

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 103**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2012 PCT/GB2012/052307**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041854**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2012 E 12762380 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2758784**

54 Título: **Biomarcadores para infección respiratoria**

30 Prioridad:

**20.09.2011 GB 201116234**

**23.07.2012 GB 201213025**

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

**26.09.2017**

73 Titular/es:

**ASEPTIKA LTD (100.0%)**

**14 Elizabeth Drive Hartford Huntingdon  
Cambridgeshire PE29 1WA, GB**

72 Inventor/es:

**AUTON, KEVIN ANDREW**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 634 103 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Biomarcadores para infección respiratoria

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar un nivel de actividad de bacterias *Pseudomonas aeruginosa* en el pulmón de un paciente. El método se destina particularmente, pero no exclusivamente, a identificar la presencia y el nivel de actividad de infección bacteriana en el pulmón de pacientes con fibrosis quística; o para predecir la exacerbación de una infección en tales pacientes. Otros aspectos de la invención se refieren a métodos *in vitro* para determinar la eficacia de un tratamiento antibiótico de una infección pulmonar bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa*.

15 **Antecedentes de la invención**

En la región del Este de Inglaterra, se requieren 80.000-125.000 días de cama en el hospital para tratar a pacientes con infecciones respiratorias cada año. Los pacientes más desafiantes a tratar son los más vulnerables: los ancianos, los neonatos y aquellos que padecen afecciones crónicas tales como fibrosis quística (FQ), Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) o VIH. Las infecciones respiratorias en pacientes con afecciones de enfermedades crónicas pueden ser difíciles de tratar: la infección incluso con los patógenos respiratorios más comunes puede ser fatal.

Muchos pacientes con FQ son colonizados por uno o más patógenos, siendo el más común *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria gram-negativa coloniza los pacientes de FQ y evade todos los intentos en la erradicación. Se somete a numerosos estallidos (exacerbaciones) y la inflamación que causa resulta en la pérdida permanente de la función pulmonar. También se vuelve resistente a los antibióticos con el tiempo, haciendo cada infección posterior más difícil de controlar que la última. Este es un patógeno adaptable, resiliente y letal a ser colonizado con él. El reto de los médicos que tratan a pacientes con FQ es reducir el número de infecciones y disminuir la gravedad de cada infección. Al haberlo, la función pulmonar se preserva y se aumenta la esperanza de vida. Para la mayoría de los pacientes de FQ, una infección pulmonar con la sepsis resultante y el fallo multiorgánico es la causa principal de muerte.

La infección con *P. aeruginosa* se vuelve problemática cuando hay una exacerbación de la infección, desencadenada por otros factores. Si no se trata pronto y con la correcta medicación antimicrobiana, el paciente puede admitirse en el hospital durante 2-4 semanas hasta que pueda controlarse la infección. Esta exacerbación y la infección pulmonar que sigue pueden acompañarse por una pérdida dramática y normalmente permanente de función pulmonar y la elevación en exotoxinas producidas por el patógeno, dando lugar a sepsis.

En cada etapa en el tratamiento de infecciones, los pacientes de FQ deben viajar a su clínica y ver a su médico como un paciente externo para varias consultas. El fallo al controlar la infección como un paciente externo resulta en una admisión de larga estancia. El fallo continuado para controlar las infecciones frecuentes (un paciente de FQ puede padecer 4-6 infecciones al año), provocará daño irreparable en la salud que de nuevo, aumenta el coste del cuidado de la salud durante el tiempo de vida del paciente.

Es importante notar que no es meramente la presencia de una infección que es adversa a los pacientes. Muchos pacientes tendrán una infección en marcha, de bajo nivel, que se somete a exacerbaciones periódicas. Predecir el tiempo de estas exacerbaciones es significativo para el manejo del tratamiento. Simplemente detectar la presencia o la ausencia de la bacteria - por ejemplo, por secuenciación de ácidos nucleicos - no será en sí misma informativa en cuanto a la probabilidad de una exacerbación, ya que las exacerbaciones pueden desencadenarse por muchos factores.

Se conoce el uso de la presencia de un biomarcador, tal como una proteína secretada, como un diagnóstico para la infección. Por ejemplo, los presentes inventores han desarrollado previamente un ensayo sencillo basado en laboratorio para medir la Exotoxina A de *P. aeruginosa* (un marcador bien conocido de la infección por *P. aeruginosa*) en el esputo del paciente.

Pero confiar en un único biomarcador para la evaluación precisa del estado de la infección es problemático. Por ejemplo, los productos que detectan otros patógenos normalmente buscan solo toxinas, tales como los muchos ensayos rápidos para *C. difficile* que ya están en el mercado. Estos detectan la presencia de las Toxinas A y B bacterianas en muestras fecales. Aunque son rápidos de realizar (30 minutos), estos ensayos rápidos tienen baja precisión porque las toxinas A y B pueden no producirse durante todas las infecciones o pueden no detectarse en una muestra dada - esto da una baja tasa de detección en comparación con los métodos más lentos, pero más sensibles de cultivar células a partir de una muestra por microbiología tradicional (2-3 días). Adicionalmente, se cree que las poblaciones bacterianas pueden alterar el perfil de las toxinas u otras proteínas producidas durante el tiempo en respuesta a factores ambientales; dentro de una población dada, puede haber solamente algunas células que produzcan una proteína particular mientras que las células restantes contribuyen a la infección pero confían en estas proteínas exógenas para su supervivencia. También se sabe que una población dada de bacterias en un paciente

colonizado mutan con el tiempo desde el tipo silvestre con el que el hospedador se infectó originalmente. En consecuencia, detectar una única proteína puede no ser suficientemente preciso como diagnóstico de la probabilidad de una exacerbación.

5 Para evitar este riesgo de poca precisión, los presentes inventores han identificado en la presente divulgación varios biomarcadores que pueden medirse cuantitativamente. Además, los presentes inventores pueden también perfilar biomarcadores que indican el estado de la respuesta del hospedador a este patógeno. Los presentes inventores creen que tomados juntos, una combinación de estos marcadores podría usarse para detectar una exacerbación antes de que el paciente no se sienta bien, reduciendo de esta manera el tiempo para prescribir el primer antibiótico y por lo tanto reduciendo la gravedad de la infección.

15 Martin et al., *Biometals* (2011) 24: 1059-1067 describe la detección de sideróforos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* en el esputo de pacientes con fibrosis quística. Descubrieron una asociación entre la presencia de pioverdina y un número de bacterias, pero no en 21 de 148 pacientes; y concluyeron que no hay correlación entre la cantidad de bacterias y el estado clínico. Los autores también concluyen que los niveles de sideróforos no cambian marcadamente durante las exacerbaciones. Esta publicación enseña por lo tanto que el perfilado con sideróforos no puede usarse para determinar el nivel de virulencia.

20 En contraste, como se describe además a continuación, los presentes inventores han determinado que los sideróforos son un marcador útil para las exacerbaciones bacterianas, cuando se usan en combinación con la exotoxina A. Los presentes inventores por lo tanto proporcionan un ensayo preciso y rápido para determinar tales exacerbaciones.

25 Jaffar-Bandjee et al., *Journal of Clinical Microbiology*, Abril 1995, p924-929 describe la producción de elastasa, exotoxina A y proteasa alcalina en esputos durante la exacerbación pulmonar de FQ en pacientes crónicamente infectados por *Pseudomonas aeruginosa*. Descubrieron que las concentraciones de exoproteínas variaron por el paciente en admisión (esto es, después de que empiece la exacerbación), pero que las tres proteínas estudiadas (elastasa, Exotoxina A y proteasa alcalina) tenían niveles similares. Sin embargo, es evidente a partir de los datos presentados en la solicitud actual que diferentes pacientes pueden incluir diferentes poblaciones bacterianas que producen diferentes toxinas o marcadores. Además, no se realizó ensayo para detectar niveles de exoproteína antes de las exacerbaciones. Por lo tanto perfilar cualquiera de estas exoproteínas bien solas o en combinación no proporcionará suficientes datos para predecir todas las exacerbaciones en todos los pacientes de FQ.

35 El documento WO2006/000056 (Proteome Systems) describe métodos de diagnóstico y tratamiento de la infección por *P. aeruginosa* y los reactivos para su uso en tales métodos. Los métodos se refieren a la detección de proteínas o fragmentos inmunogénicos en muestras de pacientes, o a la detección de anticuerpos para dichas proteínas. Las proteínas inmunogénicas incluyen proteína de unión a hierro férrico (HitA), reductasa dependiente de tiorredoxina (PAPS), tiorredoxina, proteína de choque térmico GroES, quinasa dependiente de nucleótido (NDK) y proteína HU de unión a ADN.

40 Además, con un ensayo objetivo y cuantitativo, el médico que trata será capaz de determinar rápidamente el rendimiento de una medicación antimicrobiana al controlar la infección, sustituyendo un antibiótico por otro si el primero falla al llevar la infección bajo control. Normalmente, puede tomar hasta 3 semanas probar diferentes combinaciones de antibióticos en un proceso iterativo, antes de que se establezca una solución eficaz - esto se logra habitualmente por "conjeturas informadas" en la parte del médico experto. Sin el presente ensayo diagnóstico, los presentes inventores creen que el tiempo tomado para realizar este proceso más necesariamente de ensayo y error podría reducirse de 3 semanas a solo 7 días.

50 Para pacientes con FQ, la infección da lugar a inflamación del pulmón y cuanto mayor la inflamación y el tiempo de inflamación, mayor la pérdida de función del pulmón. La mayoría de pacientes de FQ padecen 4 infecciones cada año y pueden gastar el 50 % de su tiempo en el hospital. Esto podría reducirse a través del uso del presente ensayo nuevo multi-marcador.

55 Muchas admisiones hospitalarias se evitarían si hubiera una evaluación rápida y precisa de los individuos con infecciones bacterianas. Una de las dificultades principales cuando se evalúan pacientes con infecciones respiratorias es distinguir las infecciones bacterianas de las víricas. Las características clínicas son frecuentemente engañosas y muchos pacientes admitidos posteriormente en el hospital han encontrado retrasos al recibir antibióticos en la comunidad. En los EE.UU. aproximadamente 1 de 18 o el 5,51 % o 15 millones de personas al año tienen mal diagnosticadas infecciones del tracto respiratorio inferior.

60 Además, los trabajadores del cuidado de la salud primaria también se enfrentan al dilema de seleccionar antibióticos apropiados. Aunque la selección empírica de antibióticos habitualmente resulta en un tratamiento satisfactorio, la capacidad de identificar el nivel del tratamiento a un paciente vulnerable planteado por un patógeno identificado, permitiría el uso de antibiótico optimizado. Esto resultaría en: éxito del tratamiento temprano mejorado por lo tanto previniendo el deterioro clínico y la posterior admisión hospitalaria y reducido uso de antibióticos de amplio espectro.

65

**Sumario de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método *in vitro* para determinar un nivel de actividad de bacterias *Pseudomonas aeruginosa* en el pulmón de un paciente, estando el método de acuerdo con la reivindicación 1.

También se proporcionan métodos para predecir una exacerbación de un nivel de actividad bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* en el pulmón de un paciente; y un método *in vitro* para determinar la eficacia de un tratamiento antibiótico de una infección pulmonar bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*, como se describe en las reivindicaciones 5 y 6.

