Clin Chest Med.* 2008 Dec;29(4):591-603, vii.M
16. Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr Opin Crit Care.* 2005 Oct;11 (5):473-80.
17. Du B, Li Y, Chen D, Pan J. Serum procalcitonin and interleukin-6 help differentiate between severe sepsis and systemic inflammatory response syndrome of non-infectious origin. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2002 Aug 25;82(16):1111-4.
18. Mokart D, Merlin M, Sannini A, Brun JP, Delpero JR, Houvenaeghel G, Moutardier V, Blache JL. Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *Br J Anaesth.* 2005 Jun;94(6):767-73.
19. Kitanovski L, Jazbec J, Hojker S, Gubina M, Derganc M. Diagnostic accuracy of procalcitonin and interleukin-6 values for predicting bacteremia and clinical sepsis in febrile neutropenic children with cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006 Jun;25(6):413-5.
20. Bottner F, Wegner A, Winkelmann W, Becker K, Erren M, Götze C. Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement. *J Bone Joint Surg Br.*2007 Jan;89(1):94-9.
21. Bogner V, Keil L, Kanz KG, Kirchhoff C, Leidel BA, Mutschler W, Biberthaler P. Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients. *Eu J Med Res* 2009; 14:284-291.
22. Mastorakos G, Ilias Interleukin-6: a cytokine and/or a major modulator of the response to somatic stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Nov;1088:373-81.
23. Bhatia M, He M, Zhang H, Mochhala S. Sepsis as a model of SIRS. *Front Biosci.* 2009 Jan 1;14:4703-11.
24. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, Melchionda F, Castellani G, Nardi L, Landini MP, Baccarani M, Pession A, Sambri V. Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by realtime PCR. *J Infect.* 2009 May; 58 (5): 346-51.
25. Westh H, Lisby G, Breyse F, Böddinghaus B, Chomarar M, Grant V, Goglio A, Raglio A, Schuster H, Stüber F, Wissing H, Hoelt A. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect.* 2009, Jun; 15 (6): 544-51.

26. von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, Hahn-Ast C, Orlopp KS, Marklein G, Purr I, Cook G, Hoefft A, Glasmacher A, Stüber F. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol.* 2009 Aug; 47 (8): 2405-10.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la detección o diagnóstico del riesgo de desarrollar un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) o sepsis en un paciente humano asintomático tras un tratamiento invasivo, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 a) determinar el nivel de IL-6 o de una variante de la misma, que presenta una identidad de secuencia respecto a la molécula de la IL-6 humana de por lo menos 80% a lo largo de la longitud completa de la IL-6 humana en una muestra de sangre, plasma o suero aislada de un paciente después de dicho tratamiento invasivo,
- 15 b) comparar el nivel de IL-6 o de dicha variante de la misma determinada en la etapa a) con un nivel de referencia, en el que dicho nivel de referencia se calcula multiplicando un nivel de línea base de IL-6 por un factor de por lo menos 50, en el que dicho nivel de línea base se ha obtenido del paciente antes, durante o en las seis horas posteriores a dicho tratamiento invasivo, y
- 20 c) detectar o diagnosticar el riesgo de desarrollar un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) o sepsis, en el que las etapas a) y b) se repiten para cada muestra, y en el que dichas muestras en la etapa a) se aísla a intervalos periódicos durante un periodo de entre 3 y 10 días, encontrándose comprendidos dichos intervalos entre 15 minutos +/- 20% y 12 horas +/- 20%, y en el que el nivel determinado en la etapa a) superior al nivel de referencia indica que el paciente humano presenta un riesgo elevado de desarrollar SRIS o sepsis.
- 25 2. Método según la reivindicación 1, en el que el paciente humano asintomático es un paciente que manifiesta menos de 2, preferentemente menos de 1 síntoma de entre a) a d) a continuación, preferentemente de entre a) a e) a continuación:
- 30 a) recuento de glóbulos blancos superior a 12.000/ μ l +/- 20% o inferior a aproximadamente 4.000/ μ l +/- 20%,
 b) temperatura corporal superior a 38°C +/- 20% o inferior a 36°C +/- 20%,
 c) tasa cardíaca superior a 90 latidos/minuto +/- 20% o una presión parcial de CO₂ inferior a aproximadamente 32 mmHg +/- 20%, y
 35 d) tasa respiratoria superior a 20 respiraciones/minuto +/- 20%,
 e) más de 10% de glóbulos blancos inmaduros entre los glóbulos blancos en el recuento, opcionalmente el paciente no manifiesta una infección diagnosticada.
- 40 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el intervalo habitual es de entre 1 y 6 horas +/- 20%, preferentemente es de entre 1 hora +/- 20% y 3 horas +/- 20%.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nivel de referencia se obtiene multiplicando el nivel de línea base de IL-6 o de dicha variante del mismo por un factor de por lo menos 100 +/- 20%, preferentemente por un factor de por lo menos 500 +/- 20% o por un factor de por lo menos 1.000 +/- 20%.
- 45 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el nivel de IL-6 o de de dicha variante de la misma en la muestra se determina con un anticuerpo que se une a IL-6, o con un fragmento Fav, Fab o F(ab)₂ del mismo.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el paciente humano asintomático es un paciente que se somete a un intervención quirúrgica.
- 50 7. Utilización de un anticuerpo que se une a IL-6, o un fragmento Fv, Fab o F(ab)₂ del mismo, en un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

