

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 732**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2012 PCT/FR2012/050172**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12101387**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2012 E 12706634 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2668293**

54 Título: **Procedimiento y kit para determinar in vitro el estado inmunitario de un individuo**

30 Prioridad:

**27.01.2011 FR 1150646**

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

**25.09.2017**

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (50.0%)  
Chemin de l'Orme  
69280 Marcy L'etoile, FR y  
HOSPICES CIVILS DE LYON (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DAVIN, FANNY;  
LEPAPE, ALAIN;  
MONNERET, GUILLAUME y  
FRAGER, FLORENCE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 633 732 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

Procedimiento y kit para determinar *in vitro* el estado inmunitario de un individuo

5 La presente invención se refiere a un procedimiento y a un kit para determinar *in vitro* el estado inmunitario de un individuo.

10 Los síndromes sépticos representan una de las primeras causas de mortalidad en los servicios de reanimación. Pueden resultar de una infección bacteriana, viral, micótica o parasitaria. Entre los síndromes sépticos, se distinguen, por orden creciente de gravedad, el SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), la sepsis, la sepsis severa y el choque séptico.

15 \* el SIRS es una respuesta sistémica inflamatoria desencadenada por una variedad de causas infecciosas o no. Entre los estados de SIRS desencadenados por causas no infecciosas, se pueden citar los estados traumáticos, las quemaduras, las pancreatitis, los síndromes respiratorios agudos. Una respuesta sistémica inflamatoria se manifiesta por al menos dos de los síntomas siguientes: a) temperatura superior a 38°C o inferior a 36°C; b) ritmo cardiaco superior a 90 latidos por minutos; c) ritmo respiratorio superior a 20 respiraciones por minuto; d) número de leucocitos superior a 12000/mm<sup>3</sup> o inferior a 4000/mm<sup>3</sup>,

20 \* la sepsis es un síndrome de respuesta sistémica inflamatoria en relación con una infección,

\* una sepsis severa es una sepsis asociada a una hipotensión arterial y/o hipoperfusión y/o mal funcionamiento de al menos un órgano,

25 \* el choque séptico es una sepsis severa asociada a una hipotensión persistente y que puede ser calificado por:

\* la presencia de un sitio infeccioso identificado,

30 \* una hipotensión persistente a pesar de los rellenos adecuados y de los tratamientos vasopresores.

De manera general, los síntomas de una sepsis, de una sepsis severa y de un choque séptico son similares, y la diferencia entre estas tres situaciones reside principalmente en la importancia de la perturbación de todas las funciones vitales.

35 Los síndromes sépticos han sido considerados durante mucho tiempo únicamente como una respuesta inflamatoria no regulada que conduce, en respuesta a una diseminación bacteriana inicial, a un fallo multivisceral del organismo. Sin embargo, los fracasos de los enfoques terapéuticos, principalmente antiinflamatorios, experimentados durante estos últimos años, así como la incapacidad para caracterizar la fuerte heterogeneidad de los pacientes sépticos han contribuido a cuestionar la visión esencialmente pro-inflamatoria de la fisiopatología de los síndromes sépticos.

40 Actualmente, la respuesta inmunitaria durante el choque séptico está más bien descrita en dos fases sucesivas. Después de una breve fase inicial muy inflamatoria, responsable de la sintomatología del choque propiamente dicho, se establece un estado de depresión inmunitaria inducido por los mecanismos inmunosupresores encargados de controlar la respuesta proinflamatoria. Así, este componente antiinflamatorio de la reacción a la infección, inicialmente percibido como puramente compensador, se manifiesta predominante en la mayoría de los enfermos y se acompaña de una inmunosupresión y de una hiporreactividad celular marcada. Además, parece que la mortalidad ocurre principalmente separada del choque (o del fallo de órgano inicial) en un contexto en el que todos los pacientes presentan unos síntomas biológicos de inmunodepresión. En consecuencia, dos causas de mortalidad estarían presentes durante el choque séptico, que implican unas terapias diferentes. La prevención de la mortalidad inicial debida a las disfunciones orgánicas debe ser implementada lo más precozmente posible después del diagnóstico y constituye también actualmente la prioridad terapéutica en los servicios de reanimación. La prevención de la mortalidad tardía, potencialmente debido al estado de reprogramación leucocitaria, podría necesitar unas terapias pro-inflamatorias que permitan estimular el sistema inmunitario.

55 Tener en cuenta de la heterogeneidad de los pacientes sépticos se vuelve por lo tanto cada vez más imprescindible para la selección de una población homogénea durante ensayos clínicos, pero también durante la implementación de terapias cada vez más personalizadas. Esto es aún más importante ya que algunas terapias propuestas desarrollan unos efectos totalmente opuestos sobre la respuesta inmunitaria y pueden por lo tanto ser perjudiciales para los pacientes si éstos no presentan el estado inmuno-inflamatorio adecuado para la elección terapéutica. Por lo tanto, es importante disponer de un procedimiento y de un kit que permitan establecer el estado inmunitario global del paciente de manera fiable cuando entra en el servicio de urgencia o de reanimación y que permitan también definir el nivel de desregulación de cada uno de los componentes de la respuesta inmuno-inflamatoria para la implementación de la terapia mejor determinada en función de la respuesta inmunitaria establecida (innata y/o adaptativa). El procedimiento y el kit antes citados son también utilizables para seguir la evolución del estado inmunitario del paciente en respuesta a un tratamiento terapéutico.

La solicitud FR 2 855 832 A2 se propone establecer un diagnóstico y/o pronóstico de un síndrome séptico a partir de la expresión de al menos dos genes seleccionados entre varios genes dianas. Sin embargo, esta solicitud no describe la determinación del estado inmunitario de un individuo.

5 La invención tiene por lo tanto por objeto un procedimiento para determinar *in vitro* el estado inmunitario de un individuo según el cual:

10 a. se dispone de una muestra sanguínea del individuo,

b. se dispone de al menos dos reactivos específicos de al menos dos productos de expresión de al menos dos genes dianas respectivamente seleccionados en al menos una de las familias de genes identificadas a continuación o respectivamente seleccionadas en dos familias de genes diferentes, seleccionadas entre las identificadas a continuación:

15 - la familia de los marcadores expresados en la superficie de las células circulantes,

- la familia de las alarminas,

20 - la familia de las moléculas reguladoras, activadoras o inhibidoras, de las vías de señalización inflamatorias intracelulares,

- la familia de los factores de transcripción,

25 - la familia de los marcadores solubles pro-inflamatorios,

- la familia de los marcadores solubles anti-inflamatorios,

30 - la familia de las moléculas con actividad anti-infecciosa,

- la familia de las quimioquinas,

- la familia de las moléculas del ciclo celular, y

35 - la familia de las moléculas del metabolismo,

c. se determina la expresión de dichos al menos dos genes dianas,

40 d. se compara la expresión de dichos al menos dos genes dianas respectivamente con una expresión de referencia, siendo una modificación en la expresión de dichos al menos dos genes dianas con respecto a su expresión de referencia un indicador de una modificación del estado inmunitario del individuo y siendo una correlación entre la expresión de dichos al menos dos genes dianas con su expresión de referencia un indicador de una normalidad del estado inmunitario del individuo.

45 En modos de realización particulares de la invención, en la etapa b. se dispone:

- o bien de al menos tres reactivos específicos de al menos tres productos de expresión de al menos tres genes dianas respectivamente seleccionados en tres familias de genes diferentes seleccionadas entre las identificadas anteriormente,

50 - o bien al menos cuatro reactivos específicos de al menos cuatro productos de expresión de al menos cuatro genes dianas respectivamente seleccionados en cuatro familias de genes diferentes seleccionadas entre las familias de genes identificadas anteriormente,

55 - o bien al menos cinco reactivos específicos de al menos cinco productos de expresión de cinco genes dianas respectivamente seleccionados en las diez familias de genes diferentes seleccionadas entre las identificadas anteriormente.

Los genes dianas preferidos son los identificados a continuación:

60 Los clústers de diferenciación (CD) y los complejos mayores de histocompatibilidad de clase II, tales como HLA-DR, en particular HLA-DR alfa, y otros clústers de diferenciación que pertenecen a la familia de los marcadores celulares, S100A9 y S100A8 que pertenecen a la familia de las alarminas, ABIN-3 (TNFAIP3 interacting protein 3), IRAK-M (Interleukin-1 receptor-associated kinase 3) y LY64 (también denominado CD180) que pertenecen a la familia de las moléculas reguladoras de los receptores membranaarios o solubles,

65

CIITA, que pertenece a la familia de los factores de transcripción, TNF, en particular TNF-alfa, COX-2 (también denominado PTGS2), FCN1 y MMP7 que pertenecen a la familia de los marcadores solubles pro-inflamatorios,

5 IL-10 que pertenece a la familia de los marcadores solubles anti-inflamatorios,

GBP-1 que pertenece a la familia de las moléculas con actividad anti-infecciosa,

CXCL-1, CXCL-5, CXCL-7 y CXCL-10 que pertenecen a la familia de las quimioquinas,

10 RHOA que pertenece a la familia de las moléculas del ciclo celular,

y PID1 que pertenece a la familia de las moléculas del metabolismo.

15 Se señala que LY64 (también denominado CD180) tiene un papel regulador y por lo tanto está clasificado en la familia de las moléculas reguladoras, pero es también un receptor de superficie celular.

20 En un modo de realización del procedimiento de la invención, la muestra sanguínea es una muestra extraída en un individuo que tiene un tratamiento inmunomodulador. El término inmunomodulador se definirá más en detalle en el párrafo "definiciones".

El procedimiento de la invención puede también comprender una etapa suplementaria según la cual en la etapa a. se extraen las células mononucleadas de la sangre periférica (PBMCs) de la muestra sanguínea y se realizan las etapas subsiguientes b. a d. en las que dichas células mononucleadas sanguíneas, como se ha descrito anteriormente.

25 Los reactivos específicos de los productos de expresión de los genes dianas descritos anteriormente comprenden:

- o bien al menos un cebador de amplificación específico de dichos genes dianas,

30 - o bien al menos una sonda de hibridación específica de dichos genes dianas,

- o bien al menos un anticuerpo.

35 La invención tiene también por objeto un kit para determinar *in vitro* el estado inmunitario de un individuo que comprende al menos dos reactivos específicos de al menos dos productos de expresión de al menos dos genes dianas respectivamente seleccionados en al menos una de las familias de genes identificadas a continuación o respectivamente seleccionados en dos familias de genes diferentes seleccionadas entre las identificadas a continuación:

40 - la familia de los marcadores expresados en la superficie de las células circulantes,

- la familia de las alarminas,

45 - la familia de las moléculas reguladoras, activadoras o inhibidoras, de las vías de señalización inflamatorias intracelulares,

- la familia de los factores de transcripción,

50 - la familia de los marcadores solubles pro-inflamatorios,

- la familia de los marcadores solubles anti-inflamatorios,

- la familia de las moléculas con actividad anti-infecciosa,

55 - la familia de las quimioquinas,

- la familia de las moléculas del ciclo celular, y

- la familia de las moléculas del metabolismo.

60 En modos de realización particulares de la invención, el kit comprende:

- o bien al menos tres reactivos específicos de al menos tres productos de expresión de tres genes dianas que pertenecen respectivamente a tres familias de genes dianas diferentes, que responden a las definiciones anteriores,

65 - o bien al menos cuatro reactivos específicos de al menos cuatro productos de expresión de cuatro genes dianas

que pertenecen respectivamente a cuatro familias de genes dianas diferentes tales como se han definido anteriormente,

5 - o bien al menos cinco reactivos específicos de al menos cinco productos de expresión de cinco genes dianas que pertenecen respectivamente a cinco familias de genes dianas diferentes tales como se han definido anteriormente.

Los genes dianas preferidos son los identificados anteriormente, a saber:

10 HLA-DR, en particular HLA-DR alfa, y CD que pertenecen a la familia de los marcadores celulares, S100A9 y S100A8 que pertenecen a la familia de las alarminas, ABIN-3 y IRAK-M y LY64 (también denominado CD180) que pertenecen a la familia de las moléculas reguladoras de los receptores membranaarios o solubles,

15 CIITA que pertenece a la familia de los factores de transcripción, TNF, en particular TNF-alfa, COX-2 (también denominado PTGS2), FCN1 y MMP7 que pertenecen a la familia de los marcadores solubles pro-inflamatorios,

IL-10 que pertenece a la familia de los marcadores solubles anti-inflamatorios,

20 GBP-1 que pertenece a la familia de las moléculas con actividad anti-infecciosa,

CXCL-1, CXCL-5, CXCL-7 y CXCL-10 que pertenecen a la familia de las quimioquinas,

RHOA que pertenece a la familia de las moléculas del ciclo celular,

25 y PID1 que pertenece a la familia de las moléculas del metabolismo.

Como se ha precisado anteriormente, los reactivos específicos de los productos de expresión de los genes dianas comprenden:

30 - o bien al menos un cebador de amplificación específica de dichos genes dianas,

- o bien al menos una sonda de hibridación específica de dichos genes dianas,

35 - o bien al menos un anticuerpo.

La invención tiene también por objeto la utilización de al menos dos reactivos específicos de al menos dos productos de expresión de al menos dos genes dianas respectivamente seleccionados en al menos una de las familias de genes siguientes o respectivamente seleccionados en dos de las familias de genes siguientes:

40 - la familia de los marcadores expresados en la superficie de las células circulantes,

- la familia de las alarminas,

45 - la familia de las moléculas reguladoras, activadoras o inhibidoras, de las vías de señalización inflamatorias intracelulares,

- la familia de los factores de transcripción,

50 - la familia de los marcadores solubles pro-inflamatorios,

- la familia de los marcadores solubles anti-inflamatorios,

- la familia de las moléculas con actividad anti-infecciosa,

55 - la familia de las quimioquinas,

- la familia de las moléculas del ciclo celular, y

- la familia de las moléculas del metabolismo.

60 En modos de realización particulares de la invención, se utiliza:

- o bien al menos tres reactivos específicos de al menos tres productos de expresión de tres genes dianas que pertenecen respectivamente a tres familias de genes dianas diferentes, que responden a las definiciones anteriores,

65 - o bien al menos cuatro reactivos específicos de al menos cuatro productos de expresión de cuatro genes dianas

que pertenecen respectivamente a cuatro familias de genes dianas diferentes tales como se han definido anteriormente,

5 - o bien al menos cinco reactivos específicos de al menos cinco productos de expresión de cinco genes dianas que pertenecen respectivamente a las cinco familias de genes diferentes definidas anteriormente.

Los genes dianas preferidos y los reactivos específicos responden respectivamente a las definiciones dadas anteriormente para el procedimiento o el kit de la invención.

10 Definiciones

Muestra de sangre o muestra sanguínea significa indiferentemente la sangre entera, el suero o el plasma.

15 Se entiende por producto de expresión de un gen específico diana, el ARN mensajero o un fragmento de ARNm, el ADNc o un fragmento de ADNc, una proteína o un fragmento de proteína.

20 Se entiende por reactivo específico, un reactivo que reacciona con un material biológico de la muestra de sangre o unas células mononucleadas de la sangre periférica (PBMCs) a fin de poner en evidencia, de manera directa o indirecta, la expresión de un gen diana, que puede ser determinado por el análisis de los ARNm procedentes de este gen, o por el análisis de la proteína codificada por este gen.

25 A título indicativo, cuando se desea determinar la expresión de un gen diana por el análisis de la proteína codificada por este gen, este reactivo específico comprende al menos un anticuerpo específico de la proteína codificada por este gen diana.

30 A título indicativo, cuando se desea determinar la expresión de un gen diana por el análisis de los ARNm transcritos a partir de este gen, este reactivo específico comprende al menos un cebador de amplificación específica del ADN complementario de este ARNm (se habla entonces de cebador de amplificación específica de un gen diana). El ADN complementario de un ARNm se puede obtener según un protocolo bien conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se extraen los ARN totales (que comprenden los ARN ribosomales, los ARN de transferencia, los ARNm) de la muestra sanguínea o de PBMCs. Se realiza después una reacción de transcripción inversa con la ayuda de una enzima transcriptasa inversa que permite obtener, a partir de un fragmento de ARN, un fragmento complementario de ADN (ADNc). La realización de tal etapa es bien conocida por el experto en la materia. Cuando se desea obtener más particularmente de manera única los ADN complementarios de los ARN mensajeros, se realiza esta etapa enzimática en presencia de fragmentos nucleotídicos que comprenden únicamente unas bases timina (polyT), que se hibridan por complementariedad sobre la secuencia polyA de los diferentes ARNm con el fin de formar un complejo polyT-polyA que sirve entonces de punto de partida para la reacción de transcripción inversa realizada por la enzima transcriptasa inversa. Se obtienen entonces diferentes ADN complementarios de los diferentes ARN mensajeros inicialmente presentes en la muestra sanguínea o en los PBMCs. A continuación en la descripción, se designa por ADNc, un ADN complementario de un ARN mensajero.