Otras características de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

Los presentes inventores han determinado, sorprendentemente, que los cambios en los niveles de marcadores de procesos de secuestro de hierro bacteriano, tales como los sideróforos, pueden ser predictivos de exacerbaciones, pero no en todos los pacientes. De forma similar, los cambios en los niveles de toxinas bacterianas también pueden ser predictivos en algunos pacientes. Un ensayo confiable puede obtenerse combinando las dos mediciones como se describe en el presente documento. Además, debido a variabilidad del paciente individual, es deseable medir cambios durante el tiempo en lugar de niveles absolutos en un único punto de tiempo; algunos pacientes pueden vivir con niveles de fondo mayores que otros, y de esta manera son los cambios que son diagnósticos.

*P. aeruginosa*, como otros patógenos, requiere iones Fe (III) para sobrevivir. Los pulmones de los pacientes de FQ producen normalmente grandes cantidades de mucus, pero también tienen fuga de sangre en los espacios de aire recubiertos con fluido de los pulmones. Esto sirve como una fuente de hierro para el patógeno. *P. aeruginosa* tiene múltiples mecanismos por los que puede secuestrarse y parece cambiar de un mecanismo a otro dependiendo de la condición del hospedador. Sin embargo, los presentes inventores creen que es posible usar niveles de marcadores de procesos de secuestro de hierro como marcadores de la actividad bacteriana.

El marcador de un proceso de secuestro de hierro es un sideróforo. En realizaciones preferidas, el sideróforo puede incluir en particular uno o más de: pioquelina, pioverdina y piocianina.

El marcador es un marcador bacteriano, aunque en ciertas realizaciones los marcadores de procesos de secuestro de hierro del hospedador también pueden detectarse. En pacientes sanos, los iones Fe (III) se secuestran por el hospedador (por ejemplo, mediante lactoferrina, ferritina o transferrina) para evitar la acumulación de Fe (III) libre que serviría como un reservorio para el crecimiento bacteriano. De esta manera la presencia de marcadores del hospedador puede ser útil como un marcador adicional para determinar la actividad bacteriana.

La proteína bacteriana secretada es exotoxina A.

En una realización preferida, se detecta la combinación de pioverdina y exotoxina A.

El método preferentemente comprende además medir al menos un marcador adicional. Los marcadores adicionales pueden seleccionarse de toxinas bacterianas, marcadores de secuestro de hierro del hospedador, marcadores de secuestro de hierro bacterianos y marcadores inflamatorios del hospedador. Los presentes inventores creen que detectar una combinación de marcadores adicionales proporciona mayor sensibilidad, precisión y confianza al ensayo que detectar la combinación solamente de marcadores de secuestro de hierro y toxinas secretadas. En una realización particularmente preferida, se detecta la combinación de una toxina bacteriana, un marcador bacteriano de procesos de secuestro de hierro y un marcador del hospedador de un proceso de secuestro de hierro. Por ejemplo, pueden detectarse exotoxina A, un sideróforo, un producto hemo o de descomposición hemo.

El marcador inflamatorio puede ser una citocina.

La bacteria es *P. aeruginosa*. En ciertas realizaciones, el marcador tiene una concentración dependiente de un nivel de señalización de quórum entre bacterias *P. aeruginosa*.

El paciente puede ser un paciente con fibrosis quística. En otras realizaciones, el paciente puede ser un paciente con una afección pulmonar crónica, por ejemplo, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

El método puede comprender además medir el nivel de al menos un intermedio de secuestro de hierro (III) para determinar dicho nivel de actividad bacteriana.

El método puede comprender además la etapa de realizar mediciones adicionales en puntos de tiempo adicionales.

**Breve descripción de los dibujos**

- 5 La Figura 1 muestra ilustración de detección de quórum en bacterias *P. aeruginosa*. La detección de quórum entre bacterias permite a las células comunicarse químicamente. HHQ, el precursor hidrosoluble de PQS se cree que se ensambla en el periplasma (el espacio entre la membrana celular y la pared celular) a partir de componentes sintetizados en el citoplasma de la célula. El HHQ de una célula se actúa por enzimas en el periplasma de una segunda célula. Se cree que la molécula activa, PQS forma vesículas de lípidos de la membrana celular de la segunda célula. Cuando estas vesículas interactúan con la membrana celular de la primera célula, se cree que ésta proporciona una señal para empezar la producción de la maquinaria requerida para el crecimiento celular y la replicación - en otras palabras, para aumentar la velocidad del metabolismo. Esto inicia la producción de toxinas para matar las bacterias que compiten y los mecanismos para secuestrar todos los iones hierro (III) libres disponibles en la vecindad inmediata a través del uso de sideróforos y ferroxidasas. Esta última es una enzima que convierte hierro (II) en hierro (III) que necesita la célula.
- 10
- 15 La Figura 2 muestra un perfil diagramático de las fases de infección en un paciente con FQ y su sentimiento de bienestar. El paciente habitualmente solo se presenta en la clínica cuando la exacerbación ha progresado a infección completamente desarrollada.
- 20 La Figura 3 muestra la estructura química para los sideróforos identificados de *P. aeruginosa* - solo una manera en la que este patógeno puede competir por el hierro (III). Esto junto con otros intermedios de secuestro de Hierro (III) tales como la Ferroxidasa podría usarse para identificar exacerbaciones de infecciones en pacientes con FQ.
- 25 La Figura 4 muestra el perfil hipotético de la Exotoxina A y Pioverdina/Piocianina/ferroxidasa de *P. aeruginosa*.
- 30 La Figura 5 muestra el perfil hipotético de la Exotoxina A y Pioverdina/Piocianina/ferroxidasa en comparación con el bienestar del paciente después de la administración del primer antibiótico. Podría ser algunos días antes de que el paciente informe que se siente bien y esto puede no ser un buen indicador de la eficiencia del fármaco administrado para poner la infección bajo control.
- 35 La Figura 6 muestra cómo la presente invención puede reducir las líneas temporales para la evaluación empírica de las opciones antibióticas disponibles para el médico. La presente invención podría comprimir un proceso de 21 días en un proceso de 7 días, simplemente usando un dispositivo de ensayo desechable una vez al día.
- 40 La Figura 7 muestra un concepto de diseño para un dispositivo para su uso con el método de la presente invención.
- 45 La Figura 8 muestra un espectro de emisión de un paciente típico para la detección de sideróforos.
- 50 La Figura 9 muestra otro espectro de emisión que ilustra el típico pico a 340 nm.
- La Figura 10 muestra niveles de exotoxina A durante el tiempo en el paciente 5.
- La Figura 11 muestra picos de emisión a 340 nm y 460 nm durante el tiempo en el paciente 2.
- La Figura 12 muestra niveles de endotoxina, sideróforo y marcadores inflamatorios durante el tiempo en el paciente 3.
- La Figura 13 muestra los niveles de exotoxina A durante el tiempo en el paciente 3.

**Descripción detallada de la invención**

El hábitat natural de la bacteria *P. aeruginosa* no es en los hospedadores humanos - vive en el agua y sobrevive en un estado planctónico (células libres en agua) en ríos y suelo. Puede prosperar en este ambiente porque puede adaptarse rápidamente y es capaz de crecer en prácticamente cualquier superficie de alimentos basados en carbono. Incluso los químicos tóxicos a otras bacterias tales como el metanol pueden usarse por este patógeno como una fuente de carbono para soportar el crecimiento y la replicación (1). Se adapta rápidamente bajo ciertas condiciones, expresando un amplio intervalo de genes asociados al metabolismo y sometándose deliberadamente a mutación a una velocidad muy alta.

Una vez establecida en nuestros pulmones (colonización), *P. aeruginosa* se adapta cambiando el modo en que vive. Ya no en suspensión libre en los pulmones, esta bacteria secreta moco para formar biopelículas en la superficie pulmonar en la que después se esconden y se protegen a sí mismas de las defensas inmunes del propio hospedador - y de los antibióticos. Esto hace ampliamente imposible retirar *P. aeruginosa* una vez que un paciente de FQ ha sido colonizado (habitualmente en su adolescencia), que significa que este organismo se queda con el paciente de FQ para el resto de su vida, volviéndose un parásito que frecuentemente amenaza la vida del

hospedador ya que se somete a rápida mutación y evoluciona a formas incluso más virulentas.

La investigación reciente en la que el ADN bacteriano se aísla directamente del esputo se secuenció (y por lo tanto sin introducir el sesgo de subcultivo), mostró que las 10-20 cepas presentes en un único paciente compartían todas el mismo ancestro y derivaban de un único clon que después mutó. *P. aeruginosa* por lo tanto se somete a adaptación a través de mutación, presumiblemente en respuesta a los cambios en el hospedador conforme el paciente envejece y su composición pulmonar cambia con el tiempo y conforme la función pulmonar disminuye con cada inflamación inducida por infección. Cada nueva cepa que se apodera probablemente tiene una ventaja particular sobre su ancestro que la hace mejor adecuada a su ambiente siempre cambiante.

*P. aeruginosa* parece vivir en una forma de cooperación compleja entre las células de la misma cepa e incluso entre otras cepas. Han evolucionado una forma de señalización de su estado metabólico a otras células a través de un "lenguaje químico". Muchas señales químicas se han aislado e identificado y se denominan colectivamente moléculas de Señalización de Quórum de Pseudomonas (PQS, por sus siglas en inglés). Estas son estructuras moleculares complejas y son normalmente insolubles en agua lo que significa que requieren instrumentación de laboratorio compleja tal como CL EM para detectar su presencia en el esputo del paciente.

Hay muchas ideas para explicar el fin de esta señalización célula a célula, pero la teoría más popular para explicar por qué las células han desarrollado esta capacidad es que permite a una célula sentir cuándo otras a su alrededor están aumentando su actividad metabólica y están a punto de empezar un periodo de multiplicación rápida - para la bacteria, esto se llama Señal Quórum (Figura 1). Quizá el beneficio de una cepa de la bacteria de ser capaz de sentir cuándo la población bacteriana está a punto de aumentar rápidamente, es que cada cepa puede asegurar que no está fuera de la competición por los recursos por otras o que no está envenenada por la producción de exotoxinas de otra bacteria, acelerando también su metabolismo.

Para la bacteria, la Señal Quórum precede a la multiplicación rápida. Para el paciente, la Señal Quórum precede a una exacerbación. El desencadenante que provoca este cambio en el estado de la bacteria de estar bajas a altamente activas es desconocido - quizá a través de una infección vírica o algún otro cambio en la salud del hospedador paciente. Pero una vez que empieza y se deja sin tratar, una exacerbación desarrollará una infección completa en 2-4 días y normalmente antes de que el paciente no se sienta bien (Figura 2).

La respuesta del paciente a una exacerbación también puede incluir una respuesta inflamatoria, que puede ser como daño a los pulmones del paciente como la propia infección. Esto proporciona otro conjunto de biomarcadores que puede seguirse para evaluar el estado de bienestar del paciente de FQ.

Conociendo de esta manera cuándo tratar a un paciente con FQ con antibióticos para controlar una exacerbación antes de que se desarrolle en una infección completa, incluso antes de que el paciente no se sienta bien, podría reducir la gravedad de la infección cada vez que ocurra. También conocer cuándo intervenir a través de la aplicación de antibióticos es un reto tanto para los médicos como para el paciente de FQ. La sobre-prescripción de antibióticos da lugar a que las bacterias se vuelvan resistentes a los antibióticos evolucionando su capacidad más pronto. Para los pacientes de FQ, solamente hay 2 o 3 antibióticos útiles para calmar una infección pulmonar completa - y de esta manera las medicinas han de prescribirse solamente cuando sean esenciales. Esto significa que no pueden darse como un profiláctico y tomarse continuamente y esto solamente vendría seguido con el tiempo que este patógeno desarrolle la capacidad de tolerarlos.