Figura 1

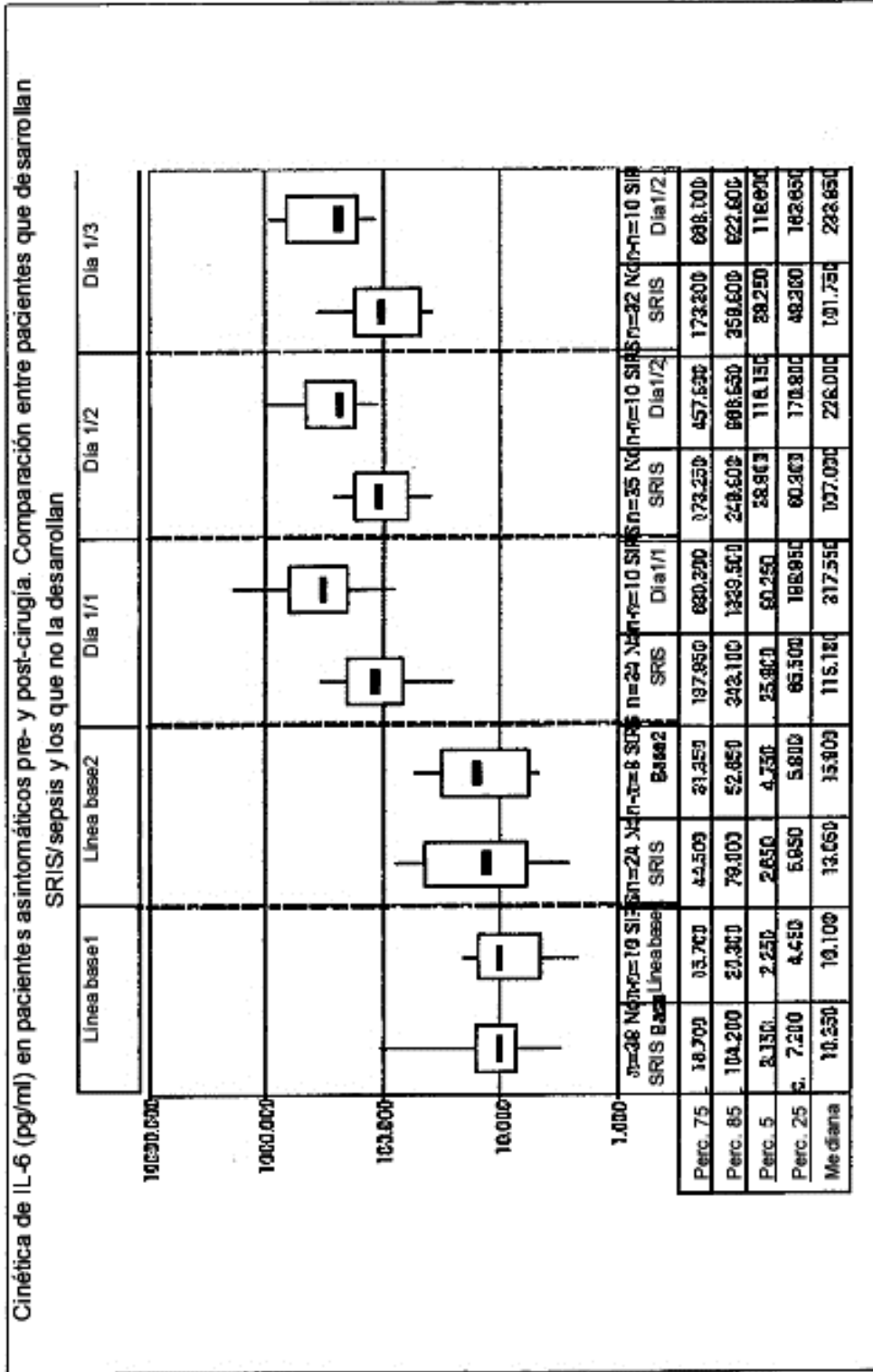


Figura 1 continuación

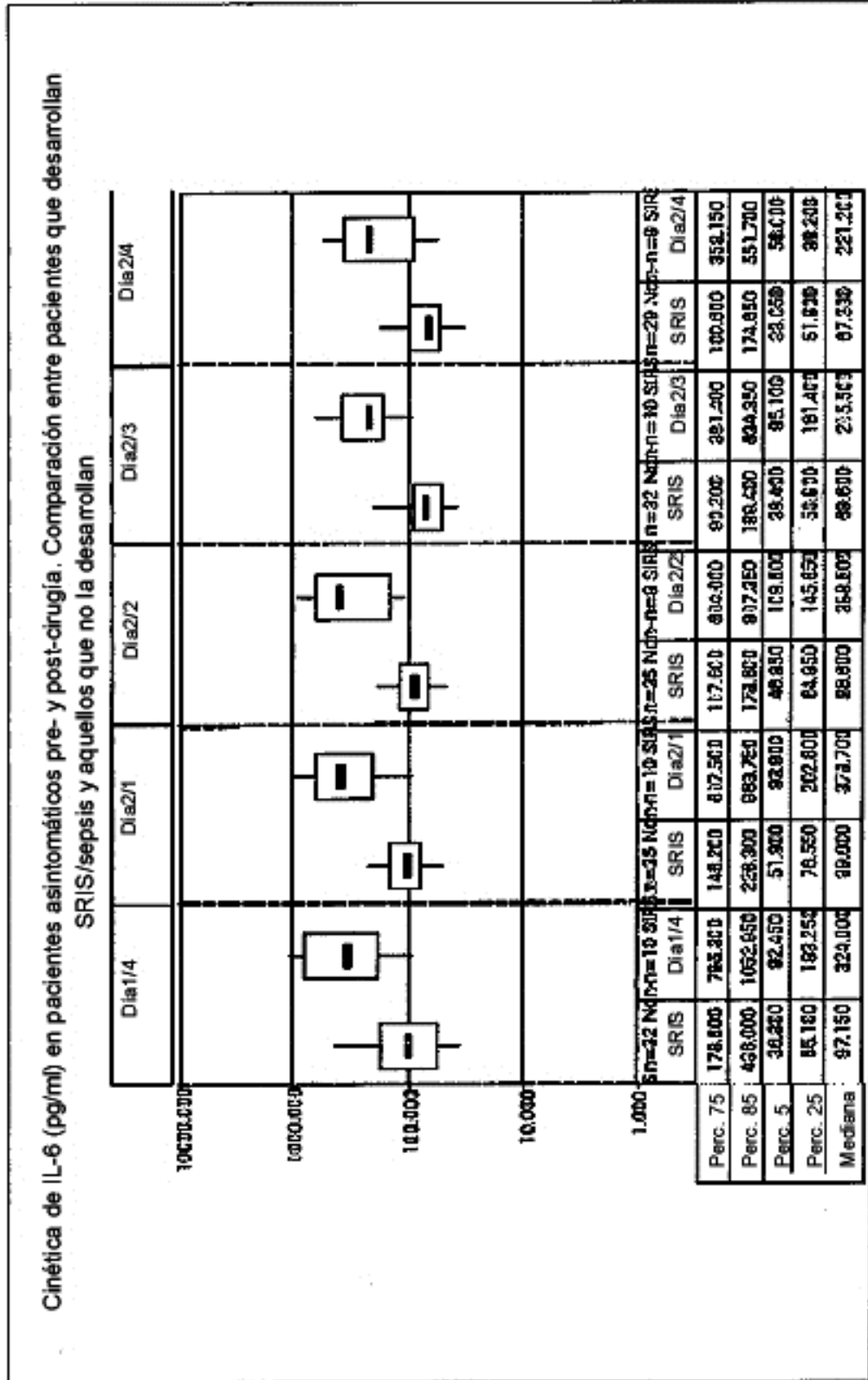


Figura 1 continuación