45 Por cebador de amplificación, se entiende un fragmento nucleotídico que comprende de 5 a 100 unidades nucleotídicas, preferiblemente de 15 a 25 unidades nucleotídicas y que posee una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para la iniciación de una polimerización enzimática, por ejemplo en una reacción de amplificación enzimática.

50 Por reacción de amplificación enzimática, se entiende un proceso que genera múltiples copias de un fragmento nucleotídico diana con la ayuda de cebadores de amplificación específicas por la acción de al menos una enzima. Tales reacciones de amplificación son bien conocidas por el experto en la materia y se puede citar en particular las técnicas siguientes: PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction), RCR (Repair Chain Reaction), 3SR (Self Sustained Sequence Replication) con la solicitud de patente WO-A-90/06995, NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), y TMA (Transcription Mediated Amplification) con la patente US-A-5,399,491.

55 Se habla entonces de amplicones para designar los polinucleótidos generados por una técnica de amplificación enzimática. Preferiblemente, cuando la amplificación enzimática es una PCR, el reactivo específico comprende al menos 2 cebadores de amplificación específicos a fin de amplificar una región particular del ADN complementario del ARNm procedente del gen diana. Cuando la amplificación enzimática es una PCR realizada después de una reacción de transcripción inversa, se habla de RT-PCR.

60 Por sonda de hibridación, se entiende un fragmento nucleotídico que comprende de 5 a 100 unidades nucleotídicas, en particular de 6 a 35 unidades nucleotídicas, que poseen una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para formar un complejo de hibridación con un fragmento nucleotídico diana. En la presente invención, el fragmento nucleotídico diana puede ser una secuencia nucleotídica comprendida en un ARN mensajero o una secuencia nucleotídica comprendida en un ADN complementario obtenido por transcripción inversa de dicho ARN mensajero.

65

Por hibridación, se entiende el proceso durante el cual, en condiciones apropiadas, dos fragmentos nucleotídicos, tales como por ejemplo una sonda de hibridación y un fragmento nucleotídico diana, que tiene unas secuencias suficientemente complementarias son susceptibles de formar una doble hebra con unas uniones hidrógenos estables y específicos. Un fragmento nucleotídico "capaz de hibridarse" con un polinucleótido es un fragmento que puede hibridarse con dicho polinucleótido en condiciones de hibridación que pueden ser determinadas en cada caso de manera conocida. Las condiciones de hibridación son determinadas por la rigurosidad, es decir el rigor de las condiciones de realización. La hibridación es aún más específica a medida que se efectúa a mayor rigurosidad. La rigurosidad se define en particular en función de la composición en base de un dúplex sonda/diana, así como por el grado de desajuste entre dos ácidos nucleicos. La rigurosidad puede también depender de los parámetros de la reacción, tales como la concentración y el tipo de especies iónicas presentes en la solución de hibridación, la naturaleza y la concentración de agentes desnaturalizantes y/o la temperatura de hibridación. La rigurosidad de las condiciones en las que una reacción de hibridación debe ser realizada dependerá principalmente de las sondas de hibridación utilizadas. Todos estos datos son por supuesto conocidos y las condiciones apropiadas pueden ser determinadas por el experto en la materia. En general, según la longitud de las sondas de hibridación utilizadas, la temperatura para la reacción de hibridación está comprendida entre aproximadamente 20 y 70°C, en particular entre 35 y 65°C en una solución salina a una concentración de aproximadamente 0,5 a 1 M. Se realiza después una etapa de detección de la reacción de hibridación.

Por detección, se entiende o bien una detección directa por un método físico, o bien un método de detección con la ayuda de un marcador. Numerosos métodos de detección existen para la detección de los ácidos nucleicos [1, 2].

Por marcador, se entiende un trazador capaz de generar una señal. Una lista no limitativa de estos trazadores comprende las enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo por colimetría, fluorescencia o luminescencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la  $\beta$ -galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminescentes o colorantes; los grupos de densidad electrónica detectables por microscopía electrónica o por sus propiedades eléctricas como la conductividad, por los métodos de amperometría o de voltametría, o por mediciones de impedancia; los grupos detectables por métodos ópticos como la difracción, la resonancia plasmón de superficie, la variación de ángulo de contacto o mediante unos métodos físicos como la espectroscopía de fuerza atómica, el efecto túnel, etc.; las moléculas radioactivas como  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^{125}\text{I}$ . Así, el polinucleótido puede ser marcado durante la etapa de amplificación enzimática, por ejemplo utilizando un nucleótido trifosfato marcado para la reacción de amplificación. El nucleótido marcado será un desoxirribonucleótido en los sistemas de amplificación que generan un ADN, como la PCR, o un ribonucleótido en las técnicas de amplificación que generan un ARN, como las técnicas TMA o NASBA. El polinucleótido puede también ser marcado después de la etapa de amplificación, por ejemplo hibridando una sonda marcada según la técnica de hibridación sándwich descrita en el documento WO-A-91/19812.

En el sentido de la presente invención, la sonda de hibridación puede ser una sonda denominada de captura. En este caso, el fragmento nucleotídico diana puede ser previamente marcado mediante un marcador. La sonda denominada de captura está inmovilizada o puede ser inmovilizada sobre un soporte sólido mediante cualquier medio apropiado, es decir directa o indirectamente, por ejemplo por covalencia o adsorción. Se realiza entonces una reacción de hibridación entre dicha sonda de detección y el fragmento nucleotídico diana marcado.

La sonda de hibridación puede también ser una sonda denominada de detección. En este caso, la sonda de hibridación puede ser marcada mediante un marcador. Se realiza entonces una reacción de hibridación entre dicha sonda de captura y el fragmento nucleotídico diana.

Ya se use una sonda denominada de captura o una sonda denominada de detección, la reacción de hibridación puede ser realizada en un soporte sólido que incluye todos los materiales sobre los cuales se puede inmovilizar un ácido nucleico. Como soporte sólido se pueden utilizar unos materiales de síntesis o unos materiales naturales, eventualmente modificados químicamente, en particular los polisacáridos tales como los materiales a base de celulosa, por ejemplo papel, derivados de celulosa tales como el acetato de celulosa y la nitrocelulosa o el dextrano, unos polímeros, unos copolímeros, en particular a base de monómeros de tipo estireno, unas fibras naturales tales como el algodón, y unas fibras sintéticas tales como el nylon; unos materiales minerales tales como la sílice, el cuarzo, vidrios, cerámicas; látex; partículas magnéticas; derivados metálicos, geles, etc. El soporte sólido puede estar en forma de una placa de microtitulación, de una membrana como se describe en la solicitud WO-A-94/12670, de una partícula o de un biochip.

En la presente invención, la determinación de la expresión de un gen diana se puede analizar por la expresión de los ARNm que se transcriben en un tiempo dado. En este caso, el material biológico es un ácido nucleico, y el reactivo específico puede ser indiferentemente un cebador de amplificación o una sonda de hibridación tales como se han definido anteriormente.

Se puede determinar la expresión de un gen diana de la siguiente manera:

1) después de extraer los ARN totales de una muestra sanguínea o de PBMCs, se realiza una etapa de transcripción inversa, tal como se ha descrito anteriormente a fin de obtener los diferentes ADN complementarios de los diferentes

ARN mensajeros inicialmente presentes en la muestra sanguínea o en los PBMCs (o ADNc),

2) se amplifican específicamente los ADNc. En este caso, el reactivo específico utilizado comprende al menos un cebador de amplificación específica del gen diana, tal como se ha definido anteriormente. Esta etapa se puede realizar en particular mediante una reacción de amplificación de tipo PCR o mediante cualquier otra técnica de amplificación apropiada,

3) se determina la expresión del gen diana cuantificando los ADNc. Los ADNc pueden ser cuantificados en particular por la utilización de un intervalo de cuantificación obtenida por una reacción de amplificación llevada a cabo hasta saturación. A fin de tener en cuenta la variabilidad de eficacia enzimática que puede observarse durante diferentes etapas (transcripción inversa, PCR cuantitativa, etc.), se puede normalizar la expresión del gen diana de los diferentes grupos de pacientes, mediante la determinación simultánea de la expresión de un gen denominado doméstico, cuya expresión es similar en los diferentes grupos de pacientes. Realizando una relación entre la expresión del gen diana y la expresión del gen doméstico, se corrige así cualquier variabilidad entre los diferentes experimentos. El experto en la materia podrá referirse en particular a las publicaciones siguientes: [3-4] Bustin SA *Journal of molecular endocrinology*, 2002, 29: 23-39; Giulietti A *Methods*, 2001, 25: 386-401.

Se puede también determinar la expresión d'un gen diana de la siguiente manera:

1) después de extraer los ARN totales de una muestra sanguínea o de PBMCs, se realiza una etapa de transcripción inversa, tal como se ha descrito anteriormente, a fin de obtener los diferentes ADN complementarios de los diferentes ARN mensajeros inicialmente presentes en la muestra o los PBMCs (o ADNc)

2) se inmovilizan los ADNc sobre una membrana

3) se determina la expresión del gen diana hibridando los ADNc a unas sondas de hibridación específicas del gen diana previamente marcadas. Tales técnicas de hibridación son bien conocidas por el experto en la materia, y se puede citar en particular la técnica de transferencia Northern. Esta reacción de hibridación se puede realizar después de una etapa de amplificación específica de los ADN complementarios de los ARN mensajeros de un gen diana cuando en particular el gen está débilmente expresado.

La expresión de un gen diana se puede realizar también por la expresión de las proteínas codificadas por el gen diana. En este caso, el material biológico es una proteína y se pueden utilizar varias técnicas de detección con o sin ligando. La espectrometría de masa se puede utilizar como técnica de detección sin ligando. El reactivo específico puede ser un anticuerpo específico de la proteína codificada por el gen diana para un sistema de detección con ligando.

Los anticuerpos recombinantes, específicos de la proteína traducida del gen diana se pueden obtener según procedimientos clásicos conocidos por el experto en la materia, a partir de organismos procariotas, tales como bacterias, o a partir de organismos eucariotas, tales como levaduras, células de mamíferos, de plantas, de insectos o de animales, o mediante sistemas de producción extra-celular.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados según las técnicas clásicas conocidas por el experto en la materia tales como la técnica de los hibridomas cuyo principio general se recuerda a continuación.

En un primer tiempo, se inmuniza un animal, generalmente un ratón, (o unas células en cultivo en el ámbito de inmunizaciones *in vitro*) con un antígeno diana de interés, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra dicho antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos son después fusionados con unas células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a unos hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente al antígeno de interés podrán ser ensayadas por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados son después purificados en particular según la técnica de cromatografía de afinidad.

Se pueden obtener unos fragmentos de anticuerpos por ejemplo por proteólisis. Así, pueden ser obtenidos por digestión enzimática, resultando en fragmentos de tipo Fab (tratamiento con papaína [5] o de tipo F(ab)'2 (tratamiento con pepsina; [6]. Pueden también ser preparados por vía recombinante [7]. Otro fragmento de anticuerpo que conviene a los fines de la invención comprende un fragmento Fv que es un dímero constituido de la asociación no covalente del dominio variable ligero (VL) y del dominio variable pesado (VH) del fragmento Fab, por lo tanto la asociación de dos cadenas polipeptídicas. A fin de mejorar la estabilidad del fragmento Fv debido a la separación de dos cadenas polipeptídicas, este fragmento Fv puede ser modificado por ingeniería genética insertando un enlace peptídico adaptado entre el dominio VL y el dominio VH [8]. Se habla entonces de fragmento scFv ("single chain Fragment variable") ya que está constituido de una sola cadena polipeptídica. La utilización de un enlace peptídico compuesto preferiblemente de 15 a 25 aminoácidos permite unir el extremo C-terminal de un



dominio al extremo N-terminal del otro dominio, constituyendo así una molécula monomérica dotada de propiedades de unión similares a las del anticuerpo en su forma completa. Las dos orientaciones de los dominios VL y VH convienen (VL-enlace-VH y VH-enlace-VL) ya que presentan propiedades funcionales idénticas. Por supuesto, cualquier fragmento conocido por el experto en la materia y que presenta las características inmunológicas definidas anteriormente convienen a los fines de la invención.

Cuando el material biológico es una proteína procedente de la expresión de un gen, se puede determinar la expresión de este último, detectando y/o cuantificando dicha proteína por transferencia western o ELISA, o cualquier otro método conocido por el experto en la materia, tal como un método de quimioluminiscencia a partir del material biológico.

La técnica ELISA ("Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay") es una determinación inmunoenzimática sobre soporte sólido. Este ensayo entra en el ámbito más general de EIA ("Enzyme Immunoassays") en el que la determinación está acoplada a una reacción catalizada por una enzima. La técnica utiliza uno o dos anticuerpos. El anticuerpo de detección de la formación de complejos inmunes (antígeno/anticuerpo) está acoplado a la enzima y puede generar la emisión de una señal por un sustrato cromógeno o fluorógeno.

La técnica de transferencia western es un ensayo para detectar una proteína específica en una muestra con la ayuda de un anticuerpo específico de esta proteína que comprende las etapas siguientes tal como se describen a continuación.

La primera etapa es una electroforesis sobre gel, que permite separar las proteínas de la muestra según su tamaño.

Las proteínas en el gel son entonces transferidas sobre una membrana (nitrocelulosa, PVDF, etc.) por presión o por aplicación de una corriente eléctrica, fijándose las proteínas a la membrana gracias a interacciones hidrófobas e iónicas.

Después de la saturación de los sitios de interacción no específica, un primer anticuerpo, específico de la proteína a estudiar (anticuerpo primario) se incuba con la membrana.

La membrana se aclara después a fin de quitar los anticuerpos primarios no unidos, después se incuba con unos anticuerpos denominados secundarios, que se unirán a los anticuerpos primarios. Este anticuerpo secundario está habitualmente enlazado a una enzima que permite la identificación visual de la proteína estudiada sobre la membrana. La adición de un sustrato marcado de la enzima genera una reacción coloreada que es visible en la membrana.

Por productos inmunomoduladores, se entienden los inmunoestimulantes y los inmunosupresores.

La inmunoestimulación se busca por ejemplo en el caso de inmunosupresión (síndrome séptico), de inmunodeficiencia (SIDA), en el caso de infecciones crónicas y en el caso de cánceres. Las citoquinas pueden ser unas moléculas inmunoestimulantes. El término "citoquinas" designa un grupo heterogéneo de proteínas producidas por las células de la línea blanca. Tienen un papel esencial en la regulación del sistema inmunitario y de la hematopoyesis. Las principales familias de moléculas utilizadas en terapia como inmunoestimulante son:

- la familia de las interleucinas, tales como IL-2, IL-7 e IL-15,

- la familia de los factores de crecimiento, tales como G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) y FLT3-L (Fms-Like Tyrosine kinase 3 ligand),

- la familia de los interferones tales como los interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , etc.),

- la familia de los agonistas Toll,

- la familia de los anticuerpos bloqueantes (anti-IL-10, anti-CTLA4, anti-PD-1, etc.),

- la familia de las transferinas, tales como lactoferina y talactoferina,

- la familia de las moléculas que bloquean la apoptosis, tales como los inhibidores de proteasas, los inhibidores de caspasas, los inhibidores de Fas/FasL, los inductores de Bcl-2.

La inmunosupresión se busca para inhibir o prevenir la actividad del sistema inmunitario. Se utilizan los inmunosupresores para limitar las disfunciones inmunitarias generadas por una respuesta pro-inflamatoria exacerbada en el ámbito de un síndrome séptico, prevenir el rechazo de injerto de órganos y de trasplantado, para tratar unas enfermedades auto-inmunes o unas enfermedades susceptibles de ser de origen auto-inmune. Los inmunosupresores son generalmente repartidos en varias familias:

- la familia de los glucocorticoides,

- la familia de los citoestáticos,

5 - la familia de los anticuerpos bloqueantes (anti-TNF),

- la familia de las moléculas que actúan sobre las inmunofilinas, y

10 - otras moléculas, en particular las citoquinas que pueden ser unas moléculas inmunosupresoras, tales como IL-10, IL-3, TGF- $\beta$ , IL-1 RA.