Hay unas cuantas medidas objetivas para el bienestar de un paciente de FQ ya que un evento de exacerbación puede estar en marcha sin que el paciente se sienta enfermo. Los métodos clásicos usados para la monitorización no cuantitativa de infecciones pulmonares son: escuchar los sonidos de la respiración, rayos X y ultrasonidos y la apariencia de un cultivo de esputo (una mezcla de moco, restos y células expulsados por los pulmones). El personal clínico experimentado en soportar pacientes de FQ también se ha adaptado a evaluar el estado de un paciente observando el volumen, la viscosidad y el color del esputo de un paciente. La capacidad de realizar tales observaciones subjetivas se adquiere con los años de experiencia en la sala - una habilidad altamente especializada que también requiere que el paciente esté en la clínica.

La necesidad clínica sin cumplir es para un ensayo rápido, portátil, sencillo y de bajo coste que sea capaz de medir cuantitativamente "marcadores de exacerbación" en el esputo, la concentración del cual puede usarse para detectar una exacerbación antes de que la infección completa tenga lugar. La detección de *P. aeruginosa* en sí misma es de no beneficio ya que siempre está presente en la mayoría de pacientes de FQ. Por ejemplo, detectar la presencia de *P. aeruginosa* por qRT PCR es altamente sensible y cuantitativa para el ARNm pero no se correlaciona con el grado de la sepsis, solamente la presencia de la bacteria - y es demasiado caro y complejo para usarse de cualquier manera en un ambiente de hogar. Lo que se necesita es la capacidad de detectar el cambio en el estado metabólico de esta bacteria antes de que una exacerbación se convierta en una infección, siguiendo la concentración de los marcadores longitudinalmente en un paciente con el tiempo.

Los presentes inventores describen en el presente documento un proceso de múltiples marcadores muy sencillo que todavía no se ha aplicado en este campo: Pueden usarse combinaciones de cualquiera o todos los siguientes

marcadores; puede usarse un marcador único - preferentemente un marcador de un proceso de secuestro de hierro - como un diagnóstico inicial. Los marcadores son como sigue:

5 Marcador 1 - detecta las toxinas producidas (por ejemplo Exotoxina A) ya que son sencillas de ensayar para usar un inmunoensayo de bajo coste. La exotoxina A se produce por *P. aeruginosa* cuando está altamente activa y secreta estas moléculas complejas como venenos naturales para matar otras bacterias y de esta manera ganar una ventaja en la competición por los recursos para su propio crecimiento. La exotoxina A también es muy tóxica para el paciente, provocando síntomas de sepsis, con daño de múltiples órganos.

10 Para aumentar la precisión del presente ensayo, sería también una ventaja detectar otros marcadores además de la Exotoxina A para cuantificar la "carga bacteriana" (una indicación de la cantidad total de bacterias presentes en los pulmones y su "estado" de actividad). Las moléculas de Señalización Quórum que se comunican entre bacterias serían ideales ya que estas permitirían al médico "escuchar las conversaciones entre las células", pero son hidrosolubles y difíciles de medir sin el uso de equipo de laboratorio complejo. De esta manera los presentes inventores deben buscar algo más: un marcador secundario que sea más fácil de medir pero que esté estrechamente unido a la Señalización Quórum.

15 Marcador 2. Marcadores de secuestro de hierro del patógeno. A pesar de su resiliencia, como todas las cosas vivas, *P. aeruginosa* debe tener iones hierro (III) para prosperar. Esta necesidad da a los presentes inventores la oportunidad de encontrar una nueva "maniobra" por la que los presentes inventores pueden evaluar cuán activo es este patógeno en cualquier momento dado, además de seguir la producción de Exotoxina A. Esta nueva maniobra o biomarcador representa el Marcador 2 en el presente ensayo - una maniobra para cuán activa es la célula al almacenar iones hierro (III) o más apropiadamente, biomarcadores para los niveles de actividad del secuestro de hierro (III) por las bacterias dentro de los pulmones.

20 Los pulmones de los pacientes de FQ producen un montón de moco y además tienen fugas de sangre en los espacios de aire recubiertos por fluido de este órgano vital. Con este abundante suministro de hierro (III), *P. aeruginosa* es capaz de prosperar en pacientes de FQ (2) y pueden incluso ser la causa de anemia en pacientes de FQ (3).

30 *P. aeruginosa* tiene una multitud de mecanismos diferentes por los que secuestra hierro (III) y parece cambiar de un modo a otro en respuesta a la condición siempre cambiante del hospedador. Es por lo tanto demasiado simplista seleccionar solamente un marcador único y de esta manera los presentes inventores tomarán una aproximación multiplexada.

35 Marcadores sencillos y fáciles para el ensayo de actividad de secuestro de hierro (III): Los marcadores más fáciles para cuantificar son los cofactores enzimáticos bacterianos o "sideróforos" que se producen en cantidades copiosas antes de una exacerbación como una "señal secundaria" - esto es, se producen en altas concentraciones solamente durante periodos de crecimiento activo. *P. aeruginosa* secreta diversos pigmentos, incluyendo Píocianina (azul-verde), Pioverdina (amarillo-verde y fluorescente) y Piorubina (rojo-marrón) (Figura 3). Bajo el microscopio, *P. aeruginosa* normalmente se identifica de forma preliminar por su apariencia nacarada y su olor como a uvas. La identificación clínica de *P. aeruginosa* normalmente incluye identificar la producción tanto de Píocianina como de Pioverdina, así como su capacidad para crecer a 42 °C.

45 Estos sideróforos tienen una afinidad muy alta por el ion hierro (III) y se cree que están implicados en el mecanismo por el que estas bacterias absorben el hierro esencial para el crecimiento (4). La capacidad de secretar estos secuestradores de hierro en el ambiente inmediato alrededor de las células da a la bacteria una ventaja en que puede "coger y atrapar" el hierro que necesita desesperadamente para la rápida división celular y la producción de proteínas. Medir la concentración de estas moléculas coloreadas puede ser un biomarcador fácil para perfilar la actividad de secuestro de hierro.

50 La pioverdina debe ser muy fácil porque es fluorescente - esta fluorescencia puede inactivarse añadiendo iones hierro (III). También puede detectarse en el esputo usando una reacción de competición con un tinte de unión a hierro (III) llamado reactivo cromo azurol S (CAS) en un ensayo espectrofotométrico (5). Los sideróforos también podrían detectarse a través del uso de un inmunoensayo, aunque ninguno se ha desarrollado todavía. La cuantificación de la Pioverdina en el esputo usando detección óptica (absorción de fluorescencia) requiere la extracción con disolventes debido a que el moco opaco grueso interfiere con la medición y no se presta a dispositivos sencillos para uso en casa, pero puede usarse en el laboratorio de los presentes inventores al realizar los ensayos iniciales de factibilidad.

60 De hecho, Huston et al (6) ya han realizado estudios similares en los que descubrieron que la concentración de sideróforos producidos por cultivos de bacterias aisladas de pacientes con FQ y crecidos en medios de cultivo, variaron considerablemente entre pacientes. Perfilaron la concentración de los sideróforos a partir de aislados de una única muestra de paciente después los cultivaron en el laboratorio, en lugar de medir la concentración de sideróforos directamente en el esputo y después perfilar una serie de muestras del mismo paciente. Por lo tanto no observaron los cambios relativos en la concentración para cada paciente, a partir de una serie de muestras tomadas antes, durante y después de una exacerbación. Huston et al, trabajando sin el beneficio del co-funcionamiento cercano con un médico experto, concluyeron que los sideróforos no pueden usarse como un biomarcador para la

exacerbación. Esta aproximación es defectuosa y se ve repetidamente en la bibliografía científica. Esto surge porque los bioquímicos que realizan la investigación se desconectan de sus compañeros en la clínica. Estudiar los patrones de expresión de las células crecidas en el tubo de ensayo es espurio: los presentes inventores pueden hacer que estas células hagan casi cualquier cosa que quieran cambiando sus condiciones de crecimiento y sin el ancla de la relevancia clínica, esta información es de poco valor en las herramientas clínicas en desarrollo. Estos patógenos son adaptables - si el investigador cambia su medio de crecimiento, las células cambian su comportamiento. Lo que se requiere es ir directamente a la muestra clínica y resolver el problema de cómo medir los marcadores en el esputo en lugar de usar cultivos de células producidos en medios artificiales.

Huston et al concluyeron que todavía otra ruta de secuestro de hierro (III) que implica la enzima bacteriana ferrioxidasa que se secreta en el periplasma de la bacteria era el biomarcador correcto a perfilar. Lo que estos bioquímicos fallaron es que la actividad total de la bacteria al almacenar hierro (III) que es el mejor biomarcador y requiere preferentemente una aproximación multiplexada si se va a crear una herramienta adecuada para todos los pacientes, con sus diferentes cepas, todas las cuales están en diferentes etapas de evolución dentro de sus hospedadores.

Así como los dos marcadores preferidos, las toxinas y los marcadores de secuestro de hierro, puede ser posible incluir marcadores adicionales en el ensayo:

Marcador 3. Marcadores de secuestro de hierro por el hospedador. En gente sana, los pulmones previenen que los iones hierro (III) se acumulen en el fluido que reviste las superficies pulmonares de tal manera que las bacterias no puedan tomar ventaja y crecer. Absorbiendo iones hierro (III) de un número de modos que incluyen: la producción de proteínas de unión a hierro llamadas lactoferrina, ferritina y transferrina, nos protegemos haciéndolo escaso para los patógenos invasores - una forma muy eficaz de defenderse contra la enfermedad. También rompemos el hemo, el grupo prostético que consiste en un átomo de hierro contenido en el centro de un gran anillo orgánico heterocíclico llamado una porfirina. Los hemos se ven más comúnmente como componentes de la hemoglobina, el pigmento rojo en la sangre, pero también son componentes de un número de otras hemoproteínas. En la competición con las bacterias, el hospedador produce la enzima hemo mono oxigenasa (aka Ferridoxinasa) que rompe el hemo en iones hierro (que no pueden absorberse por las bacterias), biliverdina (un pigmento amarillo) y monóxido de carbono. Siguiendo los cambios en los niveles de enzima o bien de biliverdina en el esputo, puede determinarse la actividad de las defensas naturales del hospedador contra este patógeno.

Marcador 4. Respuesta inflamatoria: citocinas. Los marcadores de citocina se han informado en la bibliografía extensamente. En particular, los marcadores TNF $\alpha$  e IL-8 ya se han usado para perfilar patentes en los laboratorios de los presentes inventores. La enfermedad de las vías aéreas en quístico se caracteriza por un ciclo continuo de infección e inflamación crónicas dominadas por un infiltrado neutrófilo. Esta inflamación se caracteriza por una producción aumentada de citocinas pro-inflamatorias en el pulmón. La relación entre el producto génico anormal CFTR y el desarrollo de inflamación y avance de enfermedad pulmonar en la FQ no se entiende completamente. Courtney et al (7) revisan los mecanismos de la inflamación pulmonar en la FQ, los perfiles de las citocinas y los mediadores inflamatorios en el pulmón en la FQ y los mecanismos que pueden predisponer a la infección crónica de *P. aeruginosa*. Los desequilibrios de la secreción de citocinas se entienden mejor ahora debido a los avances en el entendimiento de la FQ a un nivel molecular y se cree cada vez más que el proceso inflamatorio normal está trastornado en la FQ pronto en el transcurso de la enfermedad y puede ocurrir en ausencia de infección detectable.