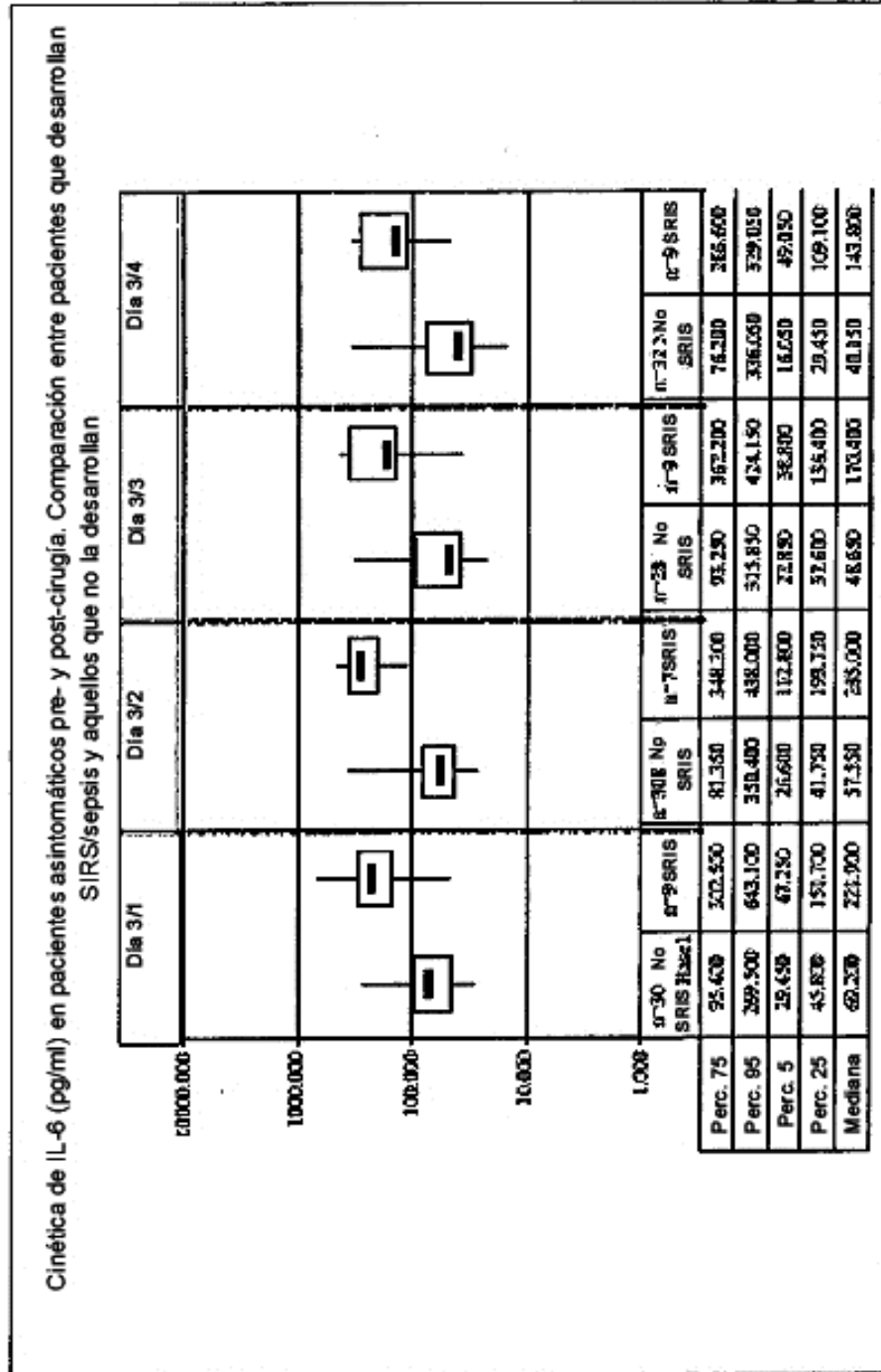


Figura 1 continuación

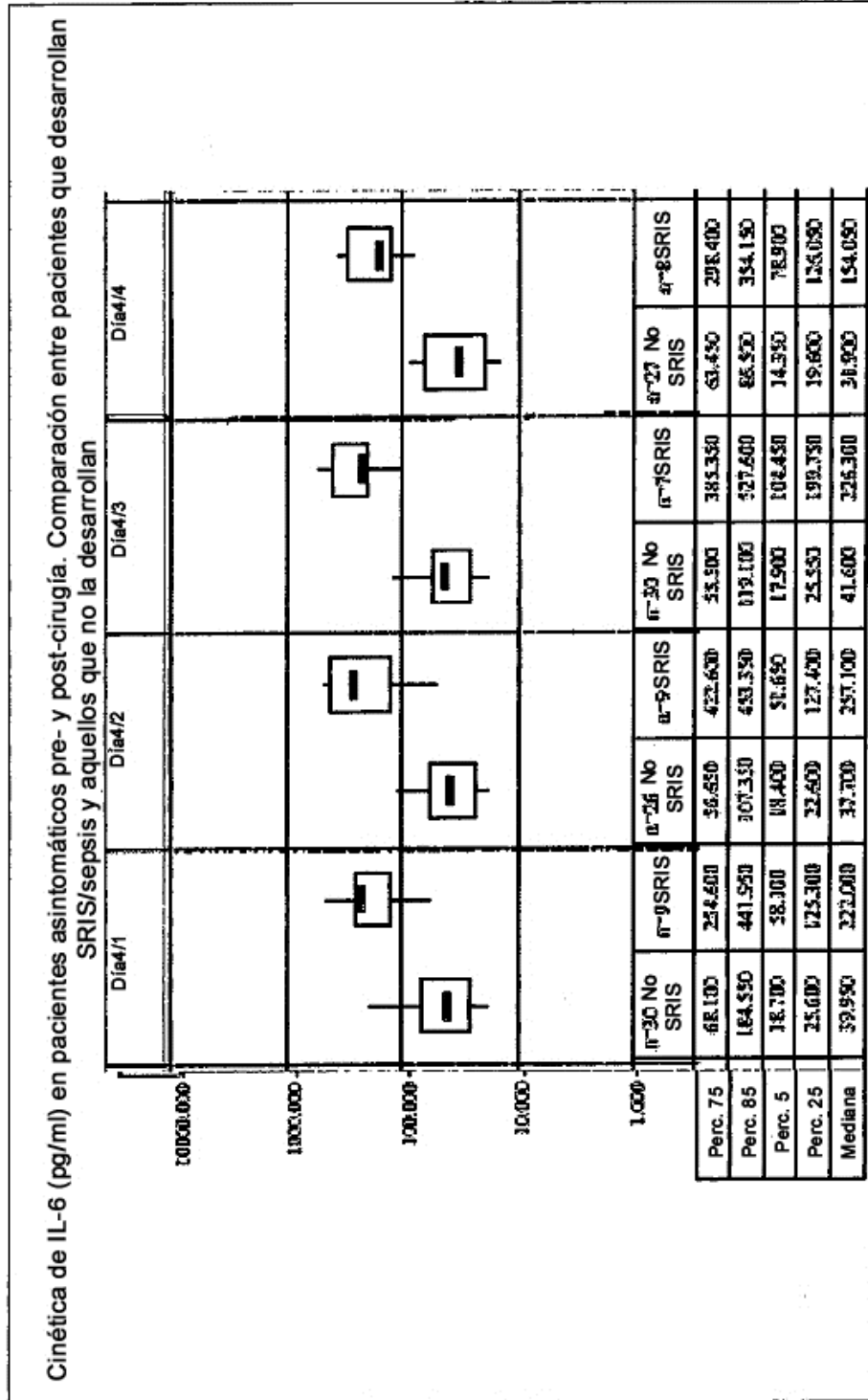


Figura 1 continuación