#### Figuras

15 Figura 1: las figuras 1A y 1B representan respectivamente las concentraciones de TNF- $\alpha$  y de IL-10 producidas por PBMCs, procedentes de 10 voluntarios sanos, estimuladas por LPS. La determinación se ha efectuado por un ensayo ELISA sobre sobrenadantes de cultivo obtenidos a 45 horas. El eje de las ordenadas representa las concentraciones proteicas (pg/ml) de TNF- $\alpha$  (figura 1A), y de IL-10 (figura 1B). Los histogramas negros representan los controles negativos (sin estimulación). Los histogramas blancos corresponden a las células estimuladas una sola vez con 100 ng/ml de LPS y los histogramas grises representan las células sometidas a dos estimulaciones por LPS (2 ng/ml después 100 ng/ml). Los datos se representan en media +/- desviación estándar. Un ensayo con aparato de Wilcoxon se ha realizado para el análisis estadístico de los resultados: \*\* significa que  $p < 0,005$  frente a células estimuladas una vez con LPS.

25 Figura 2: la figura 2 muestra la expresión de los genes de TNF alfa (A), IL-10 (B), HLA-DRA (C), CIITA (D), IRAK-M (E), ABIN-3 (F), LY64 (G), S100A9 (H), S100A8 (I), GBP1 (J), MMP7 (K), CXCL1 (L), CXCL10 (M), COX2 (N), FCN1 (O), TNFAIP6 (P), CXCL7 (Q), CXCL5 (R), PID1 (S) y RHOA (T) por PBMCs, procedentes de 6 voluntarios sanos, estimuladas por LPS y cuantificadas por biochip después de 45 horas. El eje de las ordenadas representa la intensidad de fluorescencia de cada una de las sonda de hibridación: (A) 207113\_s\_at para el TNF alfa; (B) 207433\_at para IL-10; (C) 208894\_at para HLA-DRA; (D) 205101\_at para CIITA; (E) 213817\_at para IRAK-M; (F) 220655\_at para ABIN-3; (G) 206206\_at para LY64; (H) 203535\_at para S100A9; (I) 202917\_s\_at para S100A8; (J) 202269\_x\_at para GBP1; (K) 204259\_art para MMP7; (L) 204470\_at para CXCL1; (M) 204533\_at para CXCL10; (N) 204748\_at para COX2; (O) 205237\_at para FCN1; (P) 206026\_s\_at para TNFAIP6; (Q) 214146\_s\_at para CXCL7; (R) 215101\_s\_at para CXCL5; (S) 219093\_at para PID1 et (T) 223168\_at para RHOA. Los histogramas negros representan los controles negativos (sin estimulación). Los histogramas blancos corresponden a las células estimuladas una sola vez con 100 ng/ml de LPS y los histogramas grises representan las células sometidas a dos estimulaciones por LPS (2 ng/ml después 100 ng/ml). Los datos son representados en media +/- desviación estándar. Un t-ensayo con aparato se ha realizado para el análisis estadístico de los resultados: \* significa que  $p < 0,05$  frente a células estimuladas una vez con LPS.

40 Figura 3: La figura 3 muestra la expresión de los genes de TNF alfa (A), IL-10 (B), HLA-DRA (C), CIITA (D), IRAK-M (E), ABIN-3 (F), LY64 (G), S100A9 (H), S100A8 (I), GBP1 (J), MMP7 (K), CXCL1 (L), CXCL10 (M), COX2 (N), FCN1 (O), TNFAIP6 (P), CXCL7 (Q), CXCL5 (R), PID1 (S) y RHOA (T) por PBMCs, procedentes de 7 voluntarios sanos, estimuladas por LPS y cuantificadas por qRT-PCR después de 45 horas. El eje de las ordenadas representa los porcentajes de inducción de expresión de los genes citados anteriormente. Los histogramas negros representan los controles negativos (sin estimulación). Los histogramas blancos corresponden a las células estimuladas una sola vez con 100 ng/ml de LPS y los histogramas grises representan las células sometidas a dos estimulaciones por LPS (2 ng/ml después 100 ng/ml). Los datos son representados en media +/- desviación estándar. Un ensayo con aparato de Wilcoxon se ha realizado para el análisis estadístico de los resultados: \* significa que  $p < 0,05$  frente a células estimuladas una vez con LPS.

50 Figura 4: la figura 4 representa la expresión de los genes de IL-10 (A), IRAK-M (B), HLA-DRA (C), CIITA (D), TNF- $\alpha$  (E), LY64 (F), GBP1 (G), CXCL1 (H), CXCL10 (I), COX2 (J), FCN1 (K), TNFAIP6 (L), CXCL7 (M), PID1 (N) y RHOA (O) cuantificados por biochip a partir de sangre total de 19 pacientes en choque séptico, al diagnóstico de choque (H0) y 48 horas después (H48) o de sangre de 9 voluntarios sanos. El eje de las ordenadas representa la intensidad de fluorescencia de cada una de las sondas de hibridación: (A) 207433\_at para IL-10; (B) 213817\_at para IRAK-M (C) 208894\_at para HLA-DRA; (D) 205101\_at para CIITA; (E) 207113\_s\_at para TNF- $\alpha$ ; (F) 206206\_at para LY64; (G) 202269\_x\_at para GBP1; (H) 204470\_at para CXCL1; (I) 204533\_at para CXCL10 (J); 204748\_at para COX2 (K); 205237\_at para FCN1 (L); 206026\_s\_at para TNFAIP6 (M); 214146\_s\_at para CXCL7 (N); 219093\_at para PID1 et (O) 223168\_at para RHOA. Los histogramas negros representan los voluntarios sanos, los histogramas blancos corresponden a los pacientes a H0 y los histogramas grises representan los pacientes H48. Los datos se representan en media +/- desviación estándar. La comparación entre los voluntarios sanos y los pacientes se ha efectuado mediante un ensayo de Mann Whitney (\* significa que  $p < 0,05$ ; \*\* significa que  $p < 0,01$  y \*\*\* significa que  $p < 0,001$ ).

65 Figura 5: las figuras 5A y 5B representan respectivamente las concentraciones de TNF- $\alpha$  y de IL-10 producidos por PBMCs, procedentes de 10 voluntarios sanos, estimuladas dos veces por LPS (2 ng/ml después 100 ng/ml) en

presencia o no de inmunoestimulantes. La determinación se ha efectuado por un ensayo ELISA sobre sobrenadantes de cultivo obtenidos después de 45 horas. El eje de las ordenadas representa las concentraciones proteicas (pg/ml) de TNF- $\alpha$  (figura 4A) y de IL-10 (figura 4B). Los histogramas negros representan las células estimuladas dos veces por LPS sin profármaco (control). Los histogramas blancos corresponden a las células estimuladas dos veces por LPS en presencia de IFN- $\gamma$ 1b (Imukin™, Boehringer, Ingelheim, Austria) a 100 ng/ml, los histogramas grises en presencia de 100 ng/ml de GM-CSF (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania) y los histogramas con rayas en presencia de 100 ng/ml de FLT3-L (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania). Los datos son representados en media +/- desviación estándar. Se ha realizado un ensayo con aparato Wicoxon para el análisis estadístico de los resultados corrigiendo por el número de ensayo efectuado: \* significa que p<0,017 frente a células estimuladas dos veces con LPS sin profármaco.

Figura 6: la figura 6 muestra la expresión de los genes de TNF alfa (A), IL-10 (B), HLA-DRA (C), CIITA (D), IRAK-M (E), ABIN-3 (F), LY64 (G), S100A9 (H), S100A8 (I), GBP1 (J), MMP7 (K), CXCL1 (L), CXCL10 (M), COX2 (N), FCN1 (O), TNFAIP6 (P), CXCL7 (Q), CXCL5 (R), PID1 (S) y RHO (T) por PBMCs, procedentes de 7 voluntarios sanos, estimuladas dos veces por LPS (2 ng/ml después 100 ng/ml) en presencia o no de profármacos, y cuantificadas por biochip después de 45 horas. El eje de las ordenadas representa la intensidad de fluorescencia de cada una de las sondas de hibridación: (A) 207113\_s\_at para el TNFa; (B) 207433\_at para IL-10; (C) 208894\_at para HLA-DRA; (D) 205101\_at para CIITA; (E) 213817\_at para IRAK-M; (F) 220655\_at para ABIN-3; (G) 206206\_at para LY64; (H) 203535\_at para S100A9; (I) 202917\_s\_at para S100A8; (J) 202269\_x\_at para GBP1; (K) 204259\_art para MMP7; (L) 204470\_at para CXCL1; (M) 204533\_at para CXCL10; (N) 204748\_at para COX2; (O) 205237\_at para FCN1; (P) 206026\_s\_at para TNFAIP6; (Q) 214146\_s\_at para CXCL7; (R) 215101\_s\_at para CXCL5; (S) 219093\_at para PID1 y (T) 223168\_at para RHO. Los histogramas negros representan las células estimuladas dos veces por LPS sin profármaco (control). Los histogramas blancos corresponden a las células estimuladas dos veces por LPS en presencia de IFN- $\gamma$ 1b a 100 ng/ml, los histogramas grises en presencia de 100 ng/ml de GM-CSF y los histogramas con rayas en presencia de 100 ng/ml de FLT3-L. Los datos son representados en media +/- desviación estándar. Se ha realizado un t-ensayo con aparato para el análisis estadístico de los resultados corrigiendo por el número de ensayo efectuado: \* significa que p<0,05 frente a células estimuladas dos veces con LPS sin inmunoestimulante.

Figura 7: la figura 7 muestra la expresión de los genes de TNFa (A), IL-10 (B), HLA-DRA (C), CIITA (D), IRAK-M (E), ABIN-3 (F), LY64 (G), S100A9 (H), S100A8 (I), GBP1 (J), MMP7 (K), CXCL1 (L), CXCL10 (M), COX2 (N), FCN1 (O), TNFAIP6 (P), CXCL7 (Q), CXCL5 (R), PID1 (S) y RHO (T) por PBMCs, procedentes de 7 voluntarios sanos, estimuladas dos veces por LPS (2 ng/ml después 100 ng/ml) en presencia o no de profármacos, y cuantificadas por qRT-PCR después de 45 horas. El eje de las ordenadas representa los porcentajes de inducción de expresión de los genes citados anteriormente. Los histogramas negros representan las células estimuladas dos veces por LPS sin profármaco (control). Los histogramas blancos corresponden a las células estimuladas dos veces por LPS en presencia de IFN- $\gamma$ 1b a 100 ng/ml, los histogramas grises en presencia de 100 ng/ml de GM-CSF y los histogramas con rayas en presencia de 100 ng/ml de FLT3-L. Los datos son representados en media +/- desviación estándar. Se ha realizado un ensayo con aparato de Wilcoxon para el análisis estadístico de los resultados corrigiendo por el número de ensayo efectuado: \* significa que p<0,05 frente a células estimuladas dos veces con LPS sin inmunoestimulante.

Figura 8: las figuras 8A y 8B representan respectivamente las concentraciones de TNF- $\alpha$  y de IL-10 producidas por células de la sangre total, procedentes de 5 pacientes en choque séptico extraídos entre D1 y D3, y 5 voluntarios sanos, estimuladas o no (control) por LPS a 100 ng/ml +/- 100 ng/ml de IFN- $\gamma$ 1b. Las determinaciones proteicas se han realizado por un ensayo ELISA sobre sobrenadantes de cultivo obtenidos después de 15 horas. El eje de las ordenadas representa las concentraciones proteicas (pg/ml) de TNF- $\alpha$  (figura 6A) y de IL-10 (figura 6B). Los histogramas negros representan los pacientes en choque séptico y los histogramas en blanco representan los voluntarios sanos. Los datos son representados en medio +/- desviación estándar.

Figura 9: La figura 9 representa la expresión de los genes de TNF- $\alpha$  (A), IL-10 (B), HLA-DRA (C), CIITA (D), GBP1 (E), CXCL10 (F), COX2 (G), TNFAIP6 (H) y CXCL5 (I) por unas células de la sangre total, procedentes de 5 pacientes en choque séptico extraídos entre D1 y D3 y 5 voluntarios sanos, estimuladas o no (controles) por LPS a 100 ng/ml +/- 100 ng/ml de IFN- $\gamma$ 1b. La cuantificación de estos genes se ha efectuado por qRT-PCR sobre los residuos celulares obtenidos después de 15 horas. El eje de las ordenadas representa los porcentajes de inducción de expresión de los genes citados anteriormente. Los histogramas negros representan los pacientes en choque séptico y los histogramas en blanco representan los voluntarios sanos.

#### Ejemplos

Los ejemplos siguientes se dan a título ilustrativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permiten comprender mejor la invención.

#### Materiales y métodos

Preparación de PBMCs y parámetros experimentales del modelo de tolerancia a la endotoxina (ET)

Los PBMCs procedentes de diferentes voluntarios sanos se han aislado a partir de sangre extraída en bolsas tratadas con citrato por gradiente de Ficoll (Amersham Biosciences, Björkgatan, Suecia), después lavadas con PBS mientras que los hematíes restantes se han lisado. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a razón de  $2 \cdot 10^6$  células/ml en un medio X-vivo 20 (Lonza, Verviers, Bélgica). A fin de inducir una primera exposición a LPS, los PBMCs se cultivaron en presencia o en ausencia (grupo control) de 2 ng/ml de una mezcla de LPS procedente de *Escherichia coli* O55:B5, O127:B8 y O111:B4 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania) e incubadas una noche (15 horas) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después del lavado, las células se han incubado durante otras 24 horas en presencia o en ausencia (grupo control estimulado o no con LPS) de IFN- $\gamma$ 1b (Imukin TM, Boehringer, Ingelheim, Austria), de GM-CSF o de Flt3-L (Sigma-Aldrich). Finalmente, las células se reestimularon por una segunda dosis de LPS a 100 ng/ml durante 6 horas. Las proteínas TNF- $\alpha$  e IL-10 se determinaron en estos sobrenadantes mientras que la expresión ARNm se cuantificó a partir de los residuos celulares. Para cada condición, los sobrenadantes y los residuos celulares se recuperaron y conservaron a -80°C para la determinación ELISA de las proteínas TNF- $\alpha$  e IL-10 y a -20°C para la extracción ARN y la cuantificación por qRT-PCR.

#### Ensayo funcional por ELISA

La detección de las concentraciones de TNF- $\alpha$  y de IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de PBMCs se realizó mediante los kits ELISA comercializados por la compañía R&D System (Mineapolis, USA).

#### Extracción de ARN

Los ARN totales se extrajeron a partir de PBMCs con la ayuda del kit RNeasy Plus Mini TM (Qiagen, Hilden, Alemania) o a partir de la sangre total utilizando el kit QIAamp RNA Blood Mini TM (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Para cada extracción de ARN, el ADN residual genómico se ha digerido sobre las columnas gDNA Eliminator (Quiagen) TM, después los ARN se eluyeron en 30  $\mu$ l de un tampón de elución. Las concentraciones de ARN se midieron para cada muestra con la ayuda de Qubit TM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme a las instrucciones del fabricante.

#### Análisis por biochip

El análisis de expresión de los genes se ha realizado a partir de 50 ng de ARN amplificado con el kit WT-Ovation RNA Amplification System de Nugen (NuGEN Technologies, Inc., San Carlos, CA, USA). El ARN amplificado se ha hibridado sobre chips Affymetrix<sup>®</sup> HG-U133plus 2.0 según las instrucciones del fabricante (Affymetrix<sup>®</sup>, Santa Clara, CA, USA). El análisis de los datos Affymetrix empieza por la captura de la imagen del biochip por el escáner GeneChip<sup>®</sup> 3000 de Affymetrix. Los datos se han normalizado después por RMA (Robust Multiple – Array Average) (Irizarry RA, Biostatistics 2003). Todos los datos basados en la intensidad de la señal se han utilizado después de la normalización.