Una combinación de marcadores para una mayor precisión.

Incorporando los ensayos para marcadores bacterianos para la producción de toxinas y el secuestro de hierro, en un ensayo sencillo, multiplexado, los presentes inventores serán capaces de evaluar de forma precisa el estado metabólico de *P. aeruginosa* en muestras de esputo en la vida real y por lo tanto, en los pulmones del paciente. Además, midiendo la respuesta por el hospedador en el secuestro de hierro y la inflamación mediada por citocinas, los presentes inventores tienen otro medio objetivo para la determinación del estado del paciente de FQ. Véase la tabla 1.

Tabla 1. Resumen de múltiples marcadores útiles en el perfilado longitudinal preciso de pacientes de FQ

Patógeno	Hospedador
Producción de toxinas - Exotoxina A	Ninguno
Secuestro de hierro: sideróforos	Secuestro de hierro: (b) Hemo mono oxigenasa
Hemo mono oxigenasa	(c) Biliverdina
Respuesta inflamatoria	Respuesta inflamatoria: citocinas



Este enfoque resuelve el problema de baja precisión asociado a los ensayos rápidos para *C. difficile* que se describen anteriormente. De hecho, este enfoque para entender las rutas metabólicas de un patógeno e identificar los indicadores secundarios a usarse en combinación con la detección de toxinas bacterianas, puede aplicarse a muchos patógenos diferentes tales como *Staphylococcus aureus*, un segundo patógeno común en los pacientes de FQ.

La opinión de los presentes inventores es que el uso de ensayos cuantitativos para perfilar las cuatro clases de biomarcador, cuantitativamente y en análisis longitudinal de cada paciente, la concentración realizada en el esputo sin tratar (en lugar de una muestra de sangre invasiva o células cultivadas en medios de crecimiento no representativos) para determinar la carga bacteriana de *P. aeruginosa*, es tanto precisa como sensible (Figura 4).

La aproximación de los presentes inventores para cuantificar estos biomarcadores más pequeños es mucho más fácil de desarrollar y envasar en un dispositivo que la detección de la propia bacteria, que requiere proteínas u otras dianas a liberarse desde las células o las membranas celulares - un enfoque más complejo y desafiante para incorporar a un ensayo barato de casa o de sala.

Además, si el perfil combinado de las cuatro clases de marcadores en el esputo se correlaciona con el rendimiento de la función pulmonar como los presentes inventores anticipan, se piensa que se tiene una tecnología de exploración sencilla que permitiría a los pacientes predecir una exacerbación, para manejar mejor su afección en casa que la que puede lograrse en el presente y daría a los proveedores del cuidado de la salud una herramienta que producirá intervenciones más tempranas.

Una ventaja adicional de las realizaciones de la presente invención es que permitiría a los médicos ser capaces de monitorizar la eficacia del tratamiento antibiótico en el día 2-3 de administración - mucho más rápido que la práctica actual. Si la carga bacteriana se disminuye después del tratamiento, el antibiótico debe ser eficaz y viceversa. La evidencia clínica indica que incluso cuando un antibiótico está poniendo la infección bajo control, puede ser algunos días antes de que el paciente ya informe que se siente bien. El sentido de "bienestar" puede no correlacionarse estrechamente con el rendimiento del antibiótico que se administra en los primeros y críticos días después de la administración (Figura 5).

Quizá el beneficio clave de la presente invención para el médico que trata es la capacidad de monitorizar objetivamente el rendimiento del antibiótico seleccionado, siguiendo el cambio en la concentración de los biomarcadores. Si los niveles de Exotoxina A y Pioverdina/Piocianina/ferrioxidasa NO caen, esto indica que el antibiótico no es eficaz. En lugar de esperar 7 días a ver si el paciente se recupera, el Médico puede decidir cambiar a un segundo antibiótico solo después de 2 días etcétera, hasta que se llegue a una estrategia eficaz. Potencialmente, esto podría reducir un proceso de 21 días a un proceso de 7 días, reduciendo la inflamación y por lo tanto salvando el tejido pulmonar, reduciendo las admisiones hospitalarias y la ocupación de camas hospitalarias (Figura 6).

Aunque la presente invención puede realizarse como ensayos separados en muestras de esputo separadas, sería más conveniente para el usuario tener los 3 ensayos realizados juntos en un único ensayo de "tipo varilla", por ejemplo.

Un concepto de diseño para un ensayo único tal se muestra en la Figura 7. El ensayo puede incorporar bien un biosensor o un dispositivo de flujo lateral. Cualquier aproximación requerirá un elemento electrónico reutilizable para cuantificar la señal generada.

#### Datos experimentales

Como una prueba del concepto de lo anterior, los presentes inventores perfilaron muestras de esputo de 5 pacientes diferentes. Para pacientes colonizados con *P. aeruginosa*, se detectó una exacerbación de la infección perfilando el nivel de Exotoxina A en el esputo 7 o más días antes de que el paciente se sintiera tan mal que se presentase por sí mismo en la clínica. Los presentes inventores han demostrado que la eficiencia del tratamiento con un antimicrobiano comparado con otro, puede determinarse a través del perfilado longitudinal de la Exotoxina A en el esputo. Los presentes inventores identificaron dos posibles biomarcadores fluorescentes presentes en el esputo. Uno se identificó confidientemente como un sideróforo producido como un secuestrador de hierro y/o molécula de señal quórum por la bacteria. Su producción precede a una exacerbación en un paciente perfilado. La identidad de la segunda molécula es actualmente desconocida. Cuando esta segunda molécula estaba presente en altas concentraciones, los sideróforos producidos por las bacterias no eran detectables. La presencia de estos dos marcadores parece ser mutuamente exclusiva. Los presentes inventores especulan que es un compuesto (o compuestos) producido por el hospedador ya que estaba presente en los esputos de pacientes de FQ quienes eran tanto positivos como negativos a *P. aeruginosa*.

Los presentes inventores perfilaron dos marcadores adicionales para la inflamación producidos por el hospedador - las citocinas IL8 y TNF $\alpha$ . Aunque los marcadores útiles, inflamatorios no parecían ser buenos predictores de una exacerbación - información en sí misma altamente valiosa - pero sus niveles mostraron una disminución marcada

durante la terapia antimicrobiana exitosa.

Se obtuvieron muestras de esputos diarias de cinco pacientes.

5 Se seleccionaron cinco biomarcadores que tenían la probabilidad más alta de ser útiles actuando como sustitutos para la virulencia de un patógeno colonizador. La virulencia es una combinación de la cantidad de bacterias presentes (la carga, no la concentración) y su actividad *in situ* en el pulmón. Los presentes inventores seleccionaron como biomarcadores moléculas que juegan papeles clave en la capacidad de la bacteria de prosperar y multiplicarse o son moléculas producidas por el hospedador (el paciente) en respuesta a la infección o como parte de su defensa  
10 contra la infección. Los presentes inventores por lo tanto intentaban crear "imágenes instantáneas" de la situación cuando se tomaba la muestra.

Los biomarcadores se listan en la tabla 2 a continuación:

Marcador del patógeno	Marcador del hospedador
Producción de toxinas - Exotoxina A	Ninguno
Secuestro de hierro:	Secuestro de hierro:
Sideróforo	Hemo mono oxigenasa
	Biliverdina/bilirrubina
	Respuesta inflamatoria:
	Citocina IL-8
	Citocina TNF- $\alpha$
	Lactoferrina

15 La precedencia para el uso de toxinas bacterianas como marcadores para la infección está bien establecida, por ejemplo, las Toxinas A y B de *C. difficile*. La debilidad de usar uno cualquiera de estos por sí mismos como marcadores únicos en la detección de *C. difficile* se ha reconocido ahora: estos ensayos POC rápidos ofrecen una  
20 precisión del 80-85 % de precisión de detección en comparación con el cultivo celular (que en 78 horas es demasiado lento). Algunas muestras simplemente no contienen Toxinas A/B en cantidades detectables y esto limita la precisión de estos ensayos.

25 En contraste, se ha informado el uso de sideróforos (moléculas producidas por la bacteria que está implicada en la señalización celular y secuestrar el hierro, y por lo tanto son esenciales para el crecimiento rápido) como un posible biomarcador - con resultados mixtos. No todos los aislados de *P. aeruginosa* del esputo de pacientes de FQ producen esta molécula fluorescente. La teoría de los presentes inventores es que las bacterias colonizadoras mutan durante la vida del hospedador, se adaptan. Conforme el paciente envejece y padece cada vez más daño pulmonar y tiene mayor sangrado en los pulmones, se reduce la necesidad de la bacteria de gastar energía  
30 secuestrando hierro, y los clones no productores de sideróforos tienen una ventaja selectiva. Esto puede explicar por qué algunos pacientes tienen colonias bacterianas que carecen de la capacidad de producir sideróforos - no los necesitan ya que es metabólicamente caro para las bacterias producirlos. De esta manera los sideróforos en sí mismos no son marcadores confiables para todos los pacientes. Por lo tanto un enfoque que explote una combinación de marcadores de procesos muy diferentes llevados a cabo por las bacterias es útil y da mayores  
35 oportunidades para capturar una instantánea precisa, independientemente del estado de la mutación de la bacteria de tipo silvestre original que colonizó al paciente en su adolescencia.

40 Para proteger nuestros pulmones de los patógenos invasores, los mamíferos han evolucionado mecanismos para retirar el hierro del moco que reviste las paredes del tejido pulmonar expuesto al aire. Estos procesos (y hay muchos) rompen la hemoglobina de la sangre que puede filtrarse en los fluidos que cubren las superficies pulmonares, en hierro (II) desde el hierro (II) del que las bacterias requieren para el crecimiento rápido. Esto hace al hierro no disponible porque las bacterias no pueden tomar hierro en la forma hierro (II). Los subproductos de la rotura, catalizados por muchas enzimas pero principalmente la Hemo mono oxigenasa, resultan en la producción de pigmentos coloreados biliverdina y bilirrubina - más habitualmente vistos en nuestros moretones. Siguiendo a la  
45 producción de estos pigmentos o la actividad de la enzima hospedadora que cataliza este proceso y por lo tanto funciona para defendernos a través del secuestro de hierro, es otro marcador.

Finalmente, los presentes inventores seleccionaron citocinas - pequeñas moléculas producidas por el hospedador como parte de una respuesta inflamatoria a los patógenos invasores y sus toxinas. Las citocinas IL8 y TNF $\alpha$  se han  
50 detectado en el esputo de pacientes de FQ por otros trabajadores.

## Desarrollo de la prueba

Todas las pruebas requerían preparación similar de las muestras para retirar el moco interferente. Los presentes inventores exploraron diversos métodos para retirar este material no homogéneo, incluyendo rotura mecánica, digestión química y separación por ultracentrifugación. Una combinación de digestión química y homogeneización funcionó bien para los ensayos basados en inmunoensayos. Esta etapa más una etapa adicional de precipitación de moléculas orgánicas (ADN, grasas y proteínas) se requirió para la prueba de sideróforos. **IL8 y TNF $\alpha$** : La prueba usada fue un kit comercial de Millipore que usa la tecnología de inmunoensayo de perlas Luminex. Todas las muestras se perfilaron para estos dos biomarcadores.