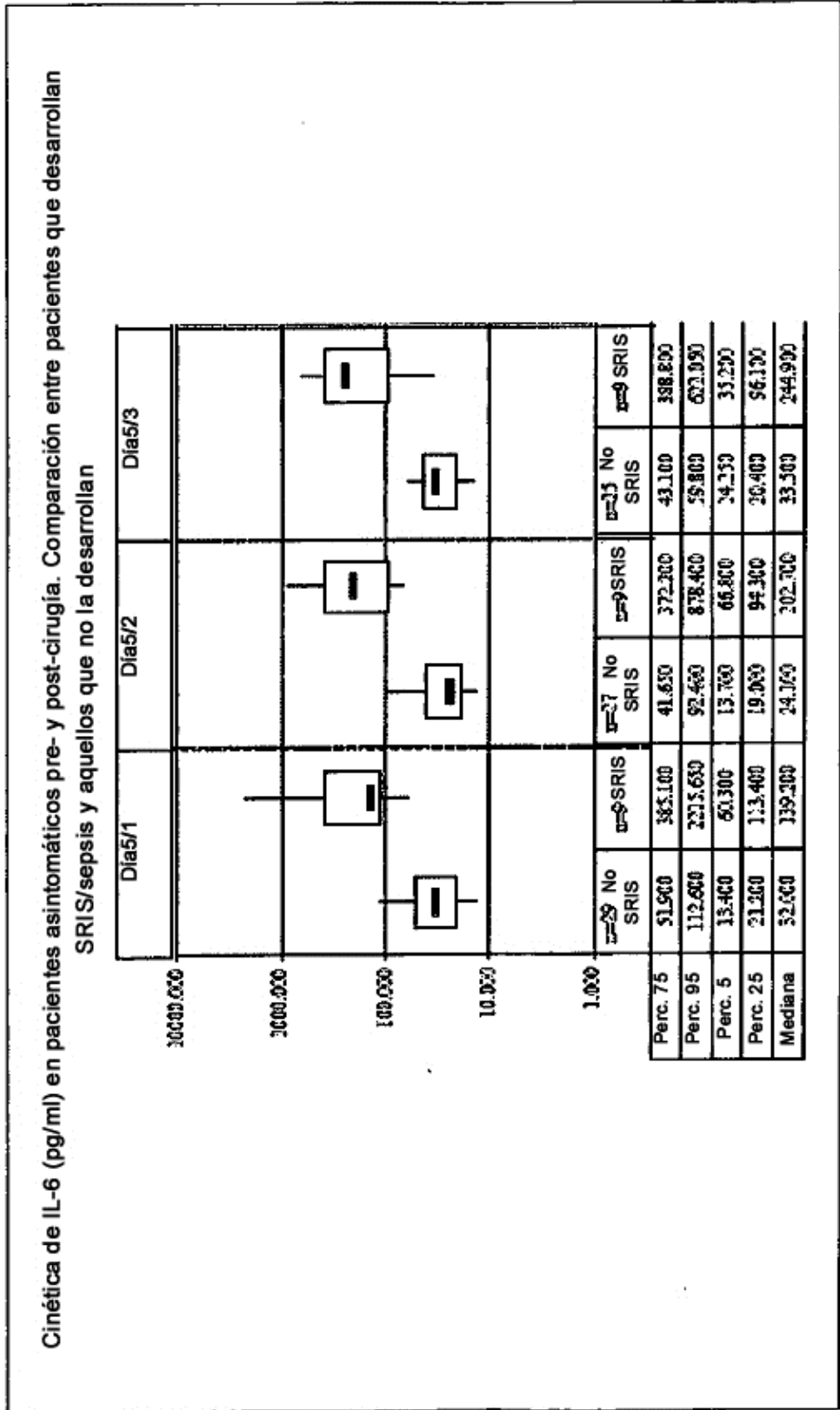


Figura 1 continuación

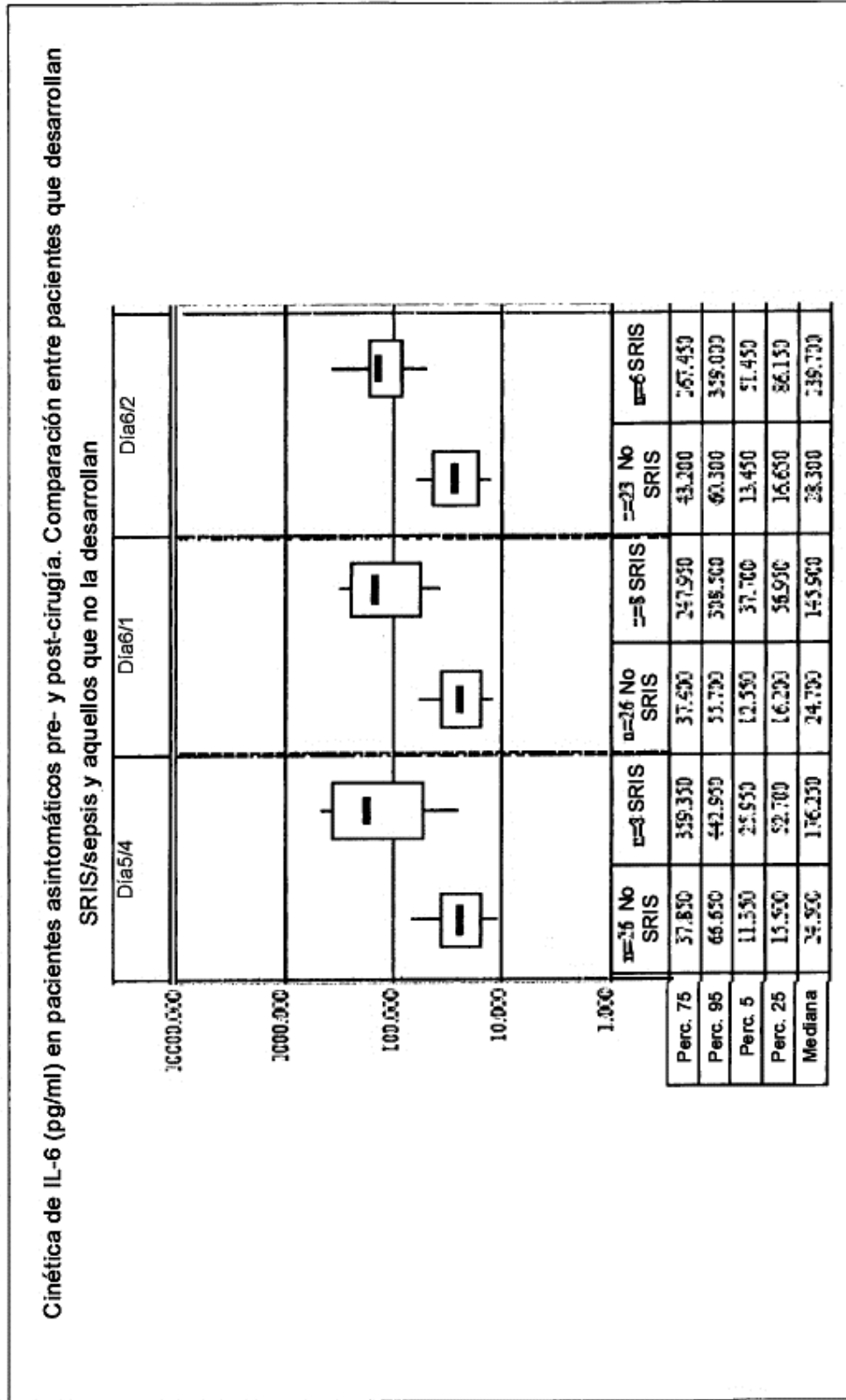
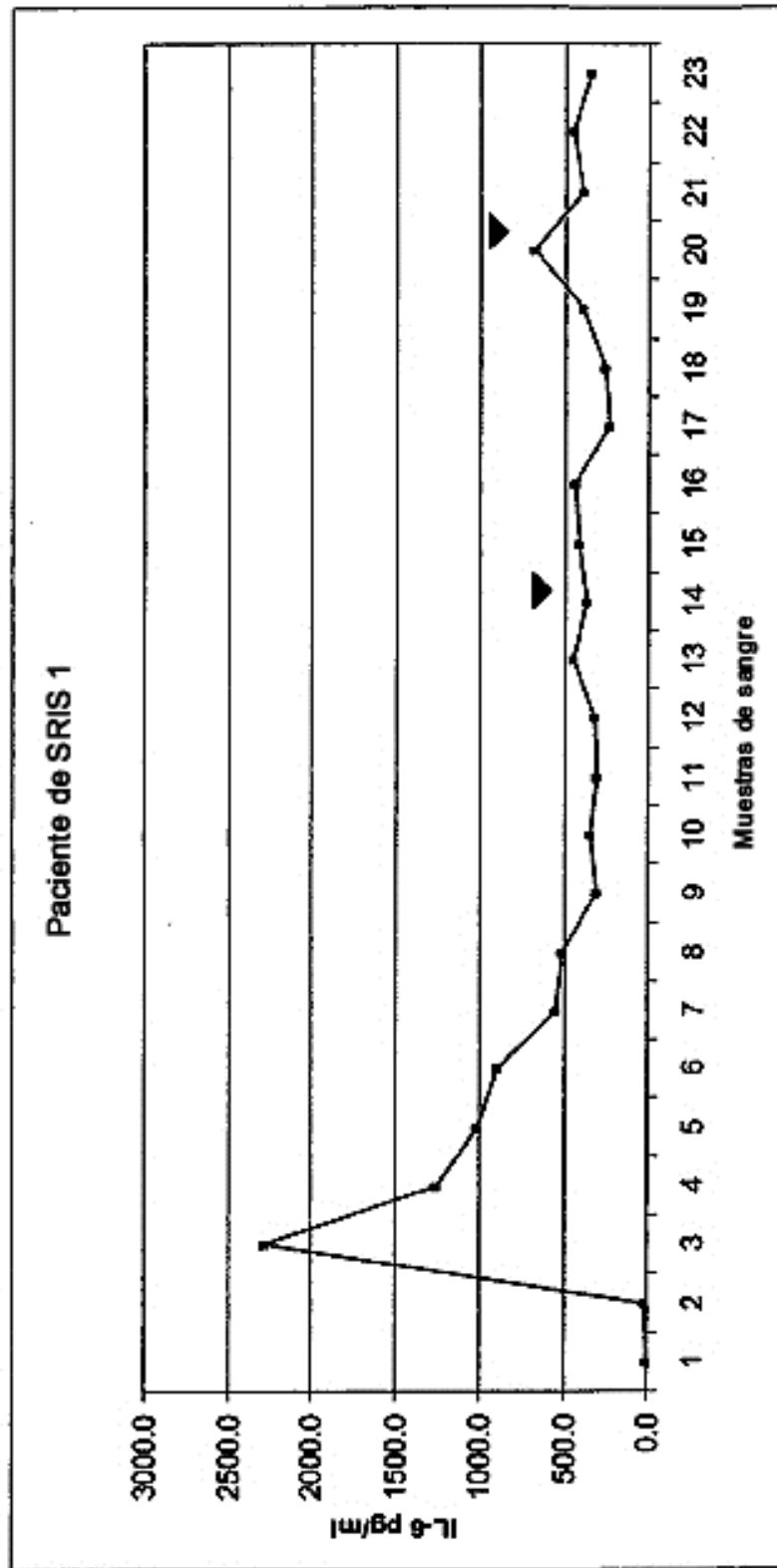