#### Síntesis de los ADNc por transcripción inversa (RT) y análisis por PCR cuantitativa (qPCR)

La expresión de los ARN mensajeros (ARNm) se ha cuantificado con la ayuda de la qPCR. Brevemente, los ADNc se han sintetizado a partir de 100 ng de ARN total gracias a una etapa de transcripción inversa utilizando la SuperScript<sup>®</sup> VILO<sup>TM</sup> system (Invitrogen). Las reacciones PCR se realizaron después sobre el aparato LightCycler<sup>®</sup> 480 utilizando o bien el marcador fluorescente, SYBR Green I Master Mix, según las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA), o bien el Probes master mix, según las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA). Para la amplificación, el volumen de reacción era de 20  $\mu$ l, y los ciclos comprendían una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos (1 ciclo), seguido por 45 ciclos de amplificación (20 segundos a 95°C, 15 segundos hibridación a 68-58°C y 15 segundos de extensión a 72°C), una curva de fusión a 95°C 1 segundo, 60°C 10 segundos y 95°C durante 5 minutos, y para terminar un enfriamiento a 40°C durante 30 segundos. Veinte genes se han cuantificado en este estudio: TNF- $\alpha$ , IL-10, HLA-DRA, CIITA, CX3CR1, IRAK-M, ABIN-3, LY64, S100A9, S100A8, GBP1, MMP7, CXCL1, CXCL10, COX2, FCN1, TNFAIP6, CXCL7, CXCL5, PID1 y RHOU. Los cebadores y/o sondas utilizadas se optimizaron por la compañía Search-LC (Search-LC, Heidelberg, Alemania), para el gen doméstico PPIB, que codifica la ciclofilina B y TNF- $\alpha$ , bien por la compañía Applied Biosystems (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) para los genes GBP1 (referencia Hs00977005\_m1), MMP7 (ref.: Hs01042796\_m1), CXCL1 (ref.: Hs00236937\_m1), CXCL10 ref.: Hs00171042\_m1), COX2 (ref.: Hs00153133\_m1), FCN1 (ref.: Hs00157572\_m1), TNFAIP6 (ref.: Hs01113602\_m1), CXCL7 (ref.: Hs00234077\_m1), CXCL5 (ref.: Hs00171085\_m1), PID1 (ref.: Hs00952182\_m1) y RHOU (ref.: Hs00221873\_m1) y para el gen doméstico PPIB (ref.: Hs00165719\_m1), o bien en interno, para los otros genes estudiados (IL-10, HLA-DRA, CIITA, CD180 (LY64), IRAK-M, ABIN-3, S100A9 y S100A8) (véase la tabla a continuación). Varias diluciones de ADNc se prepararon en cuadruplicado para generar las gammas estándares. Los resultados se normalizaron con respecto al gen de referencia (*PPIB*), así como un calibrador interno a fin de minimizar el impacto del manipulador y la eficacia de las diferentes enzimas. Los resultados se expresaron en “fold change” de ratio normalizados y estaban incluidos en el análisis sólo cuando los valores ARNm estaban comprendidos en la gama estándar de cada uno de los genes estudiados.

Tabla

Gen	nº de acceso GenBank	Cebadores		SEQ ID NO
<i>IL-10</i>	NM_000572.2	5'-AATAAGGTTTCTCAAGGGGCT-3'	sentido	1
		5'-AGAACCAAGACCCAGACATCAA-3'	anti-sentido	2
<i>HLA-DRA</i>	NM_019111.4	5'-GCCAACCTGGAATCATGACA-3'	sentido	3
		5'-AGGGCTGTTTCGTGAGCACA-3'	anti-sentido	4
<i>CIITA</i>	NM_000246.3	5'-GCTGGGATTCCTACACAATGC-3'	sentido	5
		5'-CGGGTTCTGAGTAGAGCTCAATCT-3'	anti-sentido	6
<i>IRAK-M</i>	NM_007199.2	5'-TTTGAATGCAGCCAGTCTGA-3'	sentido	7
	NM_001142523.1	5'-GCATTGCTTATGGAGCCAAT-3'	anti-sentido	8
<i>ABIN-3</i>	NM_024873.4	5'-GAATTCAGATAAAAAGCTTGT-3'	sentido	9
	NM_001128843.1	5'-GACAGTCTGGTGGGTGCTC-3'	anti-sentido	10
<i>S100A9</i>	NM_002965.3	5'-TCAAAGAGCTGGTGCAGAAA-3'	sentido	11
		5'-AACTCCTCGAAGCTCAGCTG-3'	anti-sentido	12
<i>S100AB</i>	NM_002964.4	5'-ATTTCCATGCCGTCTACAGG-3'	sentido	13
		5'-CACCAGAATGAGGAAGCTCCT-3'	anti-sentido	14
<i>LY64</i>	NM_005582.2	5'-GCATTGAGAAAGAAGCCAACAA-3'	sentido	15
		5'-GAAAAGTGTCTTCATGTATCC-3'	anti-sentido	16

## Enfoque transcripcional sobre biochip en pacientes en choque séptico

5 Varias muestras de sangre recogidas directamente en tubos PAXgene™ (PreAnalytiX a Qiagen/BD Company) se obtuvieron a partir de 19 pacientes en choque séptico en el momento del diagnóstico de choque (es decir en las 2 horas tras el inicio del tratamiento vasopresor) y 48 horas después, como se ha descrito anteriormente [9]. El ARN total se ha extraído con la ayuda del kit PAXgene Blood RNA kit™ (PreAnalytiX). Una etapa de digestión con DNasa (Qiagen) se ha efectuado durante la extracción a fin de eliminar cualquier traza de ADN. La integridad y la calidad de los ARN se verificaron por electroforesis capilar sobre el bioanalizador 2100 Agilent™ (Agilent). Los biochips se realizaron según las instrucciones del fabricante (Affymetrix®). La reacción de transcripción inversa de los ARNm se ha realizado con el protocolo de Affymetrix a partir de 3 µg de ARN total. Se ha utilizado un cebador oligonucleotídico polyT para determinar únicamente los ARNm contenidos en la solución de los ARN totales durante la transcripción inversa. El conjunto de las etapas se ha realizado con el kit Affymetrix - GeneChip® One-Cycle Target Labeling and Control Reagents. Los productos de la transcripción inversa (ANDc) se utilizaron después para la síntesis del ARNc marcado por la biotina durante 16 horas a 37°C. Después de la etapa de purificación del ARNc para quitar los dNTP no incorporados, los ARNc se cuantificaron y fragmentaron. El control de la fragmentación se realiza por electroforesis capilar (Agilent). La hibridación del ARNc se realiza con el biochip GeneChipHuman Genome U133 Plus 2 antes de la etapa de amplificación de la señal por la incubación con la mezcla SAPE que contiene *Straptavidina Phycoerythrine* después los anticuerpos IgG de cabra anti-estreptavidina mezclados con el anticuerpo biotinilado anti-IgG de cabra. Esta última etapa utiliza la plataforma Fluidic FS450. El análisis de los datos Affymetrix empieza por la captura de la imagen del biochip por el escáner GeneChip® 3000 de Affymetrix. Los datos se normalizaron después por RMA (Robust Multiple -Array Average) (Irizarry RA, Biostatistics 2003). Todos los datos basados en la intensidad de la señal se utilizaron después de la normalización.

## Efecto de IFN-γ en un modelo de sangre total de pacientes en choque séptico

30 La sangre de 5 pacientes en choque séptico se ha recogido en tubo EDTA, entre D1 y D3 según el inicio del choque, así como en 5 voluntarios sanos. Después de la centrifugación y extracción del plasma, se han diluido 3 ml de sangre al ½ en 3 ml de medio RPMI 1640 (Eurobio, Courtaboeuf, Francia) después se cultivaron en presencia o en ausencia (grupo control) de 100 ng/ml de LPS +/- 100 ng/ml de IFN-γ1b (Imukin) durante una noche a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> (15 horas). Para cada condición, los sobrenadantes así como los residuos celulares se recuperaron y conservaron a -80°C para la determinación ELISA de TNF-α y de IL-10 y a -20°C para la extracción ARN y la cuantificación por qRT-PCR, como se ha descrito anteriormente.

## Análisis estadísticas

40 Los resultados son expresados en media ± desviación estándar (SD). El análisis estadístico se ha realizado mediante el ensayo con aparato de Wilcoxon.

## Resultados

## Descripción del modelo de ET

45 Los modelos de ET se caracterizan por una reducción de la producción de TNF-α asociada a un aumento de la secreción de IL-10 tras una segunda estimulación por LPS. La producción de estas citoquinas se midió por lo tanto

en el sobrenadante de cultivo de PBMCs tras una o dos estimulaciones por LPS. Como se muestra en la figura 1A, las células estimuladas dos veces por LPS producen bajas cantidades de TNF- $\alpha$  ( $58,5 \pm 68,3$  pg/ml) comparadas con las células estimuladas únicamente una vez ( $1208 \pm 594$  pg/ml). Por el contrario, como se muestra en la figura 1B, estas mismas células segregan más fuertes concentraciones de IL-10 ( $63,2 \pm 58,2$  pg/ml) en comparación con las células estimuladas una vez ( $8,4 \pm 6,9$  pg/ml). En respuesta a una segunda estimulación endotoxínica, las células ya estimuladas liberan menos TNF- $\alpha$  ( $58,5 \pm 68,3$  pg/ml) que las células estimuladas una sola vez ( $1208 \pm 594$  pg/ml) y producen más IL-10 ( $63,2 \pm 58,2$  frente a  $8,4 \pm 6,9$  pg/ml) que las células estimuladas una vez. Estos resultados son confirmados a nivel ARNm ya que una disminución significativa de la expresión de TNF- $\alpha$  (figura 2A) acoplada con un aumento de la expresión génica de IL-10 (figura 2B) en las células estimuladas dos veces por LPS se han observado en comparación con PBMCs estimuladas una sola vez.

Un análisis de la expresión génica de PBMCs sometidas a una o dos estimulaciones con LPS se ha realizado en biochip Affymetrix. Los genes cuya expresión difiere más entre una o dos estimulaciones con LPS ( $p < 0,05$  y diferencia de expresión  $> 2$ ) así como unos genes conocidos en la bibliografía por estar implicados en este estado refractario de ET o la fase de inmunosupresión inducida por los estados sépticos severos son representados en la figura 2. La segunda estimulación por endotoxina bacteriana está acompañada por un aumento de la expresión de ARNm de IL-10 (B), HLA-DRA (C), CIITA (D), IRAK-M (E), ABIN-3 (F) mientras que la expresión de TNF alfa (A) y de LY64 (G) está disminuida. La expresión génica de las alarminas S100A9 (H) y S100A8 (I), de las quemoquinas CXCL1 (L), CXCL5 (R), et CXCL7 (Q), de MMP7 (K), FCN1 (O), PID1 (S) y RHO (T) aumentan también tras una segunda estimulación con LPS. Finalmente, la expresión de los genes inducidos por el interferón GBP1 (J) y CXCL10 (M) así como de TNFAIP6 (P) disminuye.

Estos datos se han confirmado después por qRT-PCR (figura 3) en el que se ha observado el mismo perfil que aquel obtenido sobre los biochip. En respuesta a un segundo reto endotoxínico, la incapacidad para producir y expresar TNF- $\alpha$  combinada al aumento de la producción y de la expresión de IL-10, de las células que se han previamente expuesto a una primera dosis de LPS, indica claramente el desarrollo de un estado de ET.

#### Análisis de la expresión de los genes en pacientes en choque séptico

A fin de ilustrar la pertinencia clínica del modelo, la expresión de estos genes en pacientes en choque séptico se ha estudiado retrospectivamente, en el momento del diagnóstico del choque y 48 horas más tarde. La expresión de los genes se ha evaluado por un enfoque sobre biochip en una cohorte de 19 pacientes descrita anteriormente [9] y 9 voluntarios sanos. Como se observa en el modelo de ET, los resultados muestran un aumento de la expresión de IL-10, IRAK-M, CXCL7 y RHO (figuras 4A, B, M y O), acoplada con una disminución de la expresión de Ly64, GBP1 y CXCL10 (figuras 4 F, G e I) en los pacientes en choque séptico en el momento del diagnóstico e incluso 48 horas más tarde comparado con los voluntarios sanos. En paralelo, una ligera disminución de la expresión de TNF- $\alpha$  se observa en los pacientes (figura 4E).

En su conjunto, los datos clínicos confirman las modificaciones ARNm observadas *ex vivo* en el modelo de ET y subrayan la pertinencia clínica de este modelo.

#### IFN- $\gamma$ y GM-CSF mejoran significativamente la producción de TNF- $\alpha$ en PBMCs desactivadas por LPS

Como se indica en la figura 1, las PBMCs estimuladas una primera vez con LPS presentan una disminución marcada de su capacidad de producción en TNF- $\alpha$  en respuesta a una segunda exposición a la endotoxina. A continuación, se ha investigado, en 7 experimentos sucesivos, si una incubación de 24 horas en presencia de diferentes profármacos inmunomoduladores (IFN- $\gamma$ , GM-CSF y Flt3-L) podían restaurar esta síntesis en TNF- $\alpha$  y disminuir la de IL-10. IFN- $\gamma$  y GM-CSF alcanzan este objetivo induciendo a un aumento de la producción en TNF- $\alpha$  (figura 5A). Es interesante señalar que los profármacos ensayados tienen impacto sólo sobre el refuerzo del lado pro-inflamatorio, pero quedan sin efecto sobre la disminución de producción de IL-10 (figura 5 B).

#### Monitorización ARNm del efecto de los profármacos inmunoestimulantes durante ET

A continuación, en estos mismos experimentos que muestran un efecto beneficioso de IFN- $\gamma$  y de GM-CSF sobre la restauración de la síntesis de TNF- $\alpha$  en respuesta a una segunda estimulación con LPS, la modulación de expresión de un panel de genes se ha estudiado por biochip (figura 6) después validada por qRT-PCR (figura 7).

Se observa una inducción significativa de la expresión ARNm de TNF- $\alpha$  en presencia de IFN- $\gamma$  comparado con los valores controles (figura 6A). La adición de los profármacos induce una ligera disminución de la expresión ARNm de IL10 (figura 6B). En paralelo, un aumento significativo de la expresión génica de HLA-DRA y CIITA se observa cuando las células pretratadas con LPS se incuban con IFN- $\gamma$  (figura 6C, 6D). En cuanto a los reguladores negativos de la vía de señalización de LPS, la expresión de ABIN-3 disminuye significativamente en presencia de IFN- $\gamma$  (figura 6E, 6F). La expresión de los genes LY64 y IRAKM disminuyen también en presencia de IFN- $\gamma$  (figura 5G). Los tres profármacos disminuyen la expresión ARNm de las alarminas S100A9 y S100A8 (figura 6H, 6I). Además, la presencia de IFN- $\gamma$  aumenta significativamente la expresión de los genes GBP1 (J), CXCL10 (M), COX 2 (N),

TNFAIP6 (P) y disminuye significativamente la de MMP7 (K), CXCL1 (L), FCN1 (O), CXCL7 (Q), CXCL5 (R), PID1 (S) y RHOA (T).

Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la sangre total de pacientes en choque séptico

5 Finalmente, los resultados obtenidos se han confirmado a partir de sangre total de pacientes en choque séptico. Como esperado, en respuesta a una estimulación de LPS, las células de pacientes producen menos TNF- $\alpha$  (figura 8A) y más IL-10 (figuras 8B) que las de voluntarios sanos, subrayando el desarrollo de un estado de ET. La adición de IFN- $\gamma$  restaura totalmente la secreción de TNF- $\alpha$  e inhibe completamente la producción de IL-10 en los pacientes en choque séptico. Estos resultados proteicos son confirmados a nivel ARNm (figura 9A, B). Además, la expresión de GBP1 (figura 9 E), de CXCL10 (figura 9F), de COX2 (figura 9G) y de TNFAIP6 (figura 9H) se redujo en gran medida en las células de pacientes tras una estimulación con LPS con respecto a la de los voluntarios sanos. La adición de IFN- $\gamma$  restaura la expresión de estos genes. Paralelamente, las células de pacientes expresan mucho más CXCL5 (figura 9I) en respuesta a una estimulación con LPS y la expresión de CXCL5 se vuelve equivalente a la observada en los donantes sanos después de la adición de IFN- $\gamma$ . Finalmente, la expresión génica de HLA-DRA y de CIITA aumenta también fuertemente en los pacientes en presencia de IFN- $\gamma$  (figura 9 C, D).