**Exotoxina A:** En la prueba final de Exotoxina A, se digirió químicamente el esputo completo y se ensayó "en bruto" con un inmunoensayo. Los presentes inventores fueron capaces de perfilar pacientes y demostrar que la Exotoxina A puede usarse como un marcador para predecir la exacerbación y seguir el control de la infección después de la iniciación de terapias antimicrobianas.

**Sideróforos.** Se han identificado varios compuestos y clasificado como sideróforos y tienen diversos nombres que incluyen: piocianina (azul-verde), fluoresceína (amarillo-verde y fluorescente, ahora conocida también como pioverdina) y piorubina (rojo-marrón). Estos tienen espectros de absorción y de fluorescencia característicos. Los informes previos en la bibliografía de la determinación de los niveles de éstos en los esputos, implicaban el uso de procesos de limpieza cromatográfica y / o marcaje químico complejos. Estos son muy caros para estudios a gran escala. Los presentes inventores desarrollaron un método muy sencillo en el que estas moléculas se separaban del moco, las proteínas y el ADN usando una precipitación de etapa única sencilla con pequeños volúmenes de disolvente que después se retiraba por evaporación. Este proceso sencillo podría ser fácilmente automatizado. La etapa de precipitación retiró la coloración verde normalmente asociada a muestras de pacientes infectados y de esta manera los pigmentos resultantes que se midieron no eran proteínas tales como la hemoglobina o el alginato, sino que eran fácilmente solubles en agua y disolventes orgánicos. Estas son probablemente moléculas orgánicas con grupos laterales polares.

La optimización considerable del proceso de preparación de muestras será posible en iteraciones futuras, pero sin embargo y a pesar de estas limitaciones, se lograron límites de detección para la Exotoxina A de 0,1 ng/ml en esputo completo. Los valores de 20 ng/ml y superiores se correlacionaban estrechamente con pacientes que estaban poniéndose enfermos y que requerían tratamiento con antimicrobianos. Los valores superiores de 160 ng/ml en sangre se habían informado en la bibliografía. Hay un ámbito considerable para mejorar los límites de detección de esta prueba. Con los propios reactivos de los presentes inventores y los procesos y pruebas de preparación de muestras completamente optimizados, los presentes inventores anticipan lograr límites de detección de 1 ng/ml en un ensayo de 10 minutos. Los presentes inventores pronostican que esto permitirá detectar la Exotoxina A antes de que el paciente no se sienta bien, dando un aviso avanzado de 7-10 días de una exacerbación inminente.

## Resultados

Los espectros de fluorescencia se tomaron para cada una de las 260 muestras para detectar y cuantificar la concentración relativa de la población de sideróforos en el esputo. La Figura 8 muestra el espectro de emisión de la fracción extraída del esputo de pacientes típico de los sideróforos informados en la bibliografía científica. La excitación fue a 300 nm y la emisión se exploró de 320 nm a 500 nm. Las unidades grabadas fueron Unidades de Fluorescencia Relativas (RFU, por sus siglas en inglés). Este espectro fue de una muestra de esputo tomada del Paciente 2 hacia el final de su periodo perfilado.

Los presentes inventores también estaban sorprendidos de descubrir otra entidad con una huella espectral muy distinta que tenía un pico característico en 340 nm con una excitación de 280 nm. La concentración de este material en algunas muestras fue tan alto que parecía naranja en la coloración. La Figura 9 muestra un pico característico a 340 nm con una excitación de 280 nm. Nótese el ligero indicio de un pico a 410 nm. Este espectro se grabó a partir del Paciente 2 al inicio de su periodo perfilado. Este pico de 340 desapareció completamente del esputo de este paciente hacia el final de su periodo perfilado.

La identidad del pico 340 se mantiene desconocida, pero el espectro es característico de productos de rotura hemo y sugiere que los pacientes con altas concentraciones de este material están sangrando en sus pulmones. Esto NO es un producto del patógeno se conformó cuando se analizaron las muestras de esputo de los pacientes de FQ enfermos que eran negativos para *P. aeruginosa* y se encontró que también contenían este pico.

## Perfiles biomarcadores en 5 pacientes de FQ.

Los presentes inventores perfilaron los esputos de 5 pacientes. Los voluntarios se alentaron a dar una muestra cada día; sin embargo hubo periodos durante los que las muestras no se recogieron y por lo tanto hay saltos en la fecha.

Los valores de cada biomarcador se representaron en gráficos ajustados a la misma escala, para hacer más fáciles de hacer las comparaciones entre pacientes. Estos gráficos se anotaron después con la historia del paciente,

grabando informes de bienestar o enfermedad, tratamiento con antimicrobianos orales e IV y la admisión a la clínica.

IL8 y TNF $\alpha$ : los niveles expresados variaron considerablemente. En general, los niveles aumentaron durante una exacerbación, pero no eran predictivos de una exacerbación inminente. Notablemente los niveles de ambas citocinas disminuyeron durante el tratamiento con antimicrobianos, especialmente cuando el paciente se trató en la clínica.

Exotoxina A: dos periodos para diferentes pacientes demostraron la prueba del concepto al resolver los problemas centrales.

Pico 460: biomarcador adicional para soportar la Exotoxina A, especialmente para aquellos que gozan de buena salud durante periodos más largos. Se observó en un paciente que estaba bien durante el periodo perfilado.

Pico 340: útil evaluando el bienestar (vulnerabilidad) de los pacientes a la exacerbación.

**Problema 1: Advertencia temprana de la exacerbación.**

**Exotoxina A como marcador.** El paciente 5 mostró niveles elevados de Exotoxina A pero informó estar bien durante la visita clínica rutinaria. 14 días después el Paciente 5 informó estar enfermo y se admitió. La Figura 10 muestra este perfil de Exotoxina A del paciente. Los valores se elevaron antes de visitar a la clínica cuando se informó estar bien. Los niveles continuaron elevándose. 14 días después el Paciente 5 informó no estar bien y se administraron antibióticos IV. Los niveles de Exotoxina A caen durante el tratamiento IV.

**Sideróforo como marcador.**

El paciente 2 mostró presencia del pico 340 al inicio del periodo de perfilado. Estos niveles caen a cero con el aumento concomitante en el pico 460. El paciente informó estar enfermo 5 días después. Los antimicrobianos IV se administraron 10 días después de esto. La Figura 11 muestra los resultados de este paciente.

**Problemas 2 & 3: Toma de decisión temprana acerca de la eficacia de una terapia antimicrobiana y retroalimentación objetiva acerca de la calidad de la auto-gestión en casa.**

El paciente 3 proporcionó muestras que abarcaban un periodo de tratamiento de antibiótico oral, tres periodos de tratamiento IV y la admisión en la clínica. Hay una riqueza de información que se resume en la Figura 12.

**Exotoxina A:** El paciente 3 no está bien el día 17 de noviembre y comienza los antimicrobianos orales el 19 de noviembre (véase la Figura 13). El tratamiento se cambió a antimicrobianos IV el 25 de noviembre. Los niveles de Exotoxina A continuaron elevándose durante el tratamiento IV en casa. El paciente 3 informó "sentirse mejor pero no bien" y se admitió el día 9 de diciembre. Una vez en la clínica, se cambió el tratamiento a un antimicrobiano alternativo. Los niveles de Exotoxina A disminuyeron a la línea de base inmediatamente.

**Picos 340 y 460:** El paciente 3 mostró niveles elevados del pico 340 a lo largo de todo. No se detectó pico 460. Esto fue un tema común para todos los pacientes con la excepción del Paciente 2. Con la excepción del Paciente 2 (varón de 21 años), todos estaban enfermos y estaban tratándose con antimicrobianos durante su periodo de perfilado incluyendo el Paciente 4 (mujer de 21 años melliza del Paciente 2). Estos pacientes se seleccionaron para este estudio porque están regularmente enfermos. Los presentes inventores asociaron altos niveles de pico 340 durante una larga duración de pacientes estando enfermos - quizá un riesgo de exacerbación o propensión a la exacerbación. El paciente 3 se ajusta a esta hipótesis.

**Conclusiones del perfilado.**

El perfilado longitudinal del esputo de pacientes de FQ - un fluido corporal fácilmente disponible y por lo tanto más propenso a disfrutar de la conformidad del paciente a un régimen de ensayo - puede resolver los Problemas 1, 2 y 3 (necesidades sin cumplir):

- El perfilado de Exotoxina A puede usarse para predecir exacerbaciones en + de 7 días como se demuestra por los pacientes 3 y 5.
- Los sideróforos no pueden detectarse en todos los pacientes, especialmente aquellos consistentemente enfermos. Pero para aquellos que están bien (y por lo tanto no muestran el pico 340), podría ser un co-marcador útil para la Exotoxina A (Paciente 2).
- El pico 340 y el pico 460 son mutuamente excluyentes (Paciente 2).
- Los pacientes más jóvenes (2 y 4 que eran mellizos) tienen concentraciones similares (y bajas) de pico 340, mientras que los otros pacientes más mayores tenían niveles altos que se mantenían consistentemente a lo largo de todo. Los presentes inventores asocian los niveles consistentes de pico 340 con enfermedades regulares.
- La Exotoxina A puede usarse como marcador para la eficiencia de terapias antimicrobianas. El ejemplo del Paciente 3 en el que un cambio en el tratamiento llevó una reducción durante la noche en los niveles es

convicente.

- Los niveles de citocinas caen durante el tratamiento pero pueden mostrar una respuesta demasiado generalizada en el perfilado para el fin de resolver los problemas 1-3.