Figura 2



▼ = signos clínicos de SRIS

Figura 2 continuación

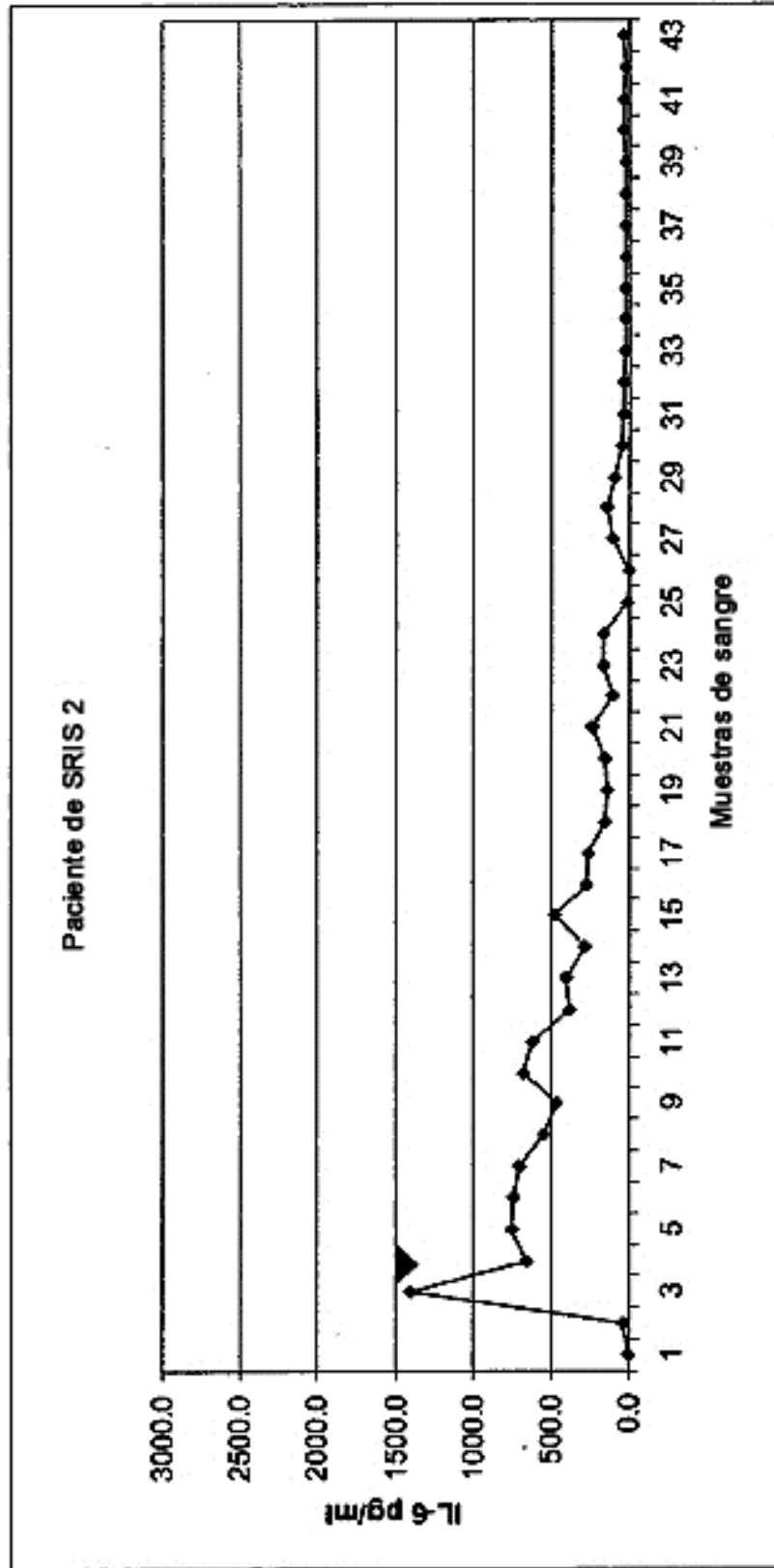


Figura 2 continuación

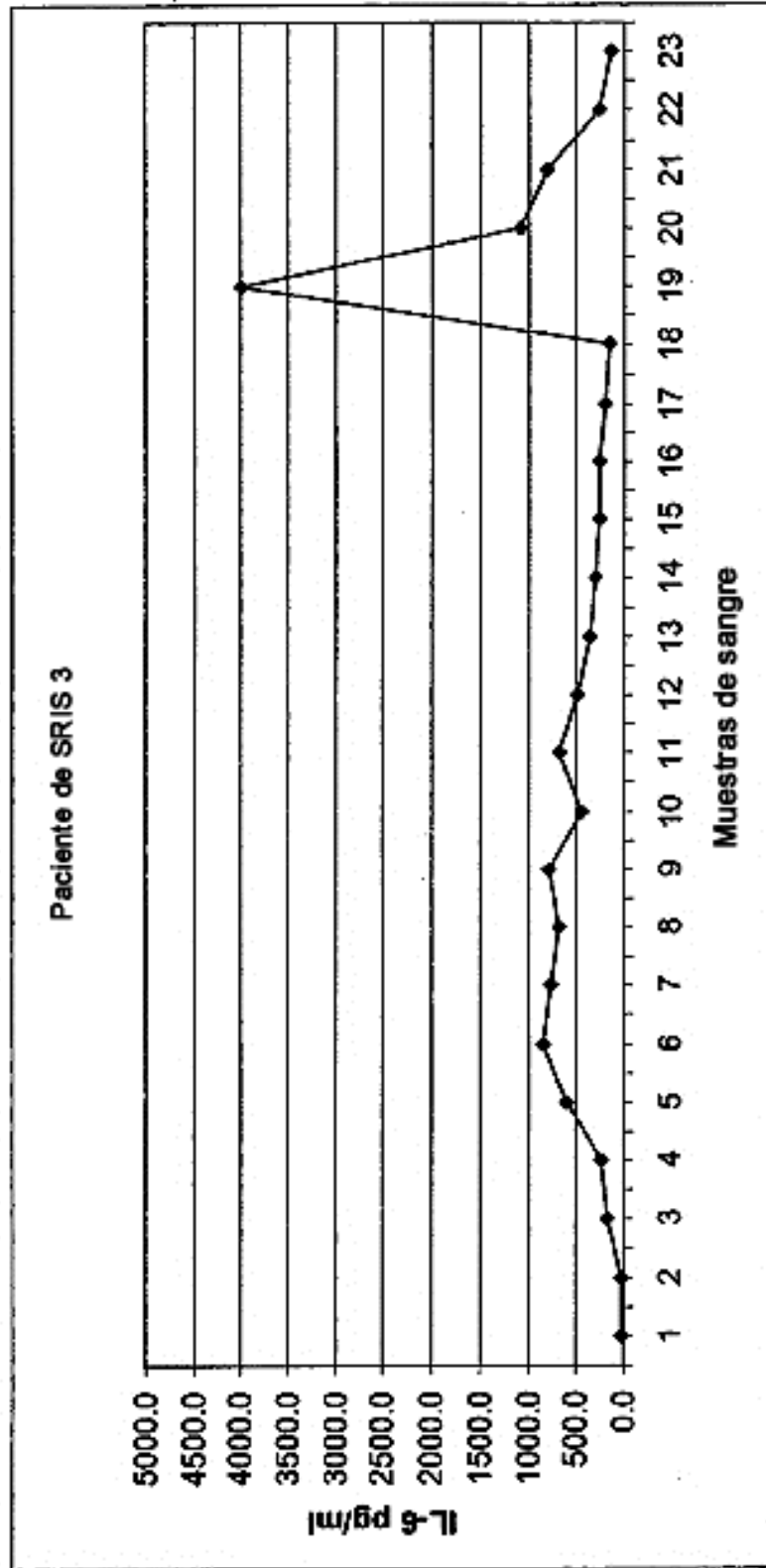


Figura 2 continuación

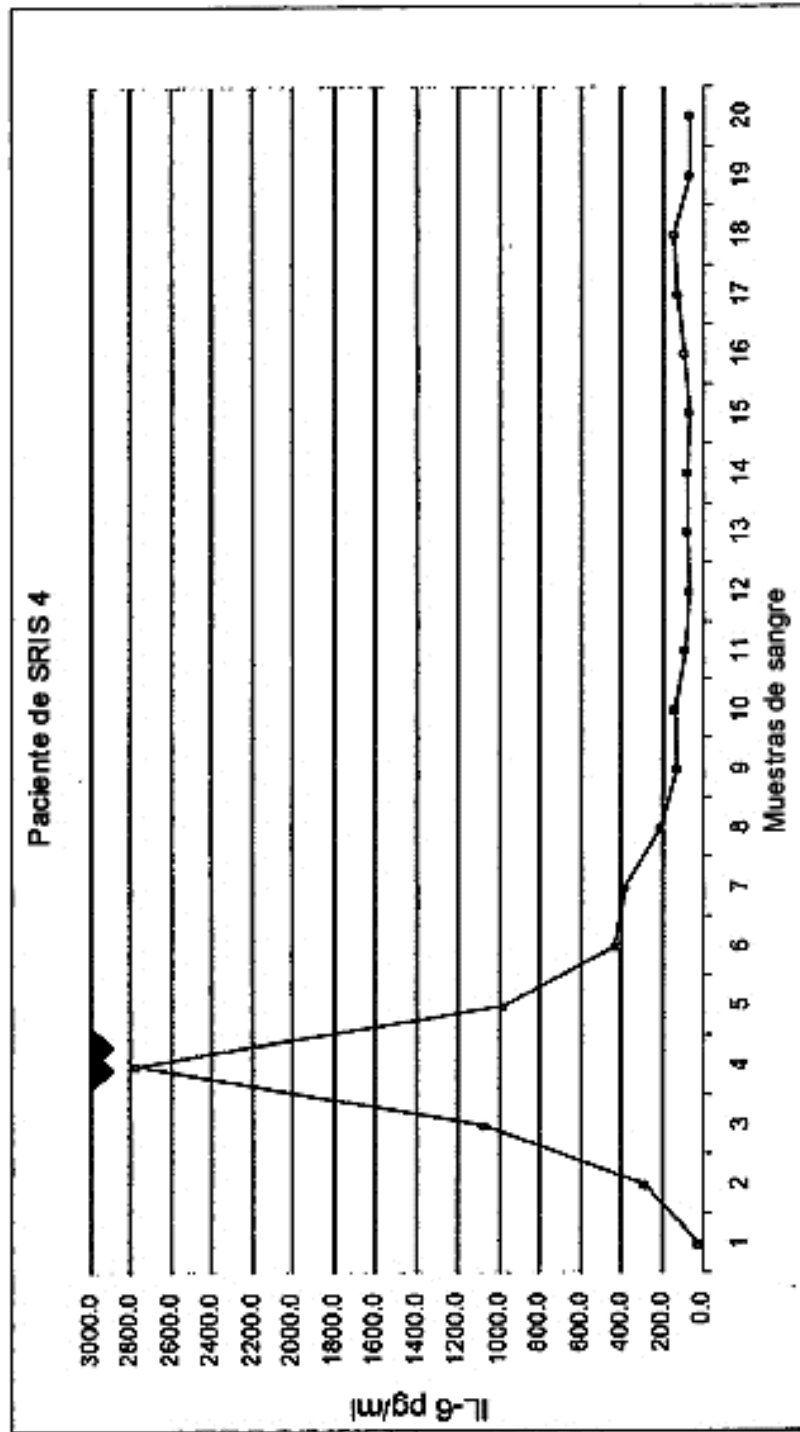