#### Referencias bibliográficas

- 20 1. Kricka *et al.*, Clinical Chemistry, 1999, n° 45(4), p.453-458.
2. Keller G.H. *et al.*, DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, secciones 5 y 6, p.173-249.
- 25 3. Bustin SA Journal of molecular endocrinology, 2002, 29: 23-39.
4. Giulietti A Methods, 2001, 25: 386-401.
5. Nisonoff A. *et al.*, 1960, Science, 132: 1770-1771).
- 30 6. Skerra A., 1993, Curr. Opin. Immunol., 5: 256-262.
7. Huston P. *et al.*, 1988, Proc. Natl.Acad. Sci.USA, 85: 5879-5883.
8. Munoz C, J Clin Invest 1991.
- 35 9. Venet F, Shock 2010.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

40 STRATICHOC PCT.ST25

<110> bioMérieux Hospices Civils de Lyon

<120> Procedimiento y kit para determinar *in vitro* el estado inmunitario de un individuo

45 <130> STRATICHOC

<150> FR 1150646

<151> 2011-01-27

50 <160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

55 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 1

60 aataaggttt ctcaaggggc t 21

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

65 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
 <400> 2  
 agaaccaaga cccagacatc aa 22  
 5  
 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 3  
 gccaacctgg aatcatgac a 21  
 15 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador  
 <400> 4  
 agggctgttc gtgagcaca 19  
 25 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 5  
 gctgggattc ctacacaatg c 21  
 <210> 6  
 <211> 24  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 6  
 40 cgggttctga gtagagctca atct 24  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 7  
 50 tttgaatgca gccagtctga 20  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 8  
 gcattgtta tggagccaat 20  
 60 <210> 9  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 65 <223> Cebador  
 <400> 9



gaattcccag ataaaagctt gt 22

<210> 10  
 <211> 19  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 10  
 10 gacagtctgg tgggtgctc 19

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 11  
 20 tcaaagagct ggtgcaaaa 20

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 12  
 aactcctcga agctcagctg 20

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Cebador  
 <400> 13  
 attccatgc cgtctacagg 20

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 45 <400> 14  
 caccagaatg aggaactcct 20

<210> 15  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 15  
 55 gcattgagaa agaagccaac aa 22

<210> 16  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 16  
 60 gaaaagtgtc tcatgtatc c 21

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para determinar *in vitro* el estado inmunitario global de un individuo séptico para la implementación de una terapia lo mejor determinada posible en función de la respuesta inmunitaria establecida según la cual:
- a. se dispone de una muestra sanguínea del individuo,
- b. se dispone de al menos dos reactivos específicos de al menos dos productos de expresión de al menos dos genes dianas respectivamente seleccionados entre los genes dianas siguientes:
- 10 HLA-DRA, S100A9, S100A8, IRAK-M, LY64, CIITA, TNF-alfa, IL-10, GBP1, MMP7, CXCL1, CXCL10, COX2, FCN1, TNFAIP6, CXCL7, CXCL5, PID1 y RHOA,
- c. se determina la expresión de dichos al menos dos genes dianas, y
- 15 d. se compara la expresión de dichos al menos dos genes dianas respectivamente con una expresión de referencia, siendo una modificación en la expresión de dichos al menos dos genes dianas con respecto a su expresión de referencia un indicador de una modificación del estado inmunitario del individuo, y siendo una correlación entre la expresión de dichos al menos dos genes dianas con su expresión de referencia un indicador de una normalidad del estado inmunitario del individuo.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra sanguínea es una muestra de sangre total.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que en la etapa a. se extraen las células mononucleadas de la sangre periférica de la muestra sanguínea y se realizan las etapas subsiguientes b. a d. sobre dichas células mononucleadas de la sangre periférica.
- 25 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los reactivos específicos de los productos de expresión de los genes dianas comprenden al menos un cebador de amplificación específico de dichos genes dianas.
- 30 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los reactivos específicos de los productos de expresión de los genes dianas comprenden al menos una sonda de hibridación específica de dichos genes dianas.
- 35 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los reactivos específicos de los productos de expresión de los genes dianas comprenden al menos un anticuerpo.
- 40 7. Utilización de al menos dos reactivos específicos de al menos dos productos de expresión de al menos dos genes dianas respectivamente seleccionados entre los genes dianas siguientes: HLA-DRA, S100A9, S100A8, IRAK-M, LY64, CIITA, TNF-alfa, IL-10, GBP1, MMP7, CXCL1, CXCL10, COX2, FCN1, TNFAIP6, CXCL7, CXCL5, PID1 y RHOA, para determinar *in vitro* el estado inmunitario global de un individuo séptico para la implementación de una terapia lo más determinada posible en función de la respuesta inmunitaria establecida.
- 45 8. Utilización según la reivindicación 7, en la que los reactivos específicos de los productos de expresión de dichos genes dianas comprenden al menos un cebador de amplificación.
9. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en la que los reactivos específicos de los productos de expresión de dichos genes dianas comprenden al menos una sonda de hibridación.
- 50 10. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en la que los reactivos específicos de los productos de expresión de dichos genes dianas comprenden al menos un anticuerpo.

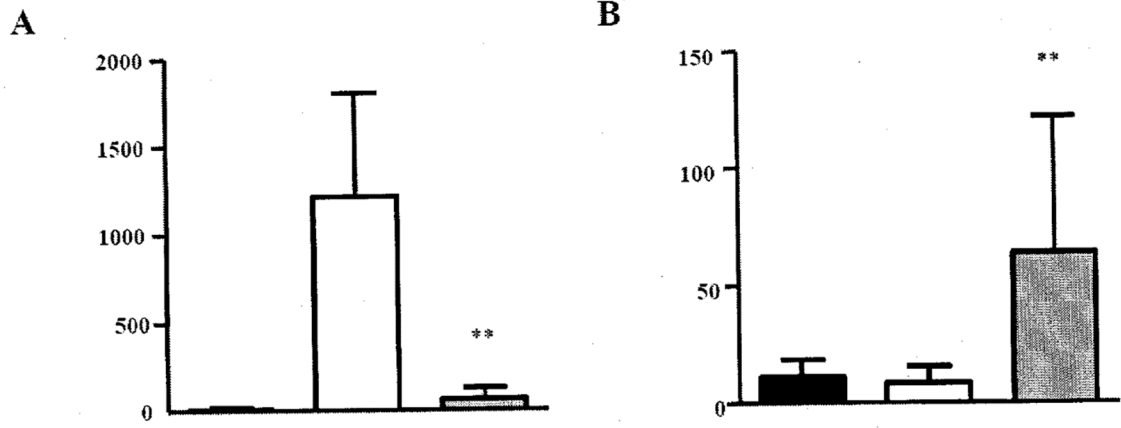


Figura 1

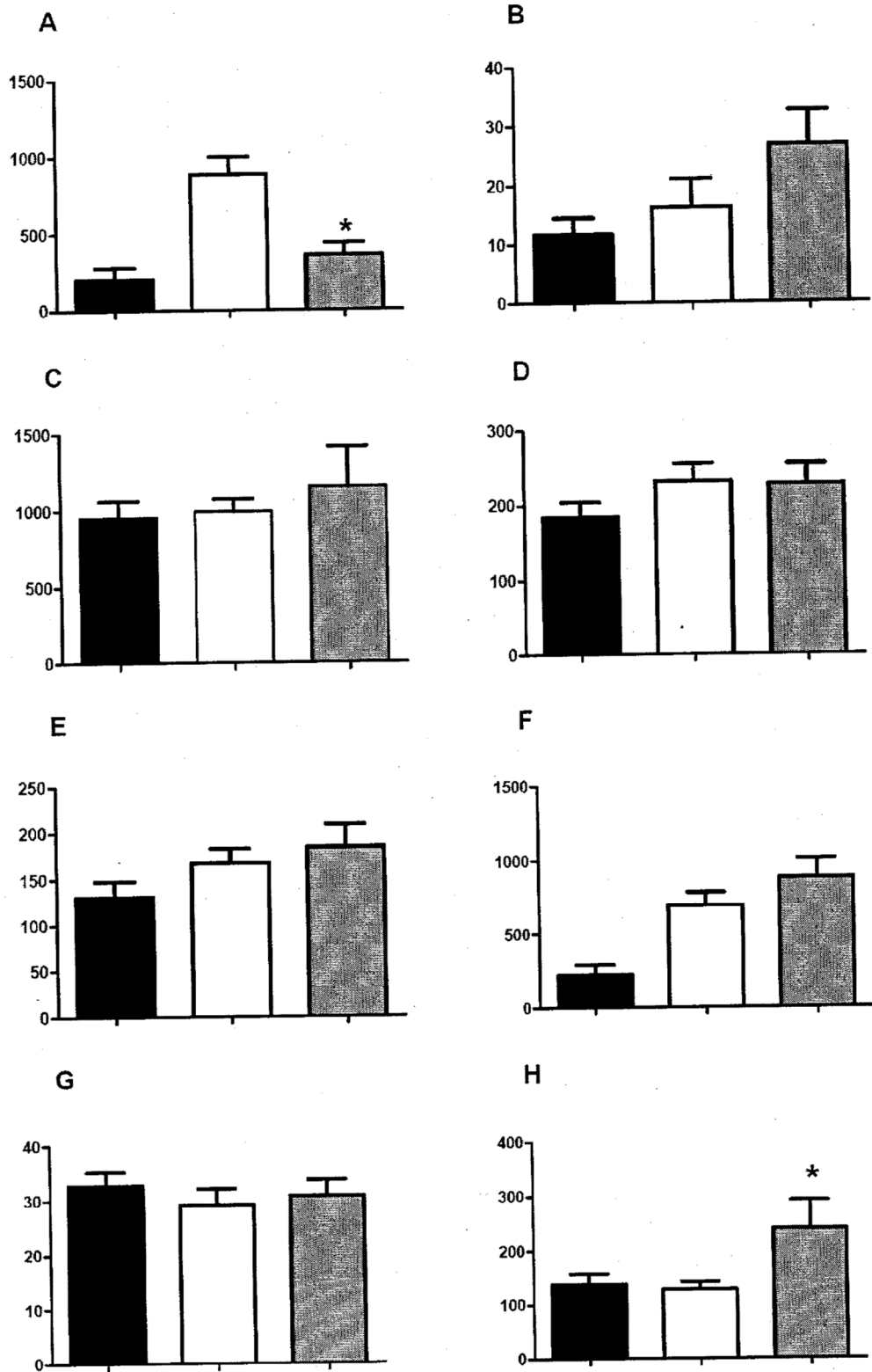


Figura 2

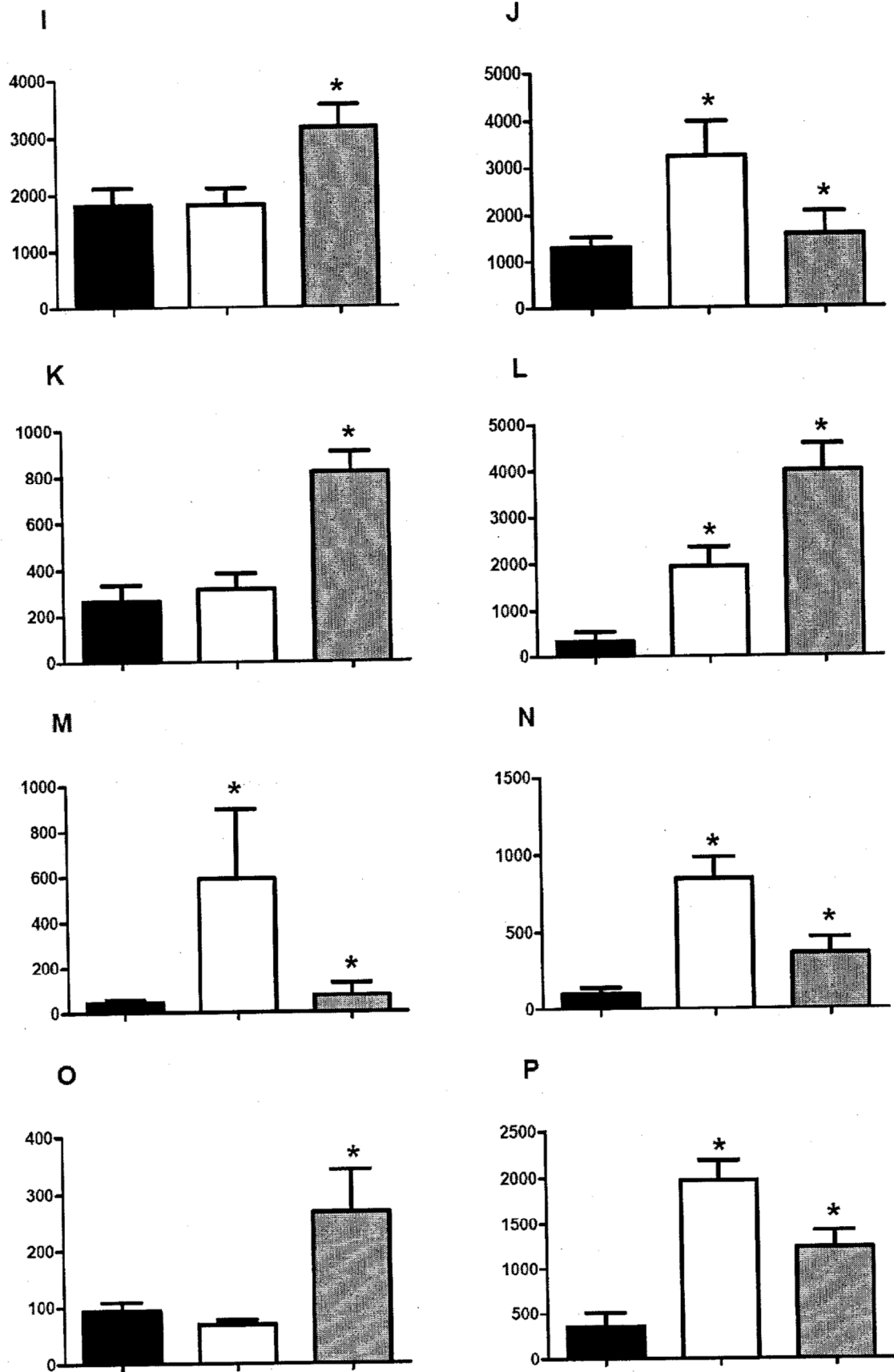


Figura 2 (continuación)

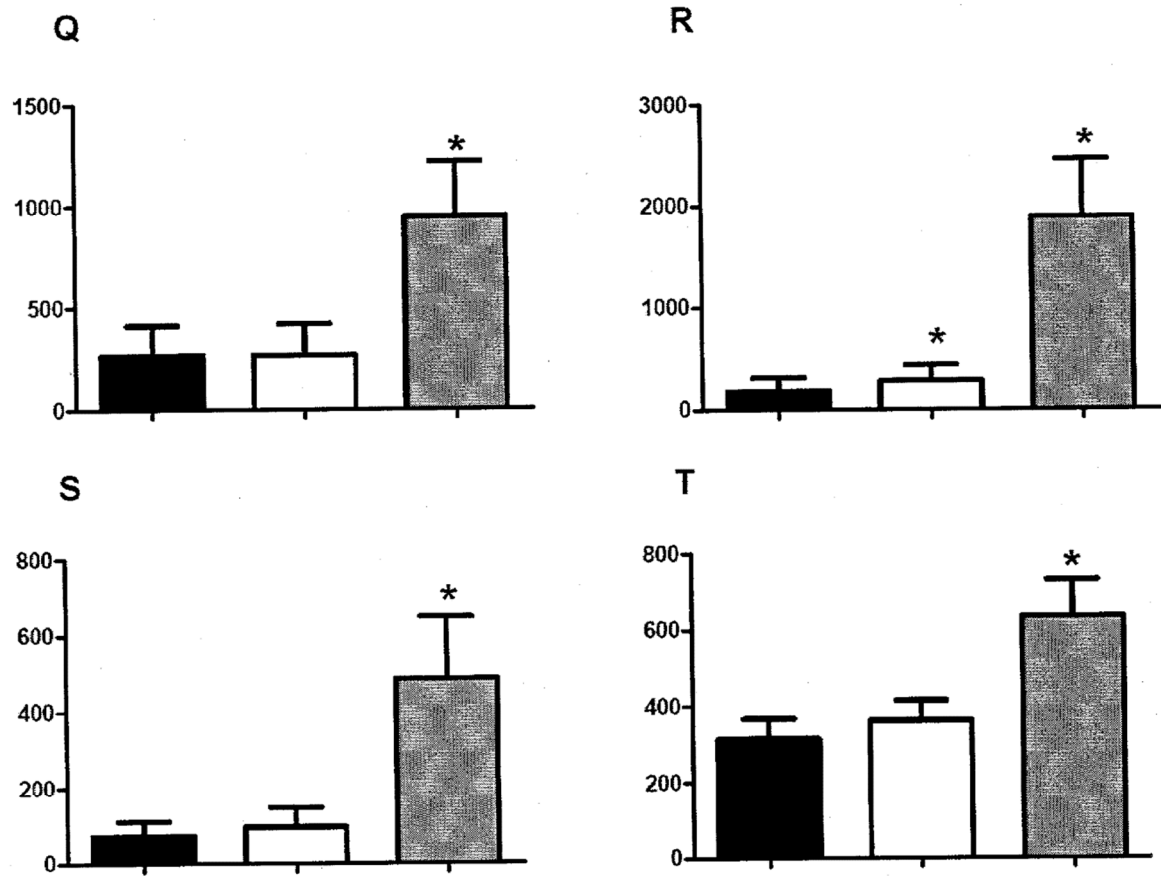


Figura 2 (continuación)