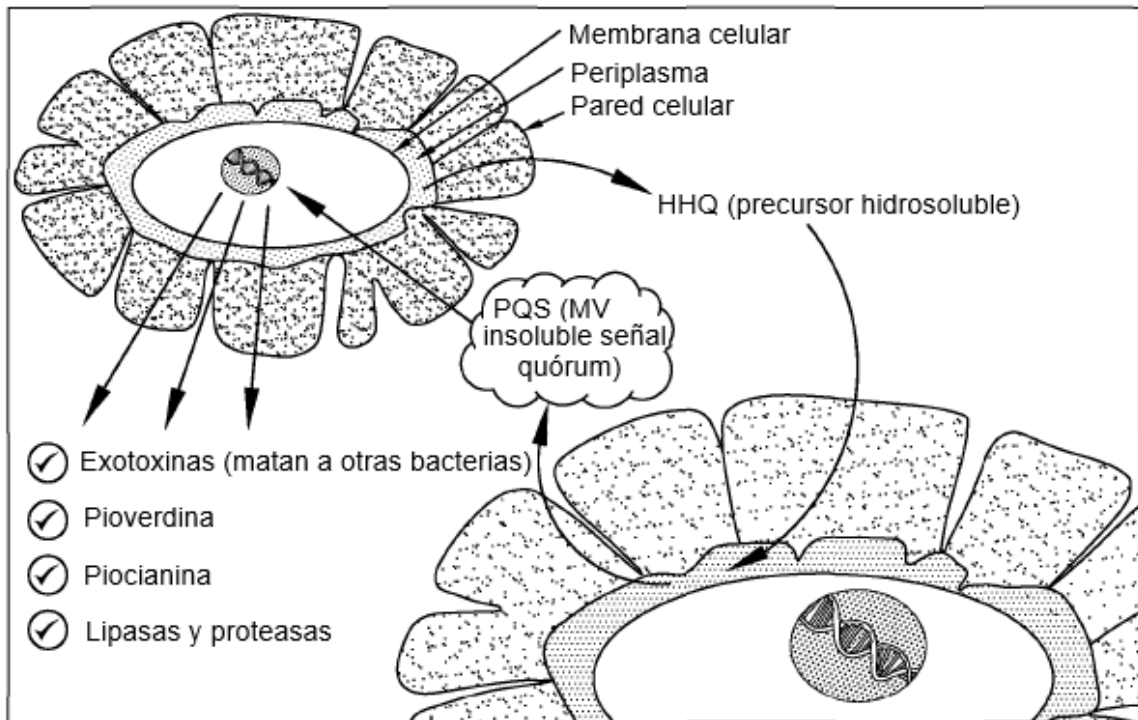
5 En conclusión, un ensayo ideal sería una combinación de dispositivos de flujo lateral, uno para la Exotoxina A, uno para el compuesto o compuestos del pico 340 y uno para los sideróforos (compuestos del pico 460). Los pacientes con compuestos del pico 340 consistentemente alto se considerarían ser vulnerables a exacerbación y se monitorizarían estrechamente. Cualquier aumento en los niveles de Exotoxina A de estos pacientes desencadenaría la administración inmediata de antimicrobianos orales (Día 1) y el ensayo dos veces al día. El fallo al reducir los niveles desencadenaría la administración de antimicrobianos IV en casa (Día 3). El fallo al reducir los niveles instigaría el tratamiento en la clínica, quizá con un antimicrobiano alternativo (Día 5). Una vez en la clínica, los ensayos de Exotoxina A confirmarían la eficiencia del tratamiento seleccionado y proporcionarían seguridad de que la infección estaría bajo control, dando confianza a la liberación temprana del paciente para cuidarse en casa. El tratamiento en marcha en casa se monitorizaría y cualquier relapso (debido a la mala auto administración del medicamento, por ejemplo) se señalaría por los niveles aumentados de Exotoxina A.

#### Referencias

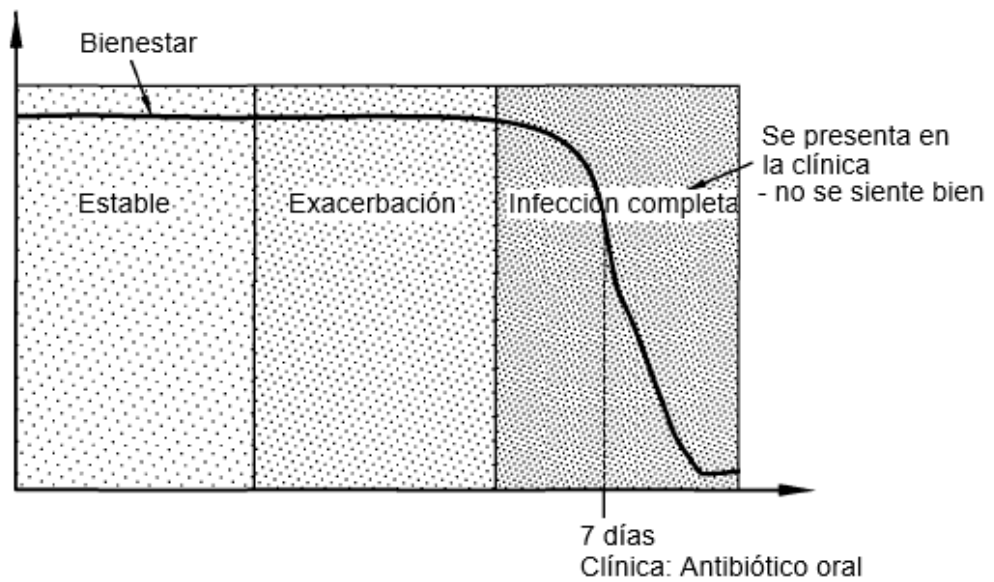
1. Auton, K. Ph.D Thesis 1988. Southampton University
- 20 2. Lamont IL, Konings AF, Reid DW. *Biometals*. 2009 Feb;22(1):53-60. Epub 7 Ene 2009
3. Reid DW, Withers NJ, Francis L, Wilson JW, Kotsimbos TC, Chest. 2002 Ene;121(1):48-54
4. Haas, Kraut, Marks, Zanker, Casignetti *INFECTION AND IMMUNITY*, Nov. 1991, p. 3997-4000
5. Schwyn B, Neilands JB. *Anal Biochem*. 1987 Ene;160(1):47-56
6. Huston, Potter, Jennings, Rello, Hauser, McEwan. *J Clin Microbiol*. 2004 June; 42(6): 2806-2809.
- 25 7. Courtney, JM, Ennis, M and Elborn, JS. *Journal of Cystic Fibrosis Volumen 3, Artículo 4, Páginas 223-231, Diciembre 2004*

**REIVINDICACIONES**

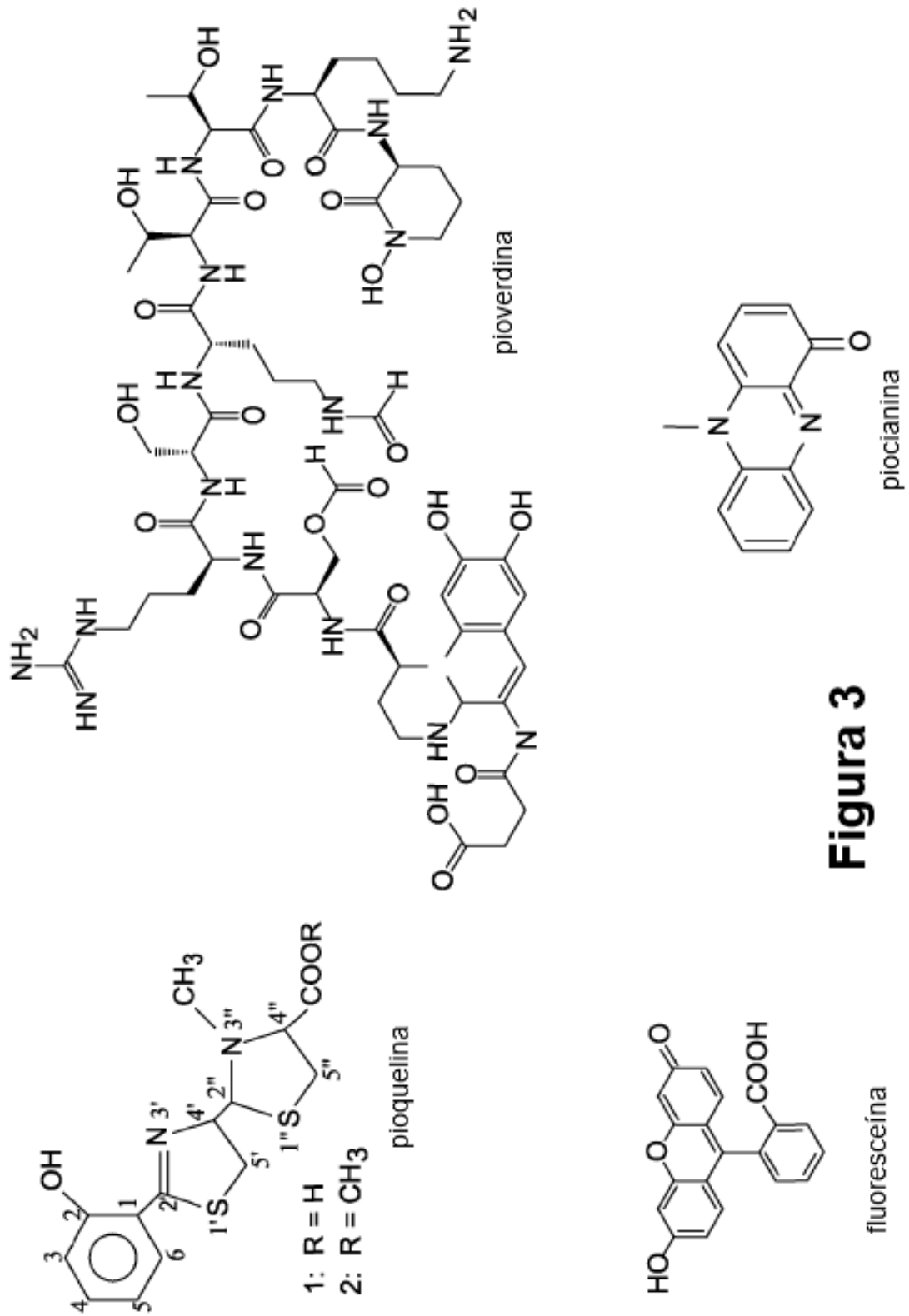
- 5 1. Un método *in vitro* para determinar un nivel de actividad de bacterias *Pseudomonas aeruginosa* en el pulmón de un paciente, comprendiendo el método:
  - realizar una primera medición en un primer momento de un nivel de al menos un marcador de un proceso de secuestro de hierro bacteriano y de al menos una proteína bacteriana secretada en una muestra de esputo del pulmón;
  - 10 realizar una segunda medición en un segundo momento de los niveles de dicho marcador y dicha proteína bacteriana secretada en una muestra de esputo del pulmón; y
  - determinar dicho nivel de actividad bacteriana a partir de los cambios en dichos niveles medidos de dicho marcador de un proceso de secuestro de hierro bacteriano y dicha proteína bacteriana secretada a lo largo del tiempo, en donde el marcador de un proceso de secuestro de hierro bacteriano es un sideróforo y la proteína bacteriana secretada es la exotoxina A.
- 15 2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1 en el que dicho sideróforo se selecciona de pioquelina, pioverdina, piocianina.
- 20 3. Un método como se reivindica en las reivindicaciones 1 o 2 que comprende además medir el nivel de al menos un intermedio de secuestro de hierro (III) para determinar dicho nivel de actividad bacteriana.
- 25 4. Un método como se reivindica en una cualquiera de las realizaciones 1 a 3 en el que dicho sideróforo es pioverdina.
- 30 5. Un método *in vitro* para predecir una exacerbación de un nivel de actividad bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* en el pulmón de un paciente; comprendiendo el método realizar una serie temporal de mediciones de actividad bacteriana en dicho paciente usando un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y usar dicha serie temporal de mediciones para predecir dicha exacerbación.
- 35 6. Un método *in vitro* para determinar la eficacia de un tratamiento antibiótico de una infección pulmonar bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*, comprendiendo el método realizar una serie temporal de mediciones de actividad bacteriana en un paciente, que se somete a dicho tratamiento por una infección pulmonar, usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y determinar dicha eficacia a partir de un perfil temporal de dicho nivel de actividad bacteriana.
- 40 7. Un método como se reivindica en la reivindicación 6 que comprende determinar que dicho tratamiento antibiótico es ineficaz si dicho nivel o actividad bacteriana no cae con el tiempo.
- 45 8. Un método según cualquier reivindicación anterior en el que dicho marcador tiene una concentración dependiente de un nivel de señalización quórum entre dichas bacterias de *Pseudomonas aeruginosa*.
9. Un método según cualquier reivindicación anterior que comprende además la etapa de a) detectar un marcador del hospedador de un proceso de secuestro de hierro; y/o b) medir el nivel de una respuesta inflamatoria de dicho paciente.
10. Un método según la reivindicación 9 en el que el marcador del hospedador de un proceso de secuestro de hierro es un producto hemo o de rotura de hemo.