Figura 2 continuación
Paciente de SRIS 5

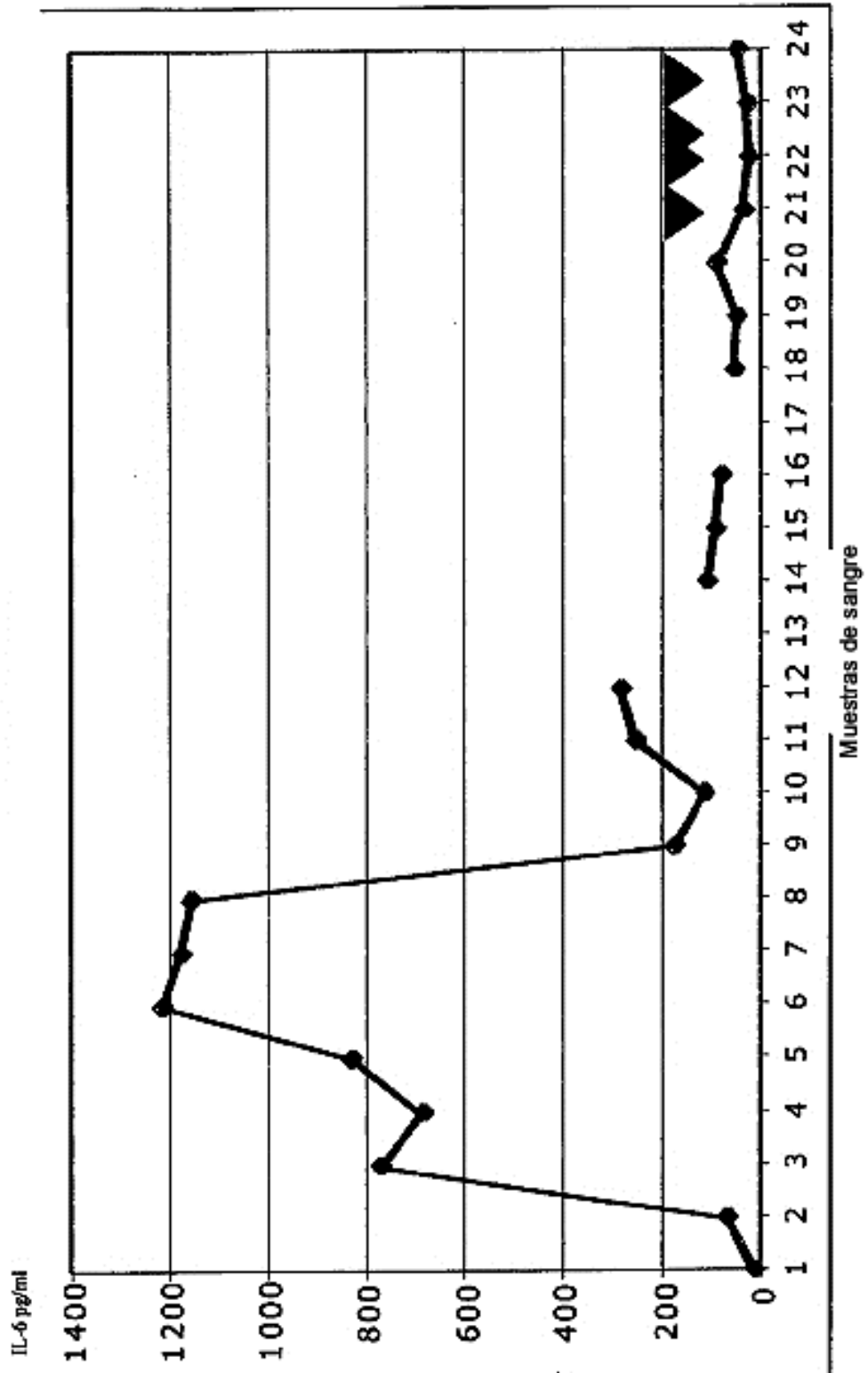


Figura 2 continuación

Paciente de SRIS 6

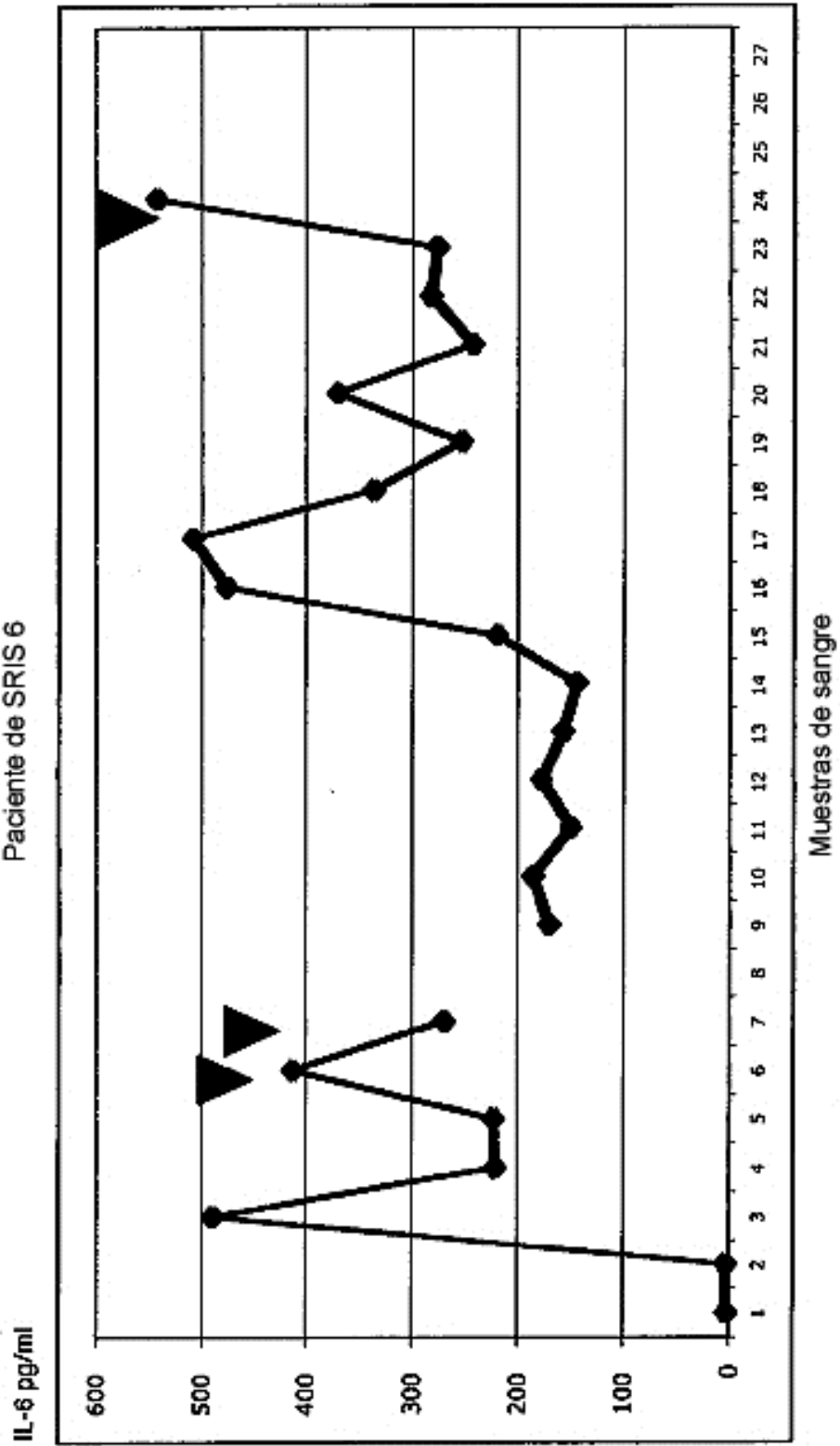


Figura 2 continuación

Paciente de SRIS 7

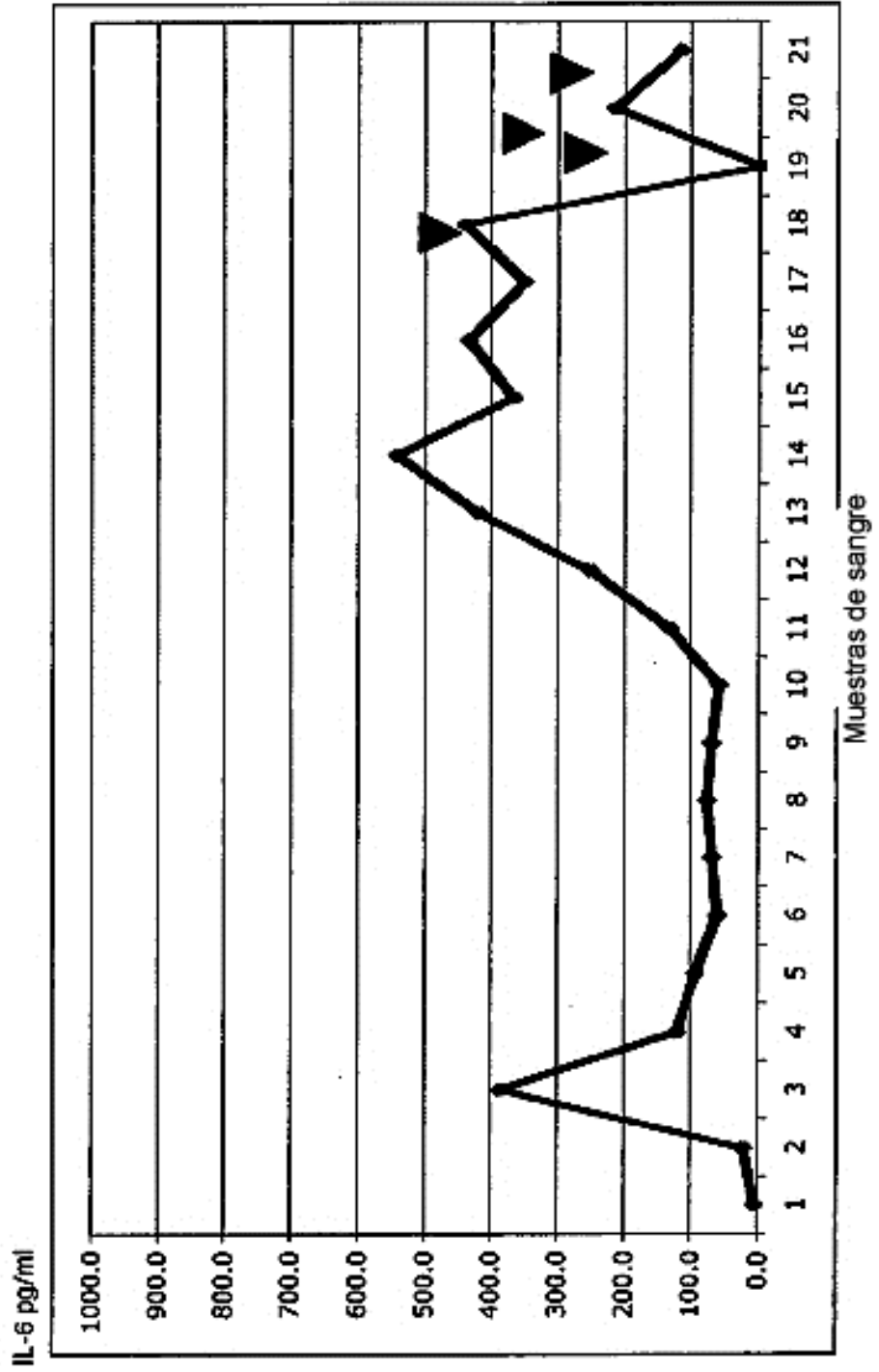