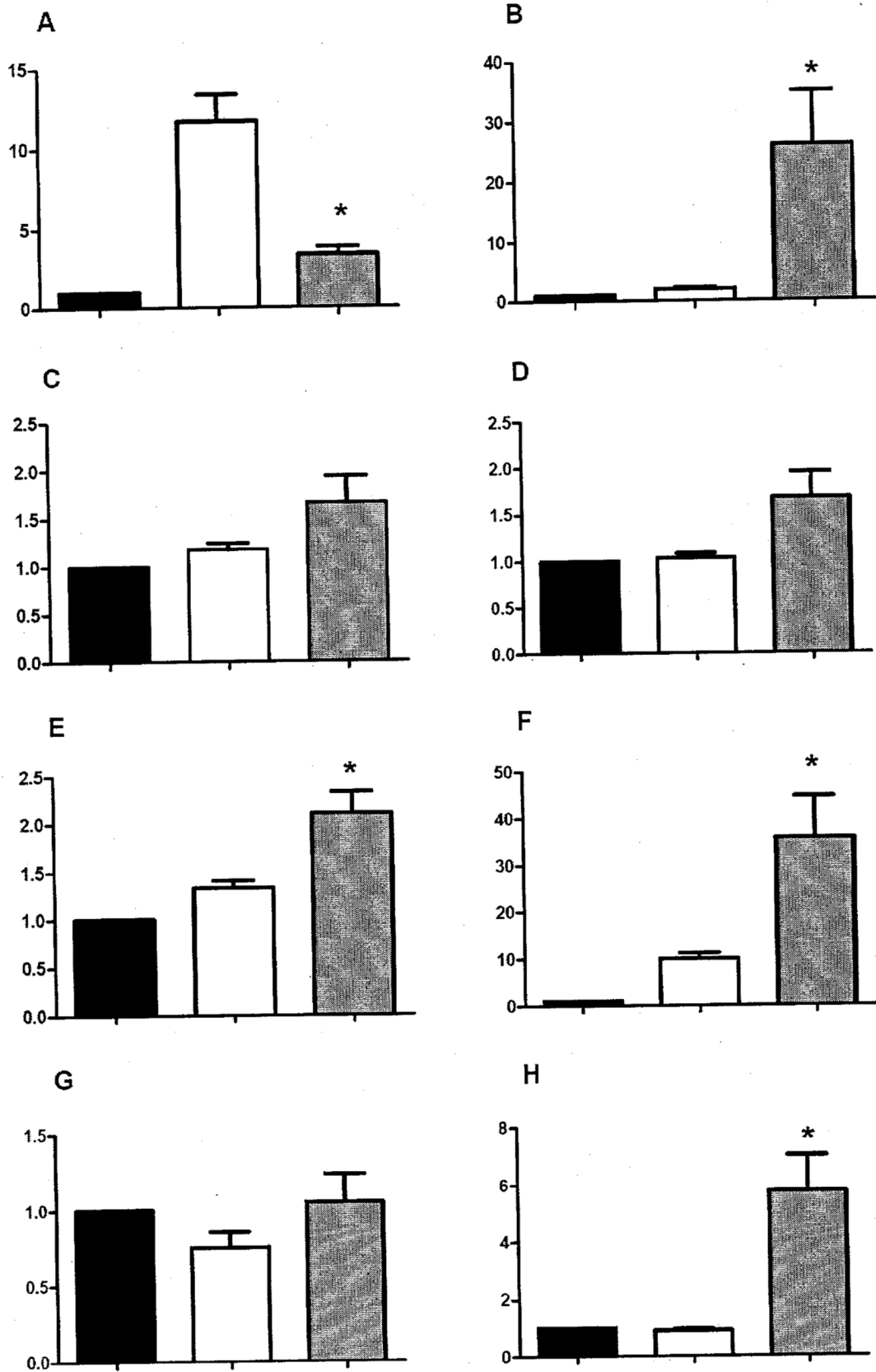


Figura 3

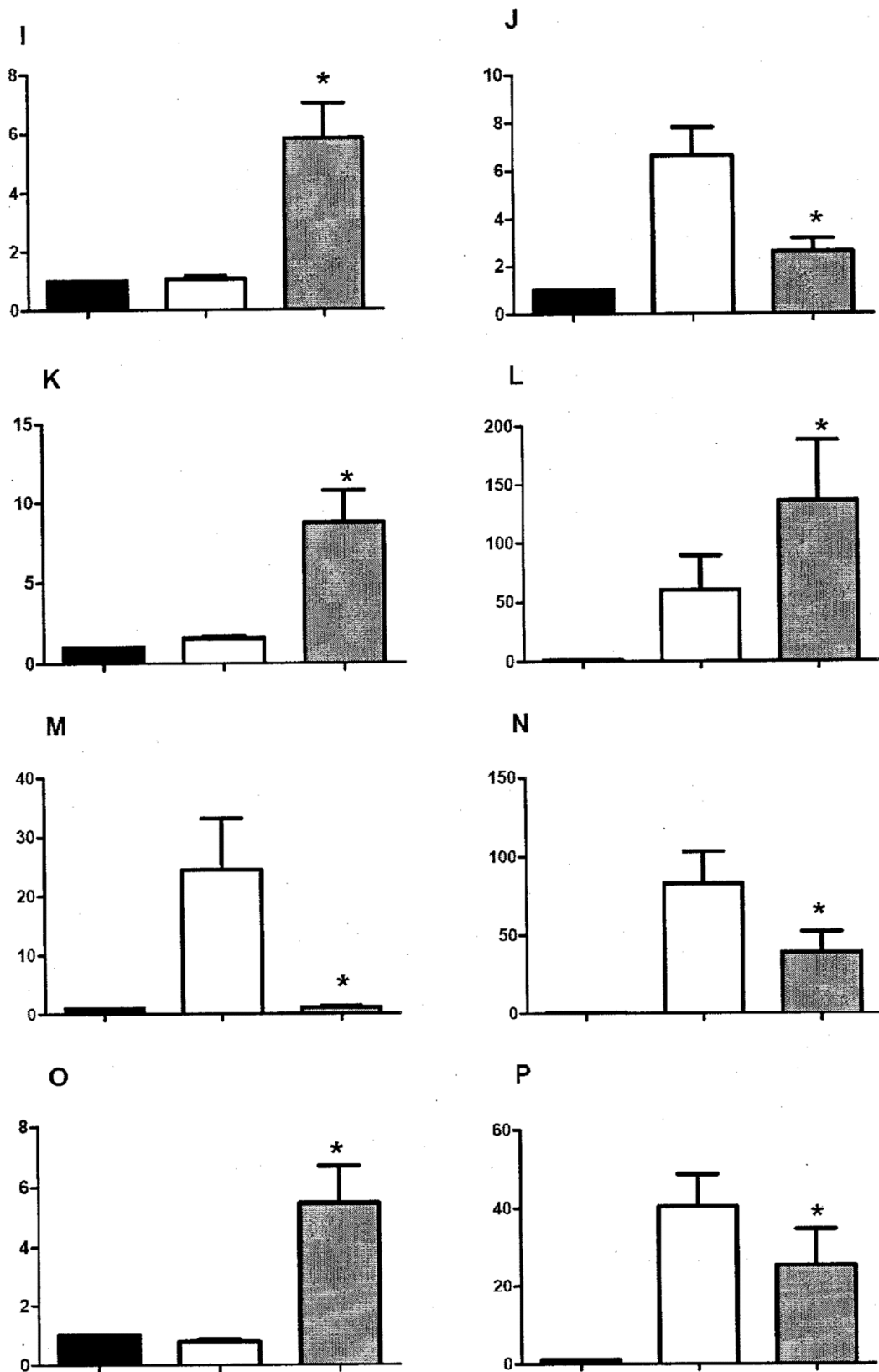


Figura 3 (continuación)



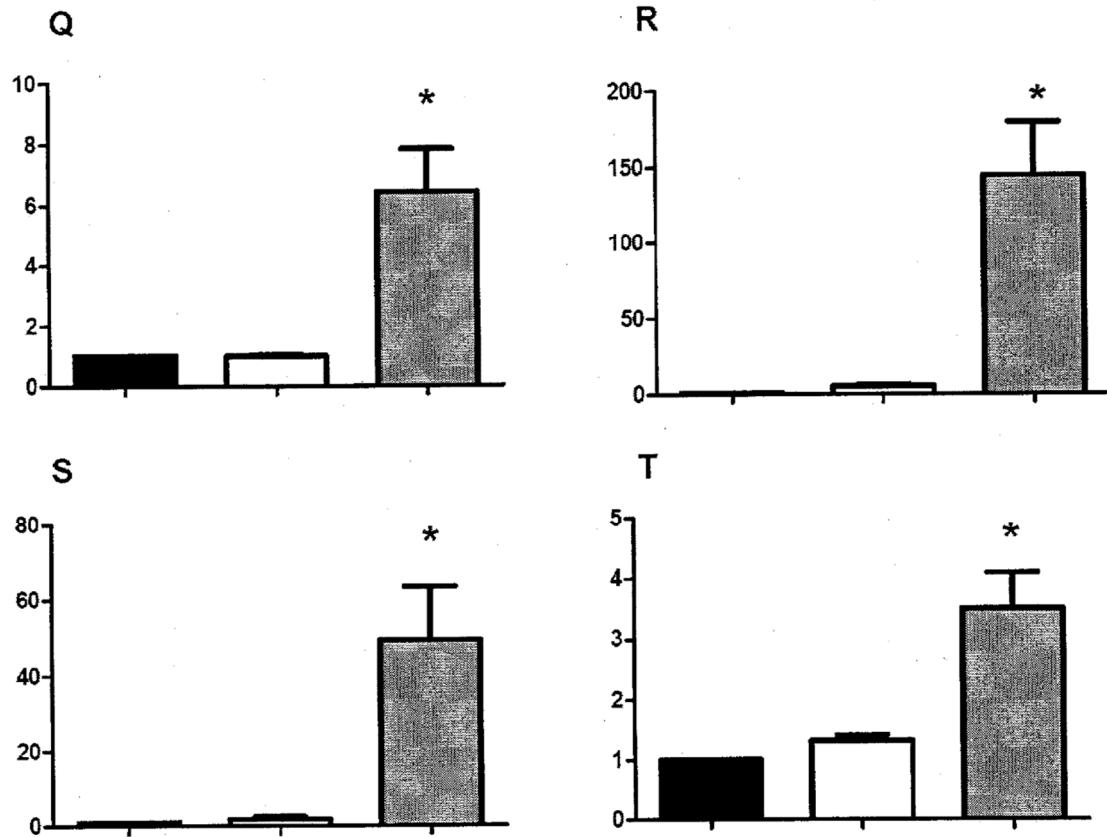


Figura 3 (continuación)

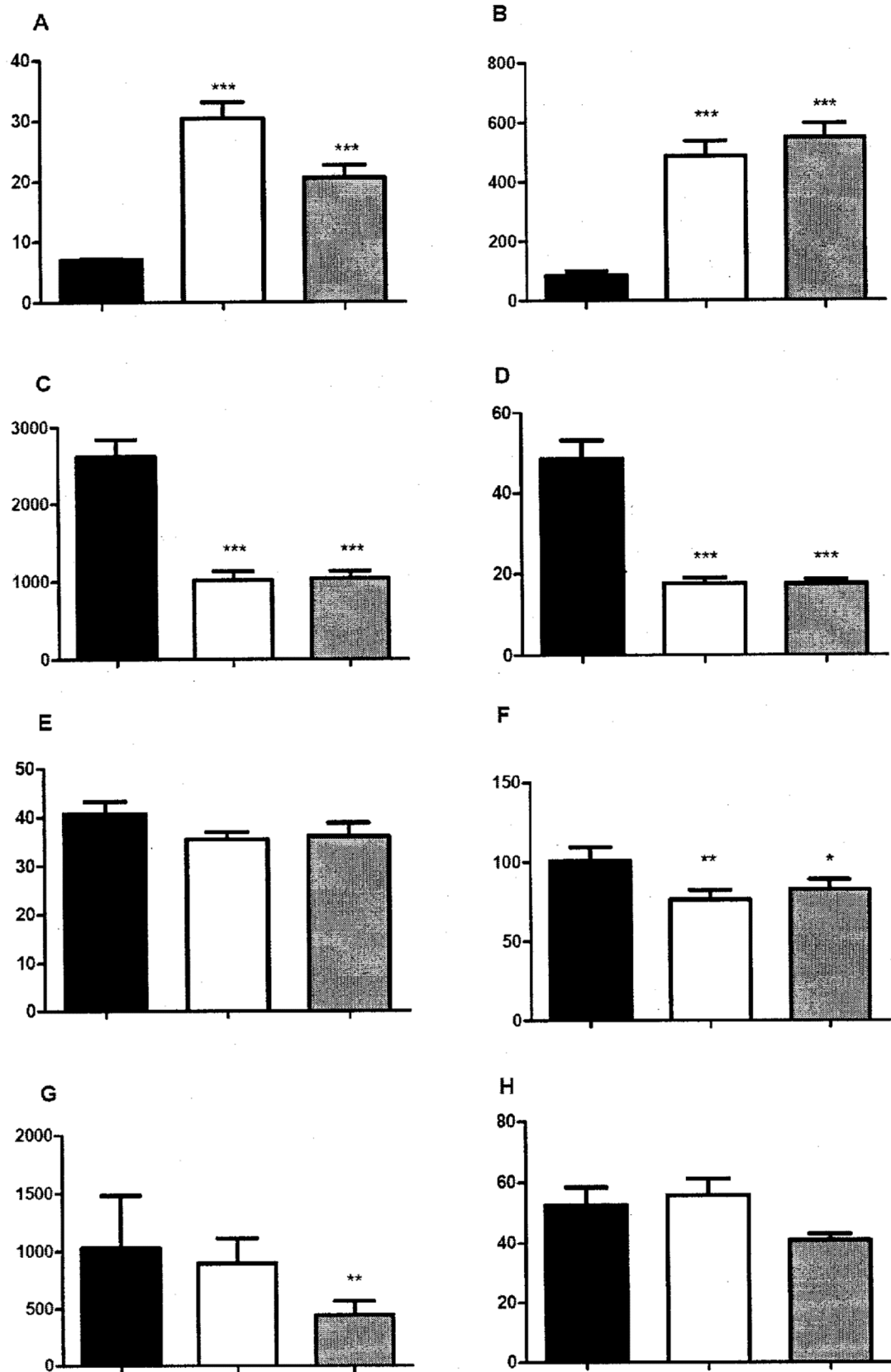


Figura 4

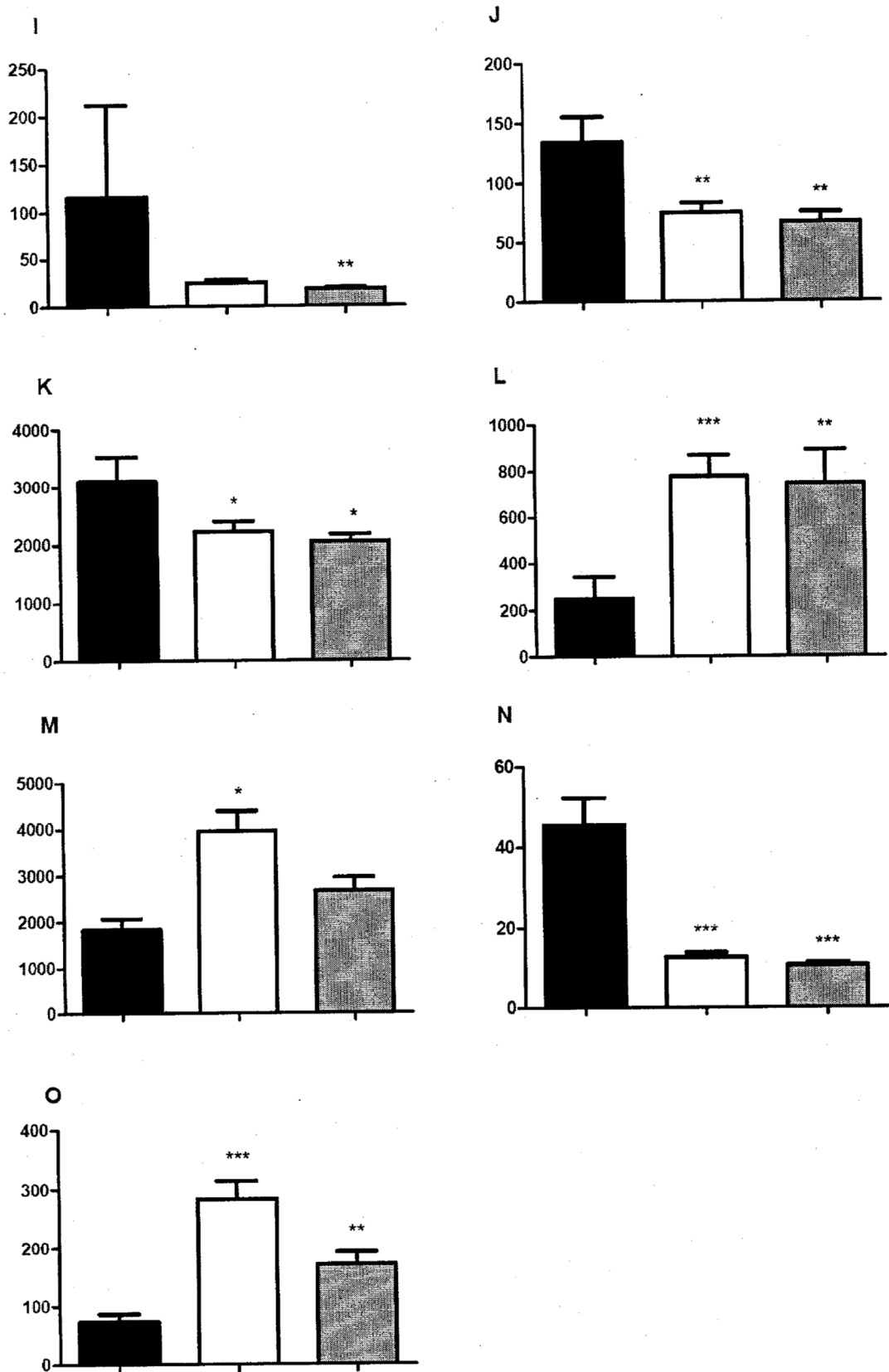


Figura 4 (continuación)