**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**



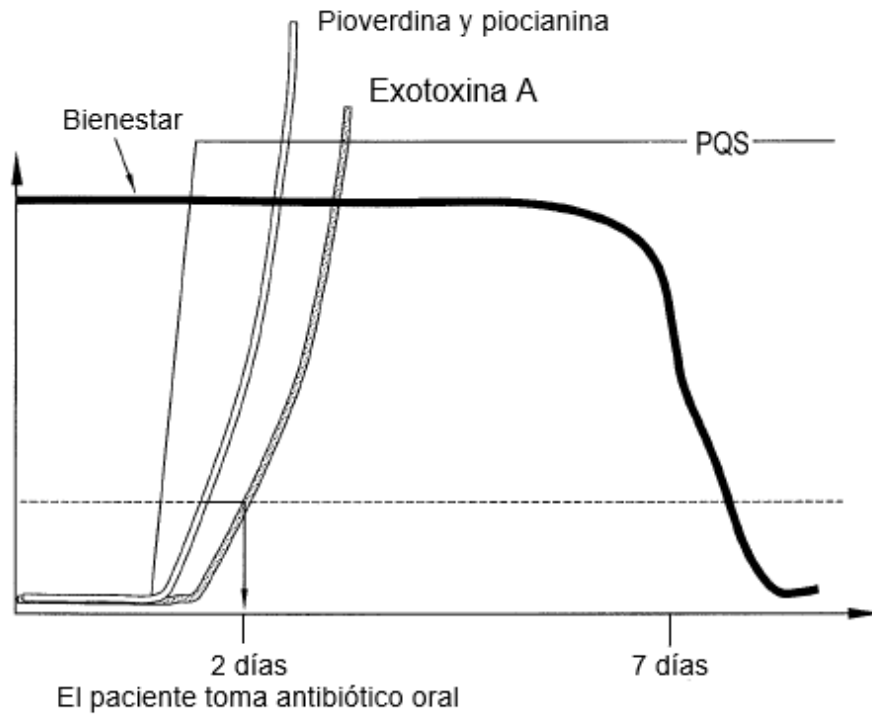


Figura 4

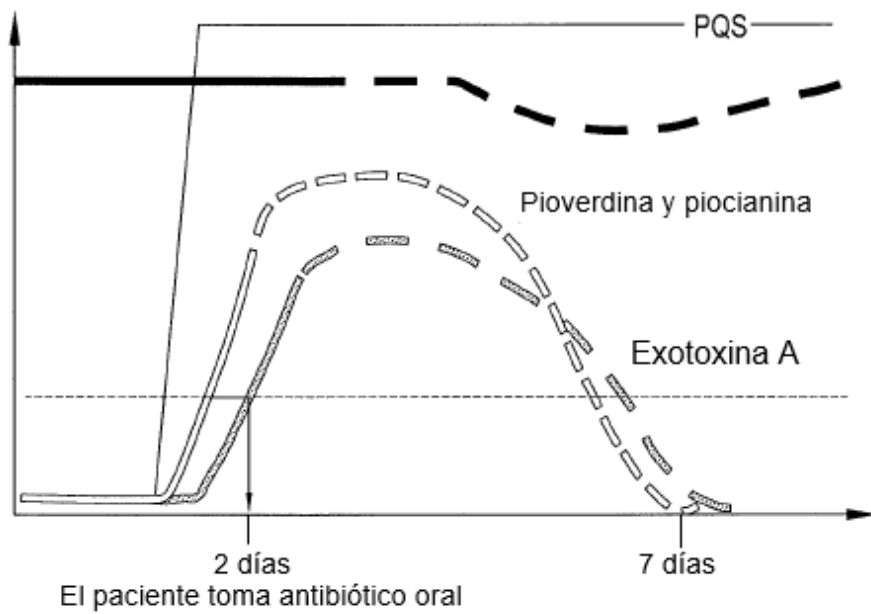


Figura 5

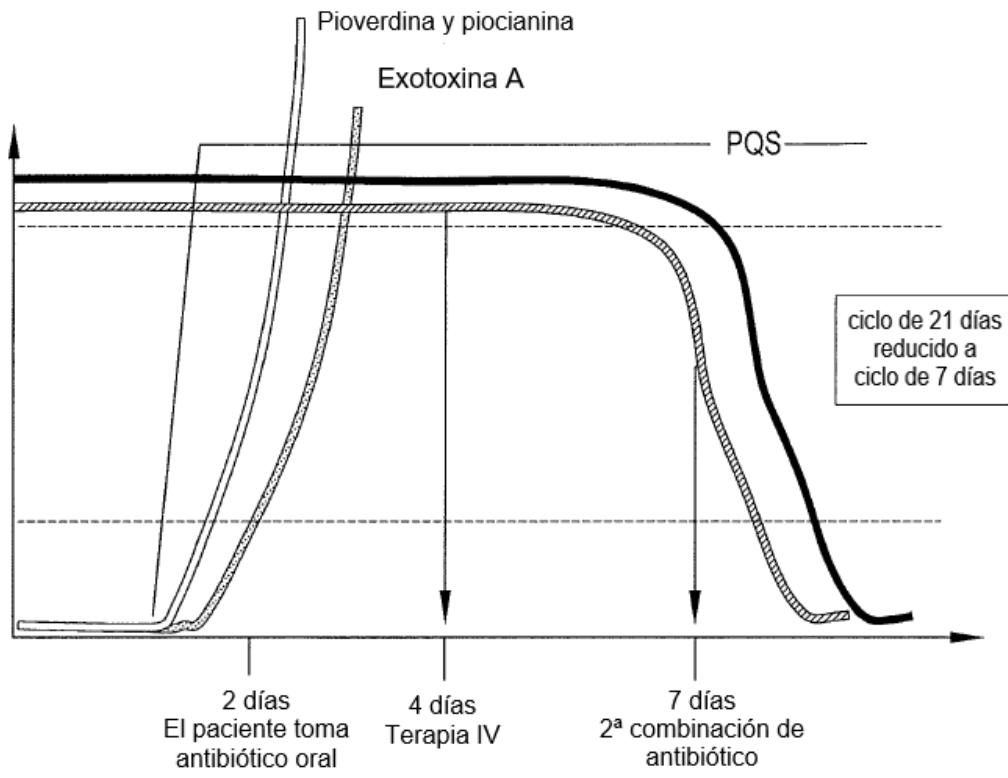
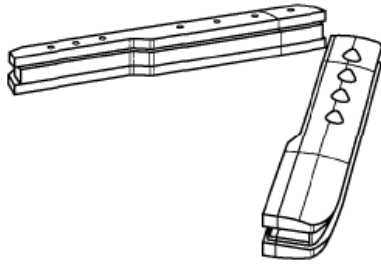
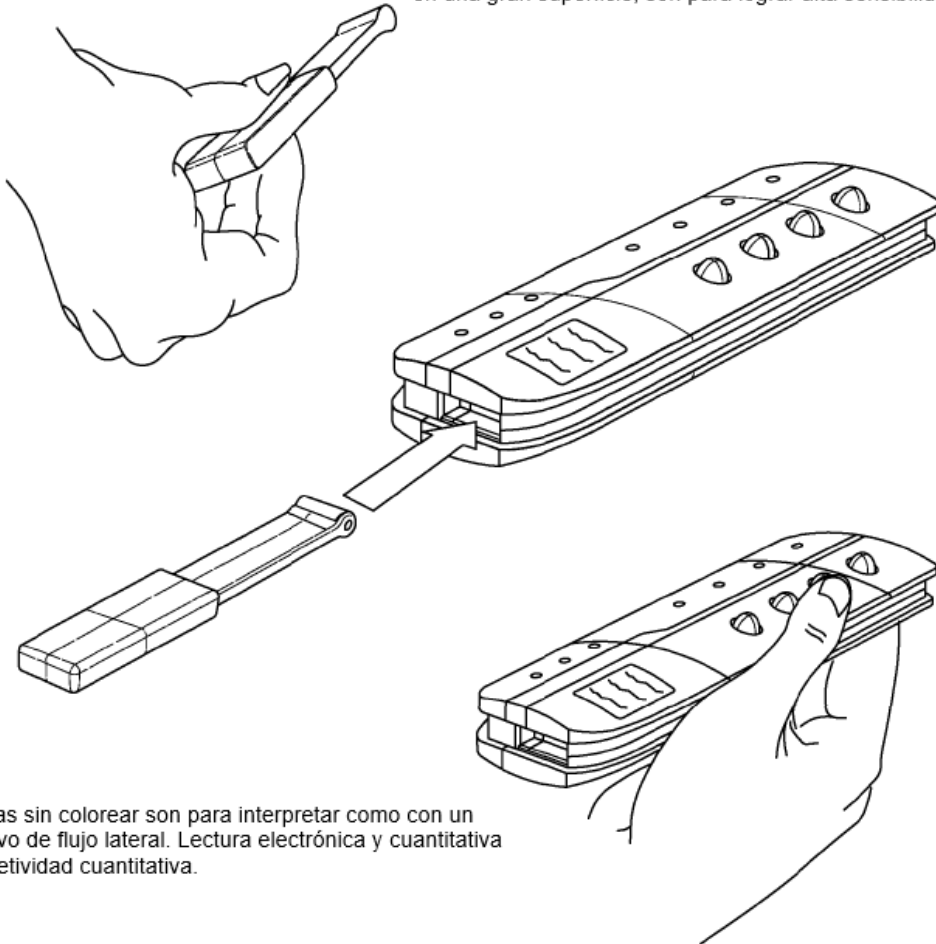


Figura 6



Electrónica de bajo coste se conecta a un cartucho de uso único, activado manualmente.

Gran "esponja" hisopo para recoger muestra de esputo en una gran superficie, son para lograr alta sensibilidad.



Las líneas sin colorear son para interpretar como con un dispositivo de flujo lateral. Lectura electrónica y cuantitativa para objetividad cuantitativa.