Figura 3
Mediana de IL-6 Pacientes no SRIS

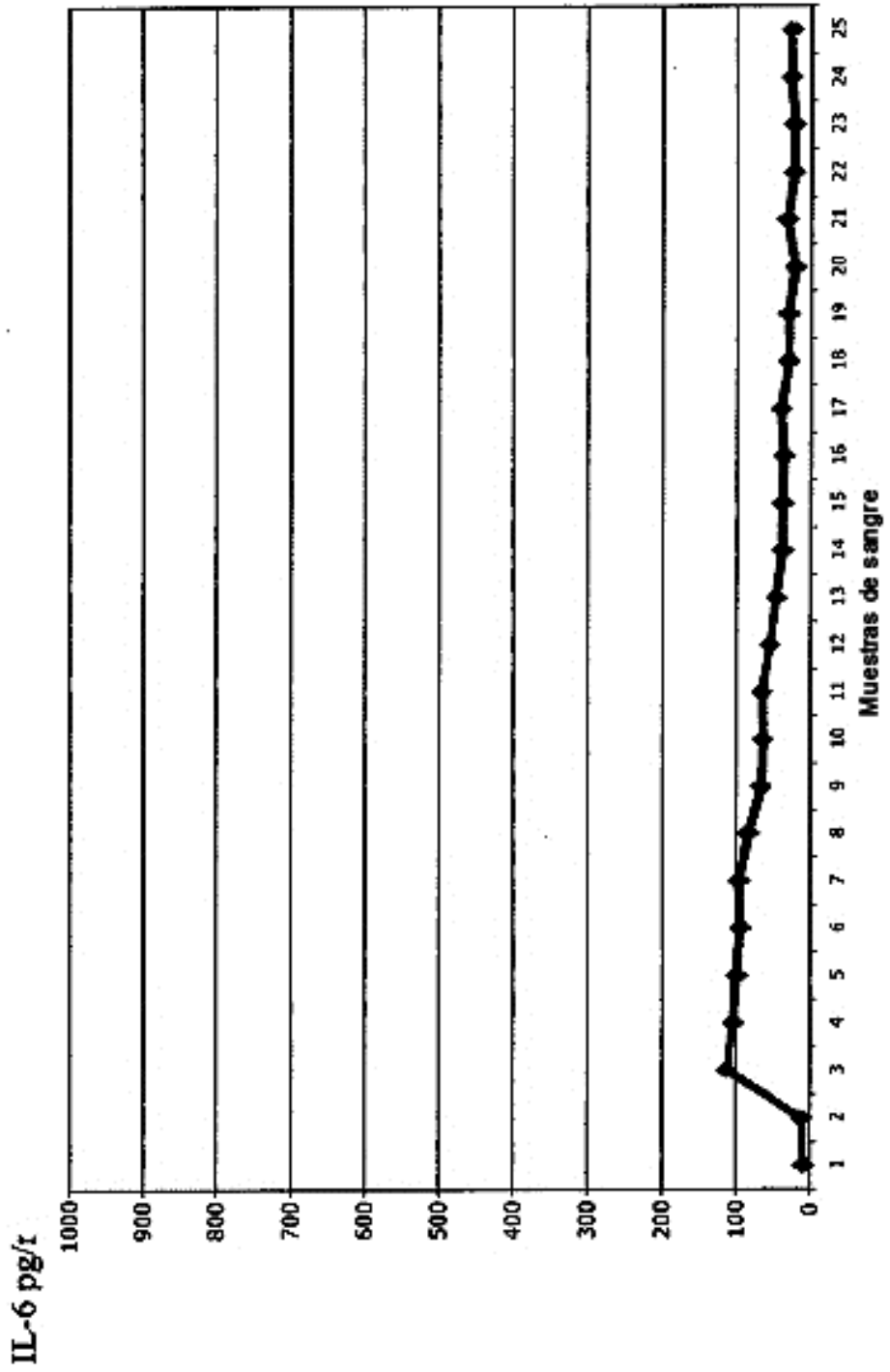


Figura 4

Niveles de CRP

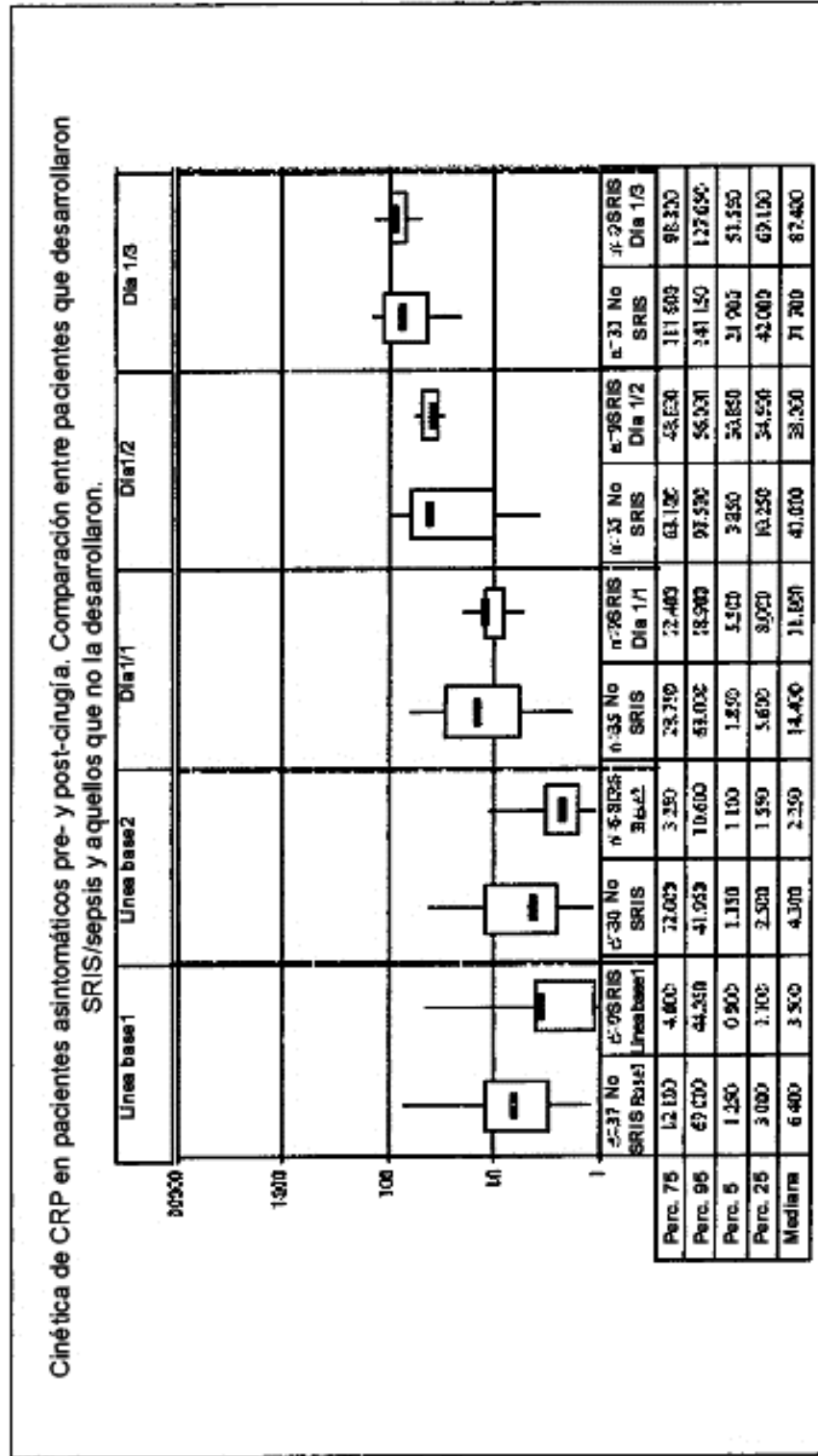


Figura 4 continuación

Niveles de CRP

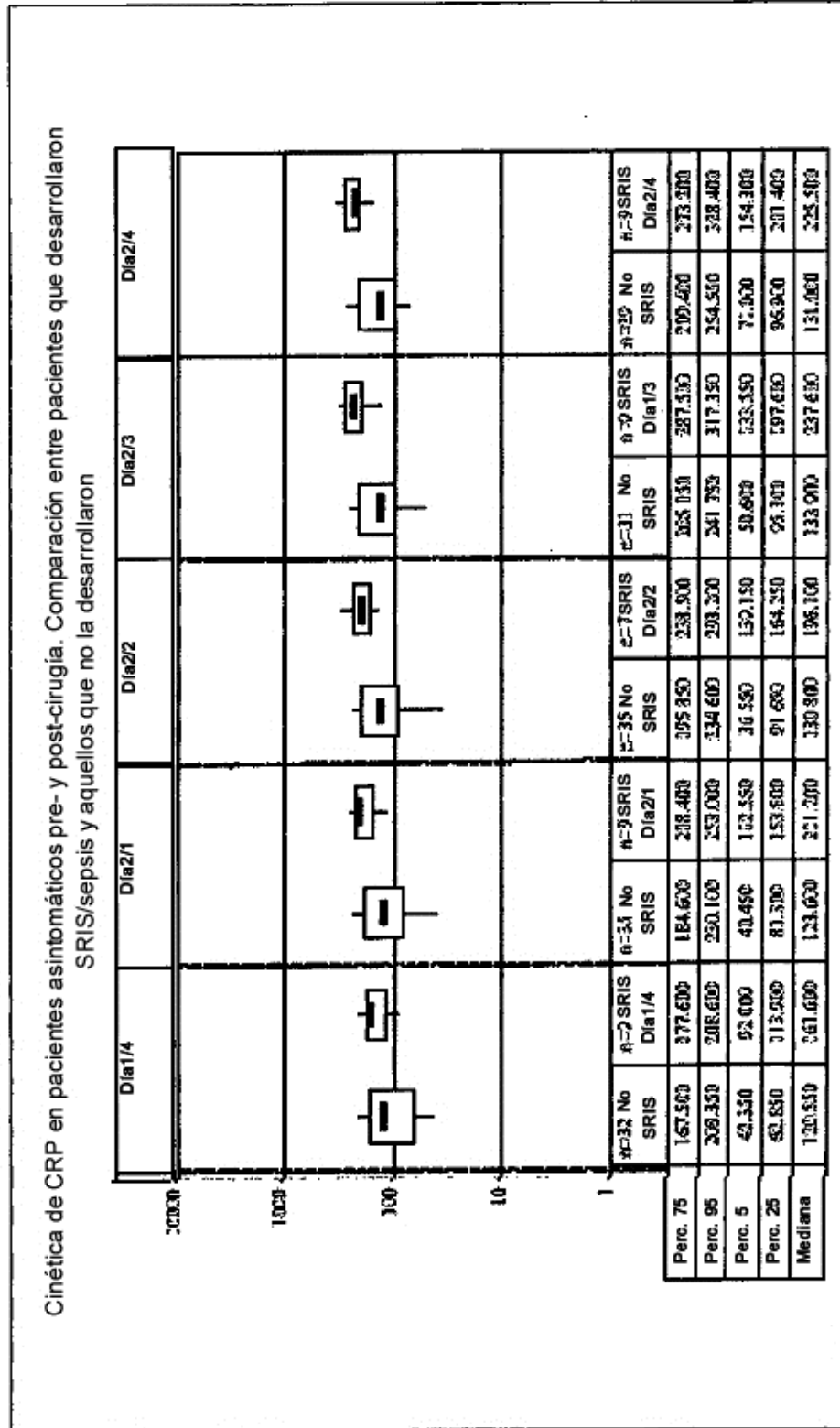