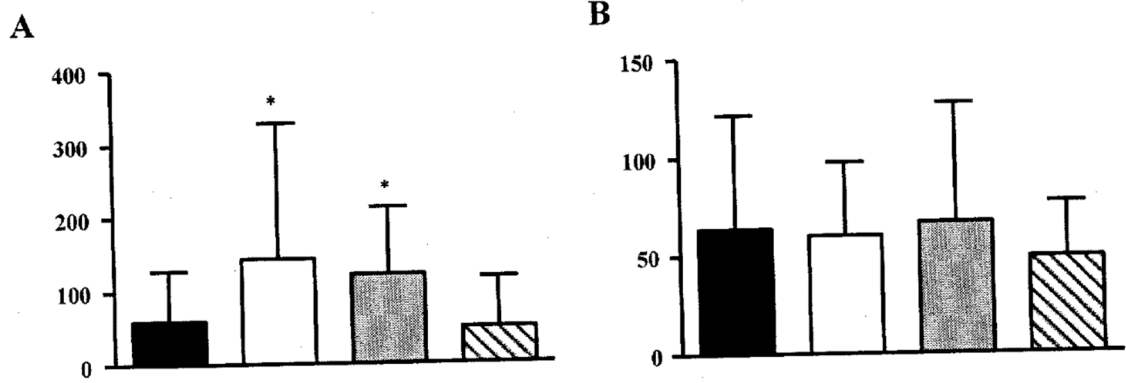


Figura 5

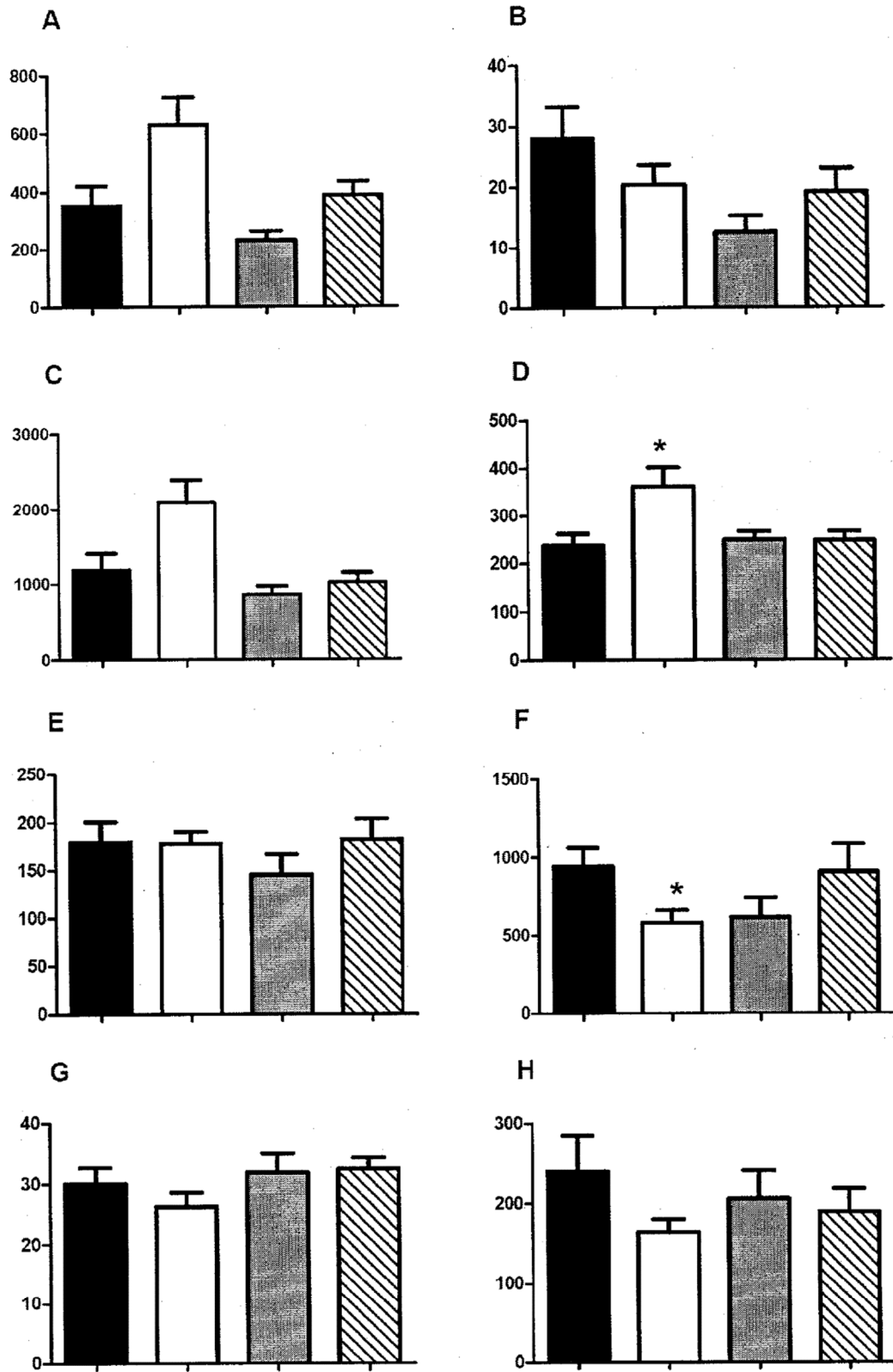


Figura 6

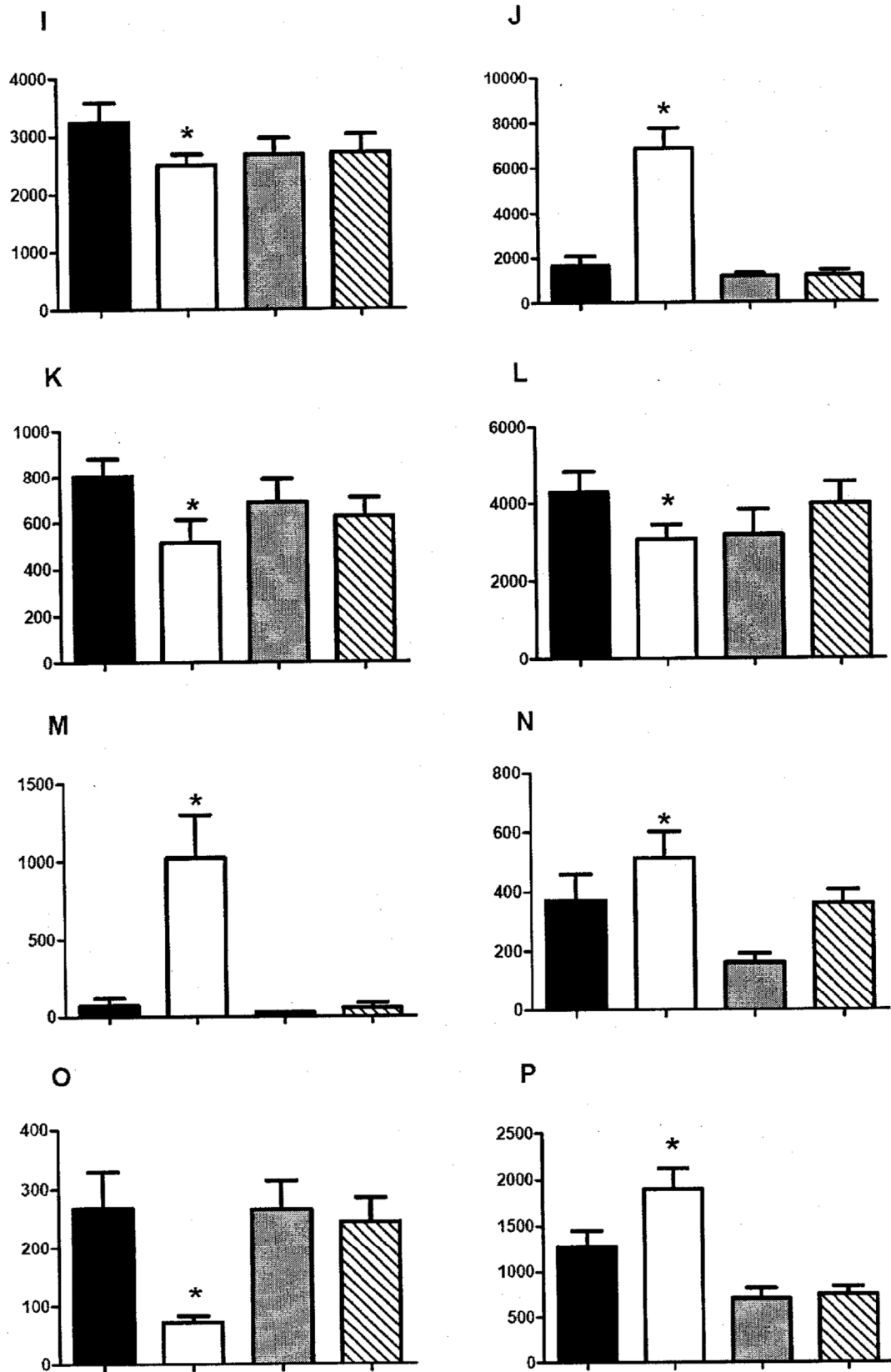


Figura 6 (continuación)

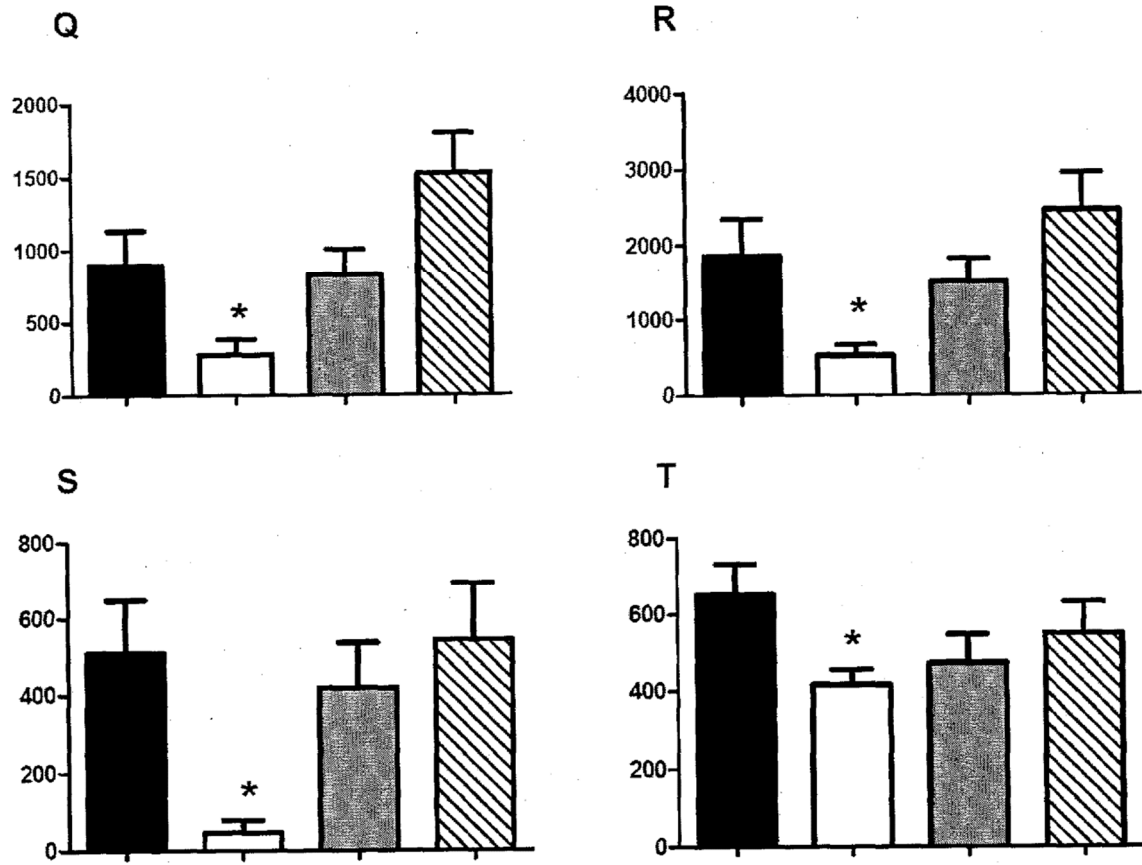


Figura 6 (continuación)