Figura 4 continuación

Niveles de CRP

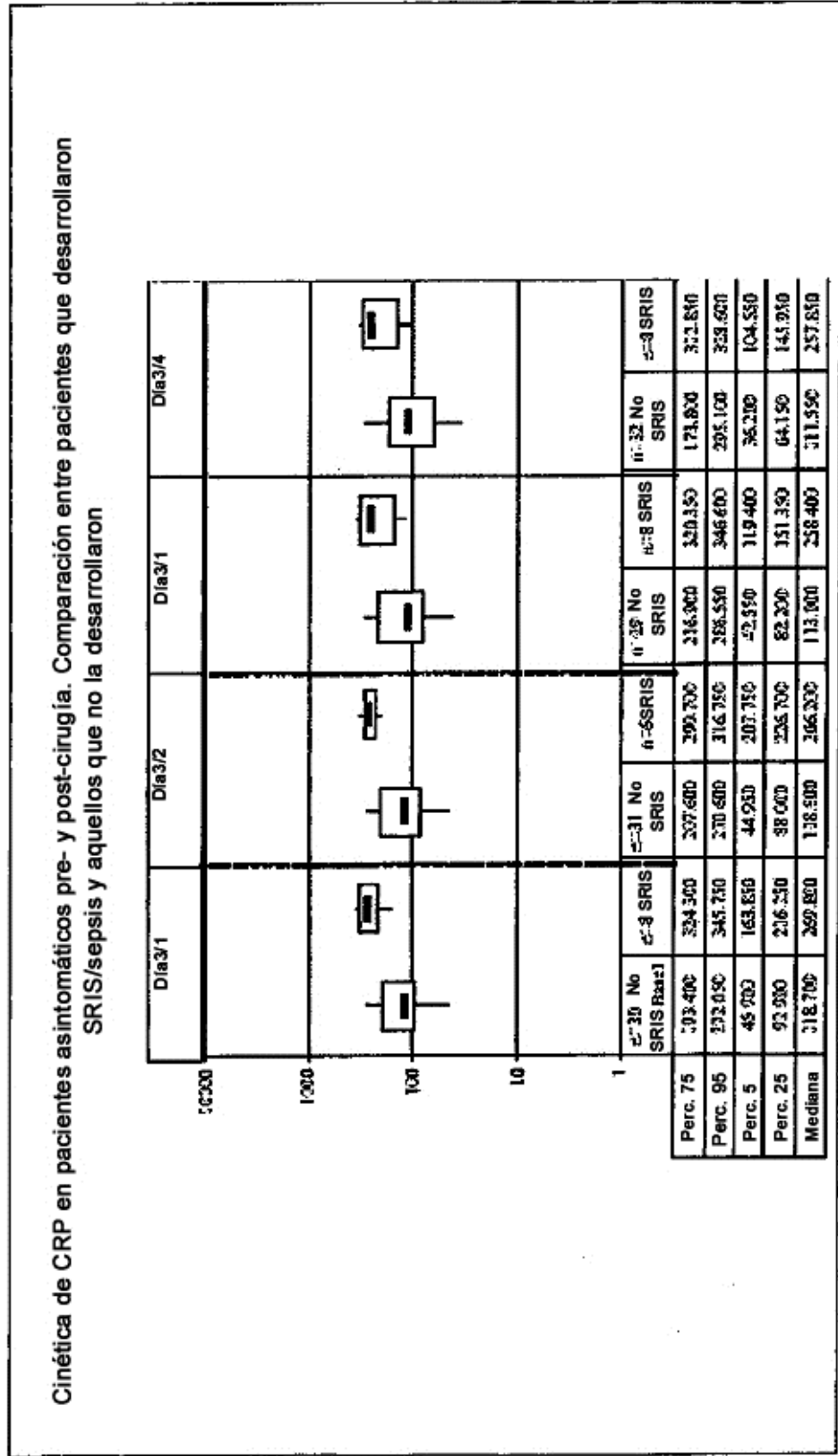


Figura 4 continuación

Niveles de CRP

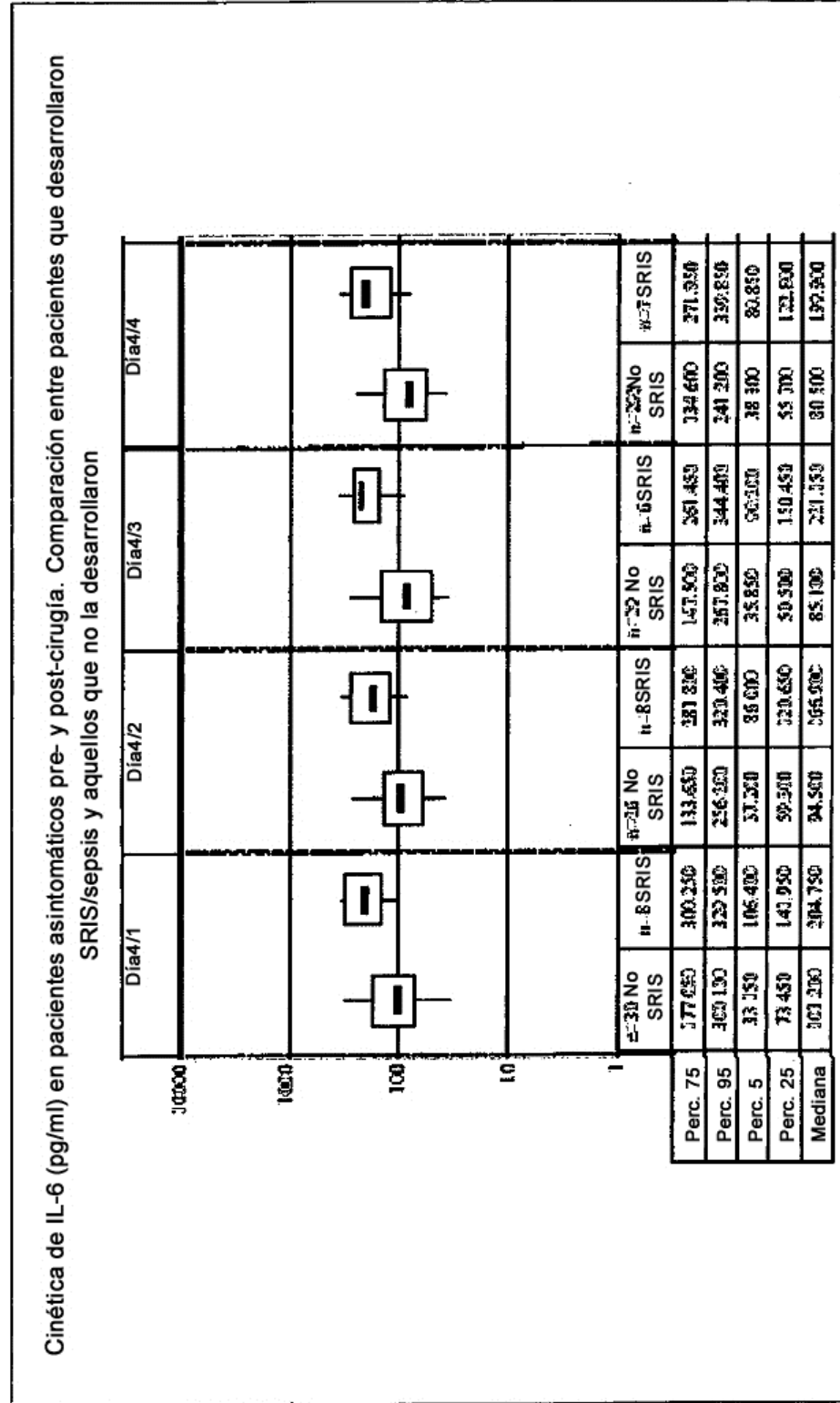
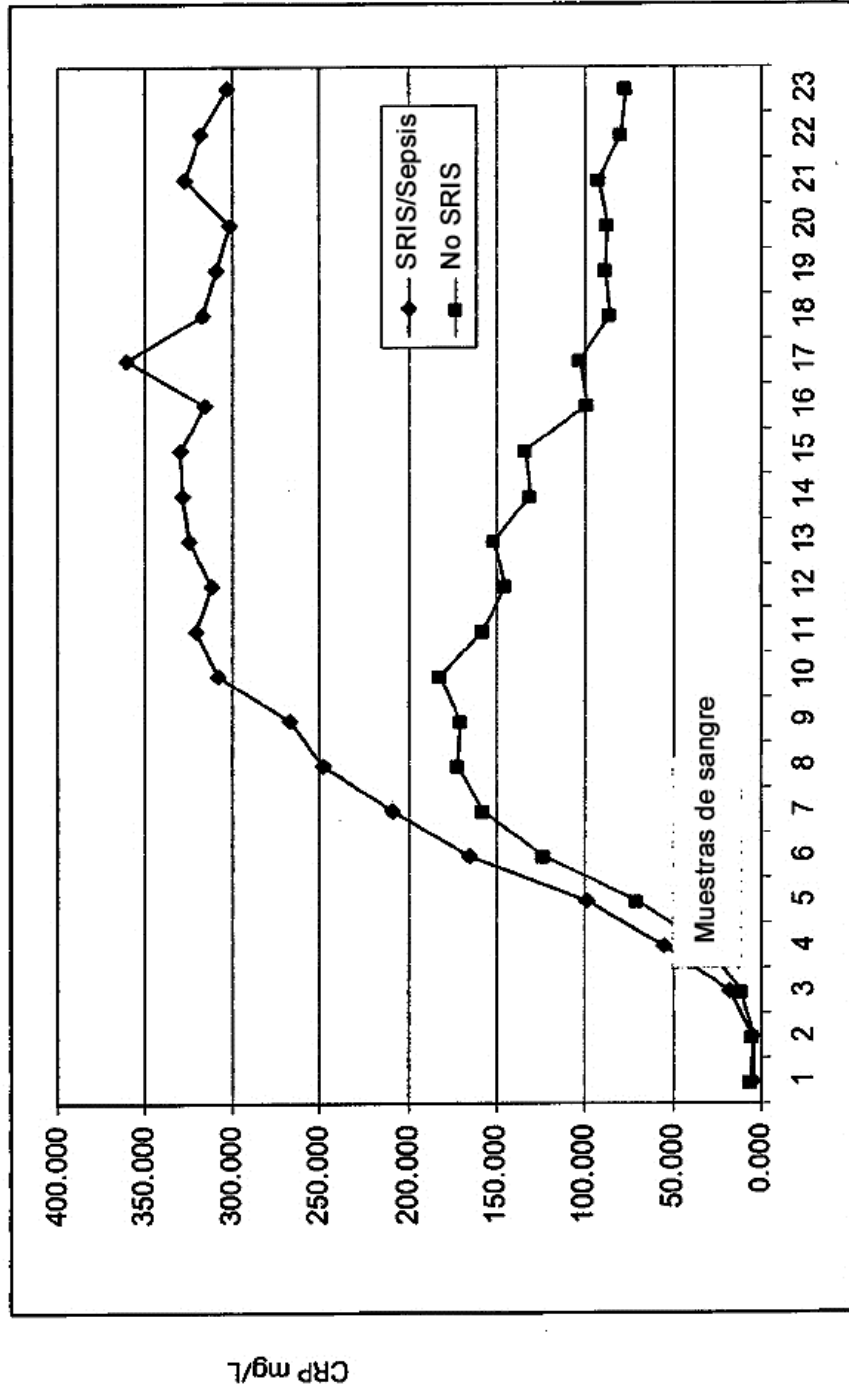


Figura 5



Muestras de sangre

Figura 5 continuación