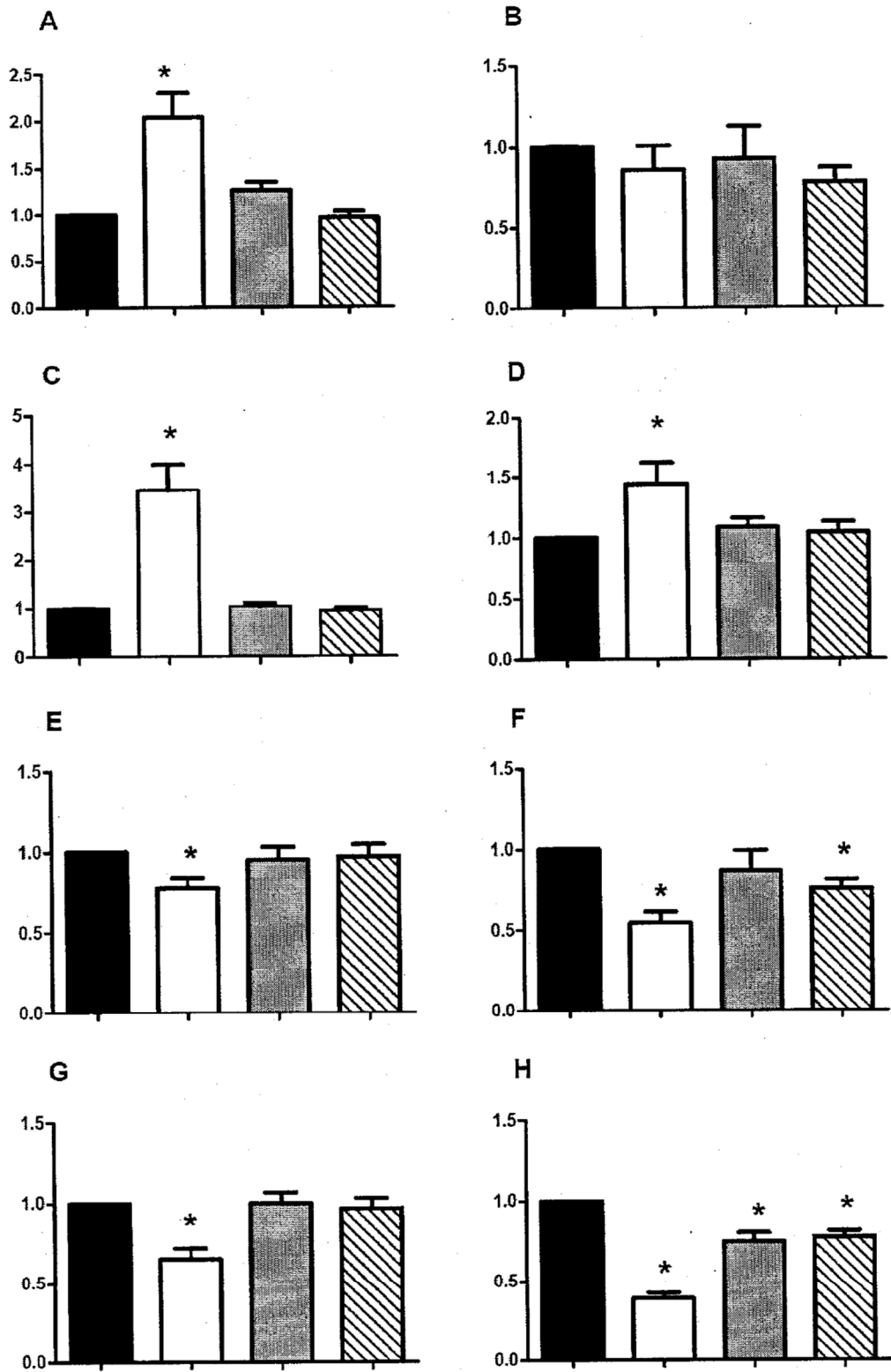


Figura 7



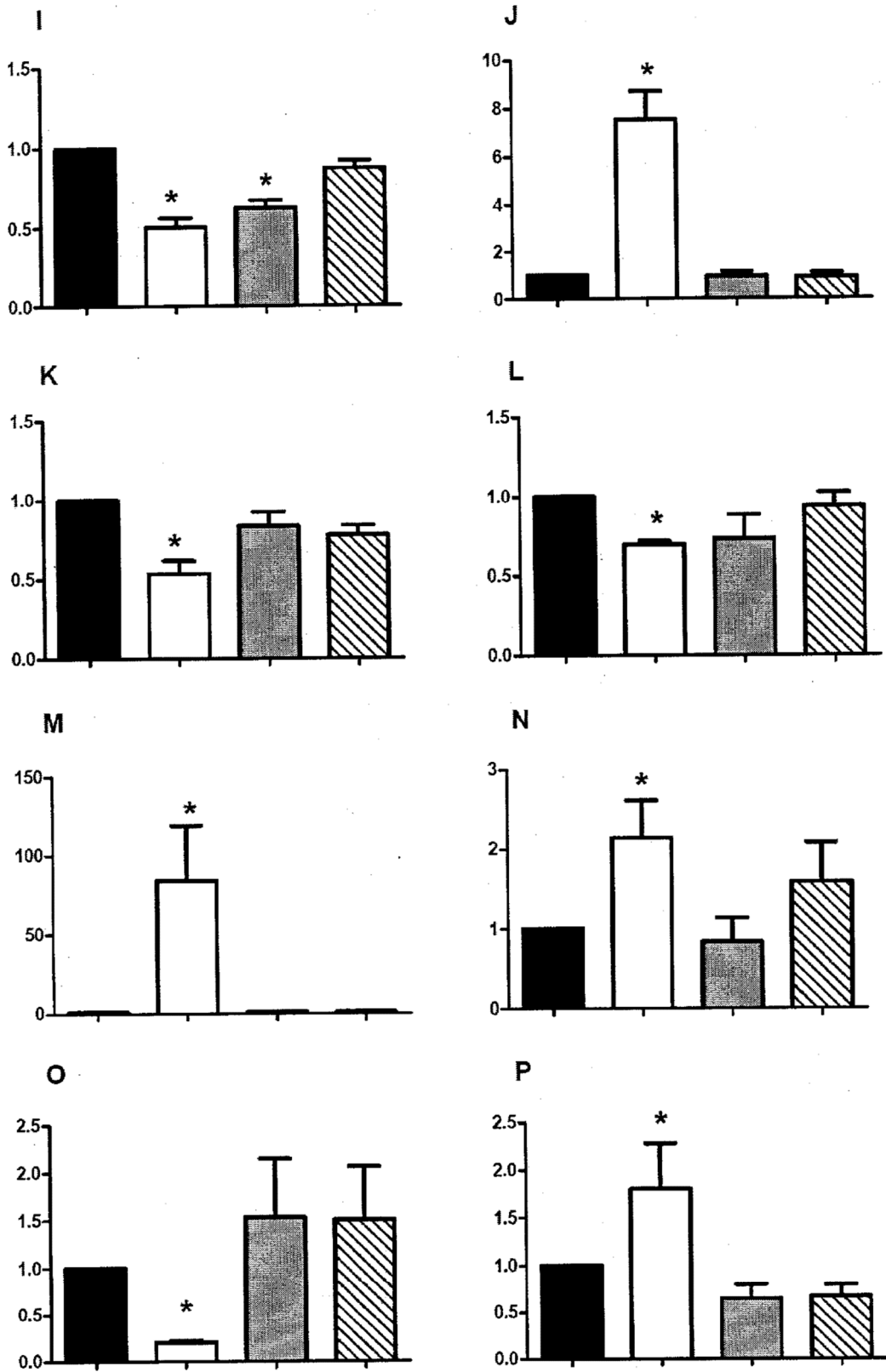


Figura 7 (continuación)

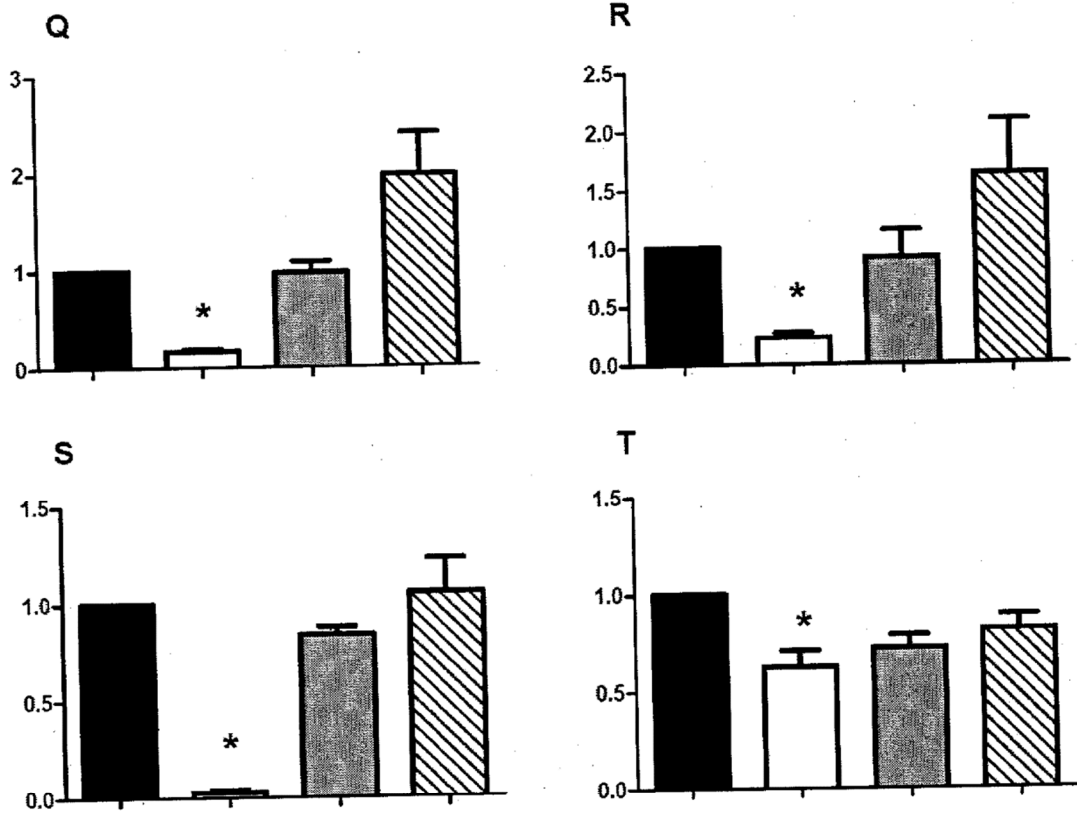


Figura 7 (continuación)

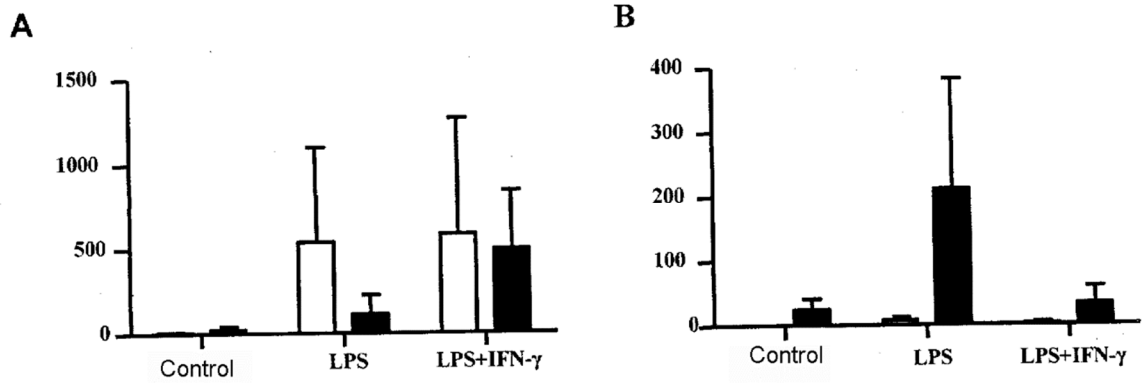


Figura 8

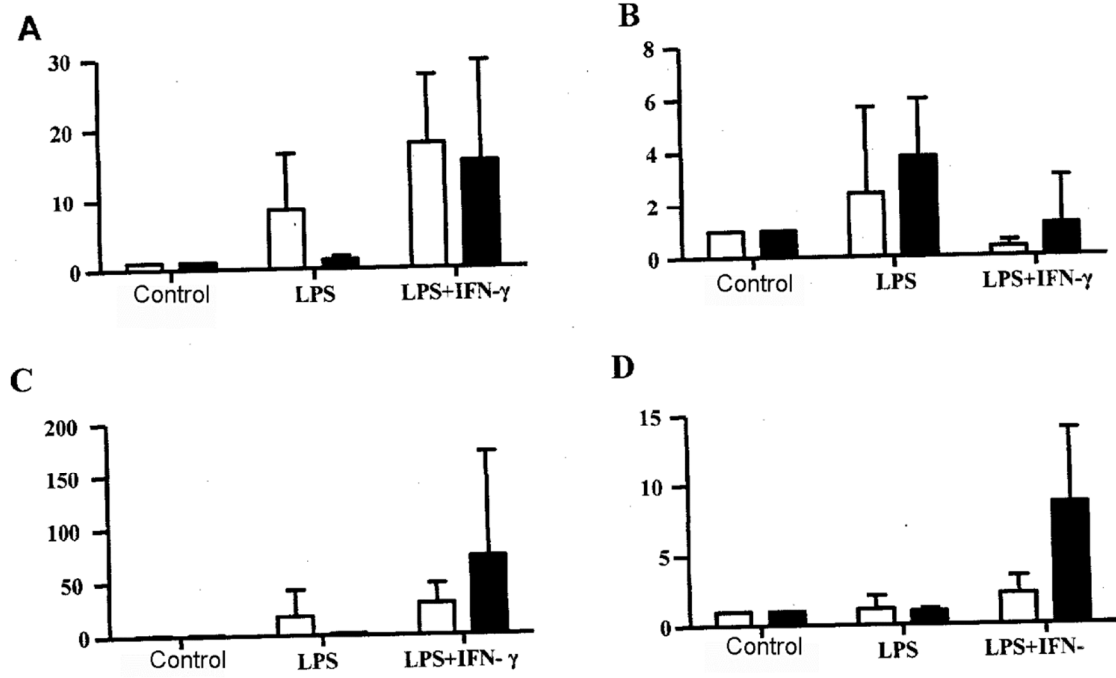


Figura 9

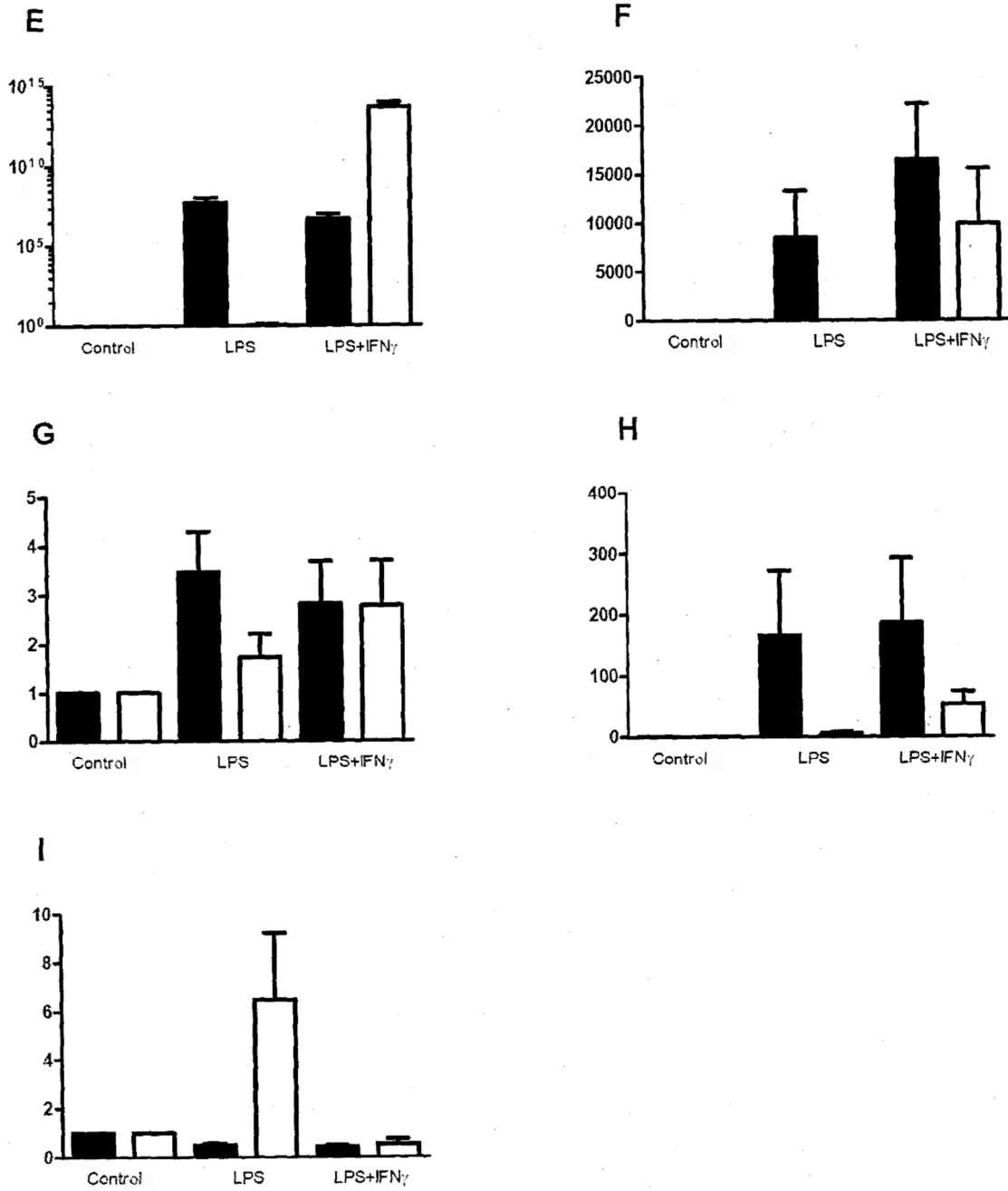


Figura 9 (continuación)