Figura 7

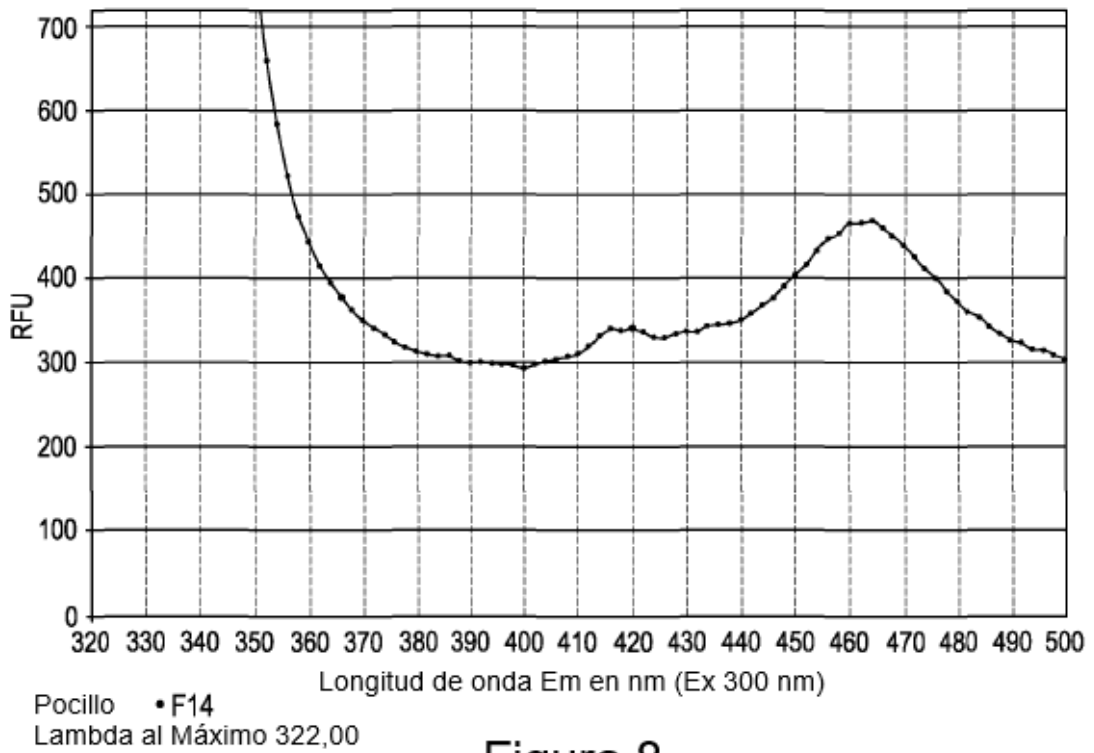


Figura 8

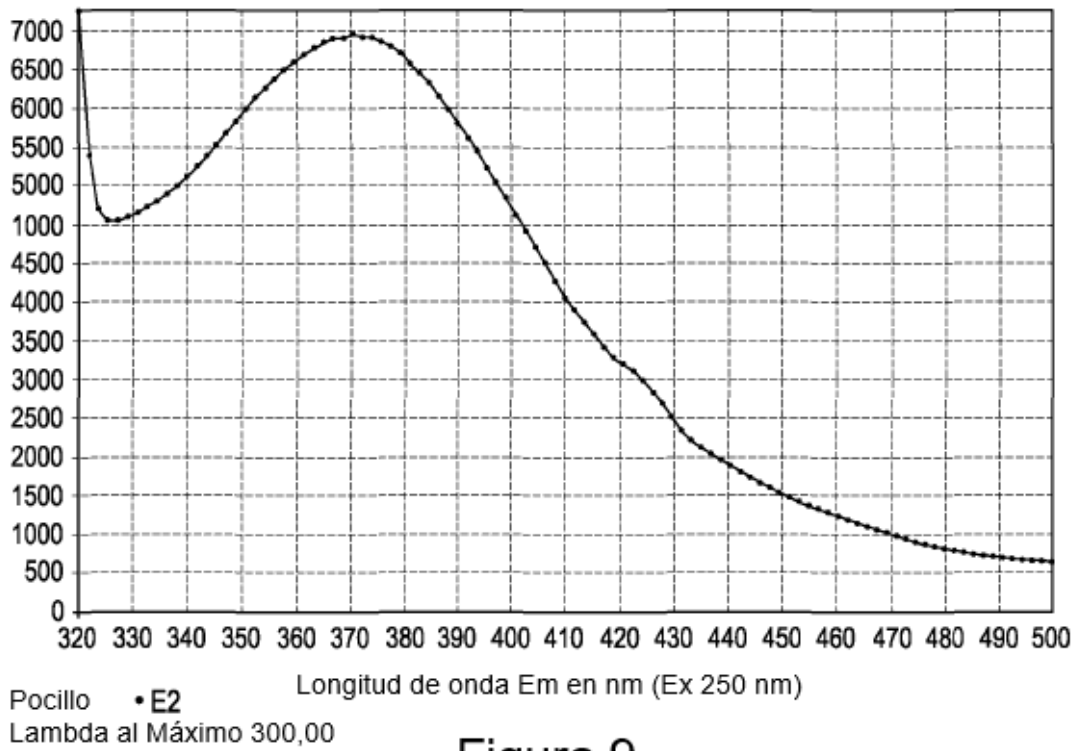


Figura 9

El paciente informa bien en la clínica el 28 de noviembre incluso aunque hay niveles elevados de Exotoxina A.

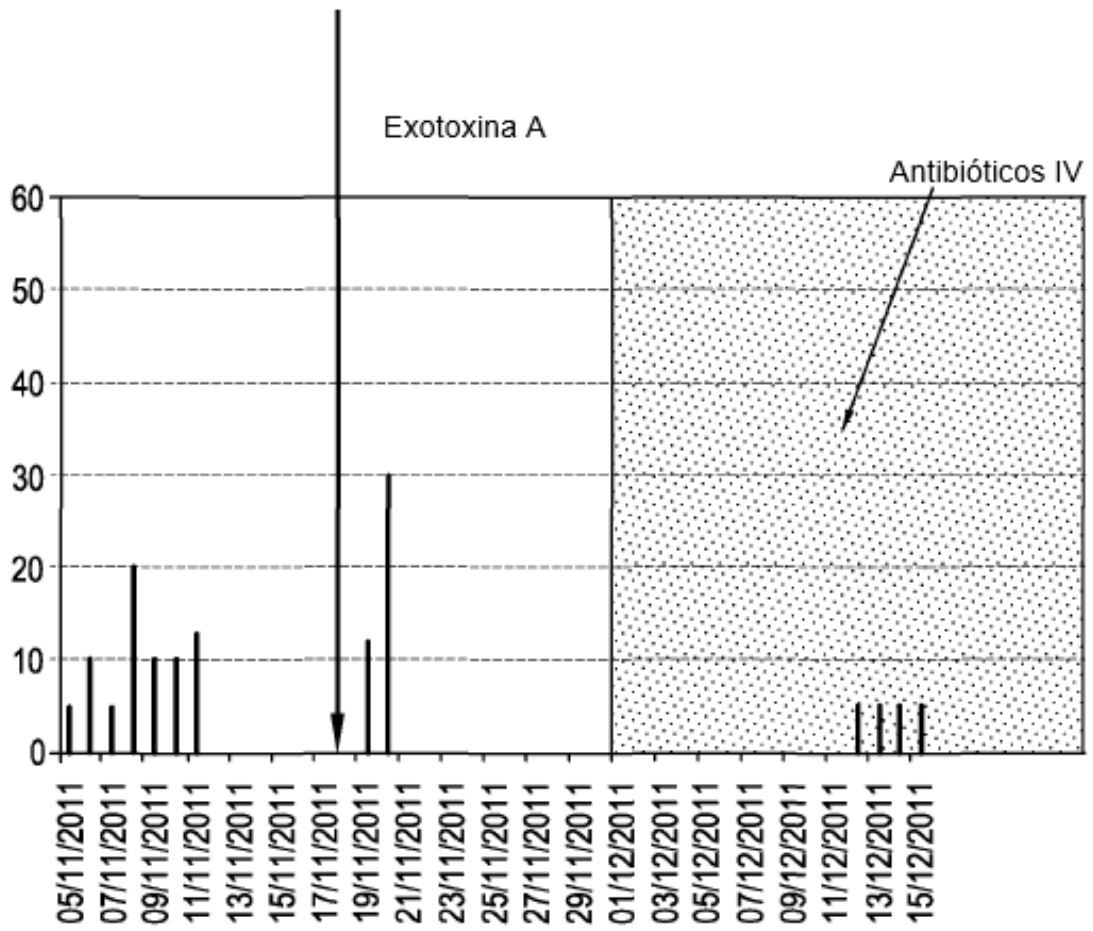


Figura 10

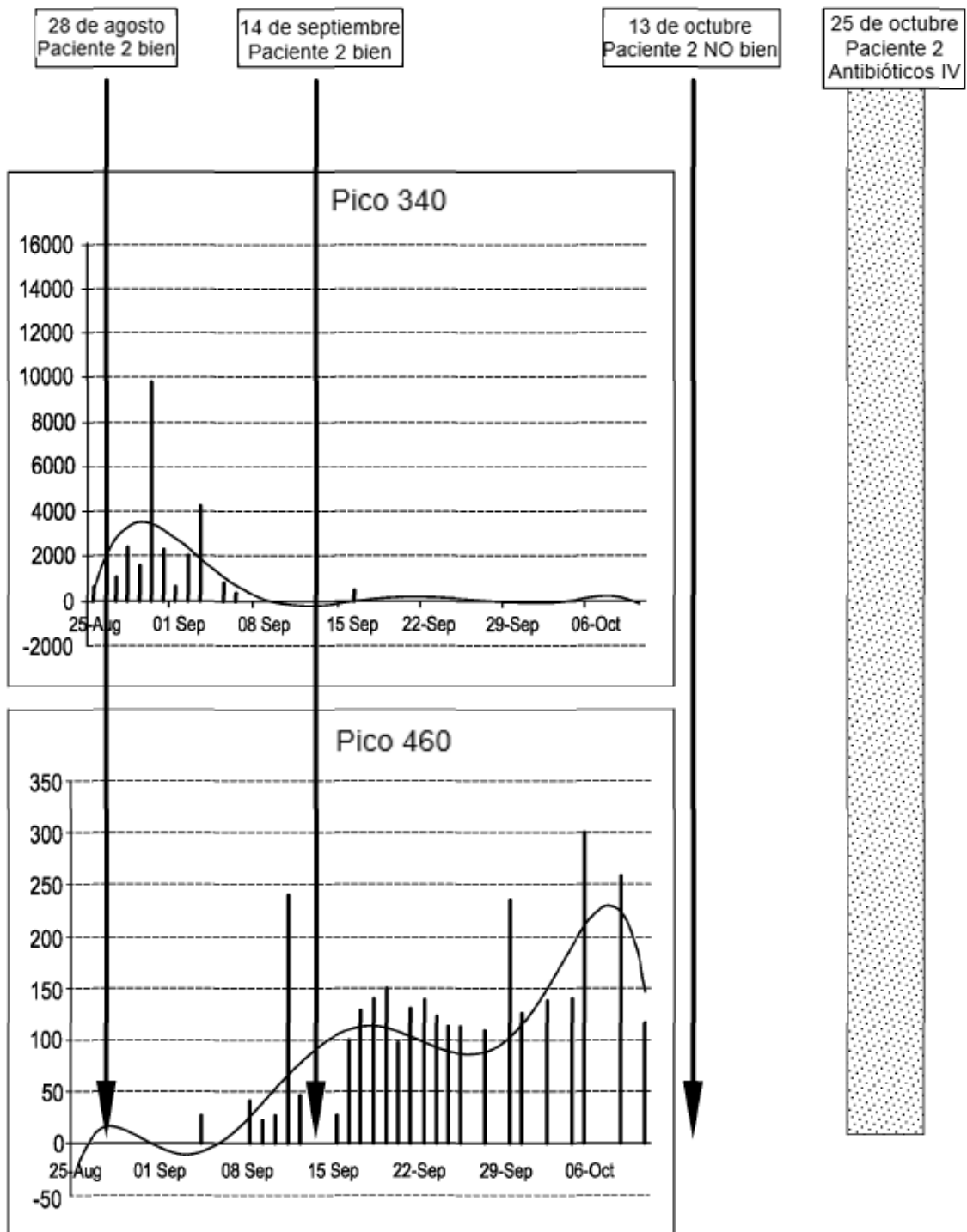


Figura 11

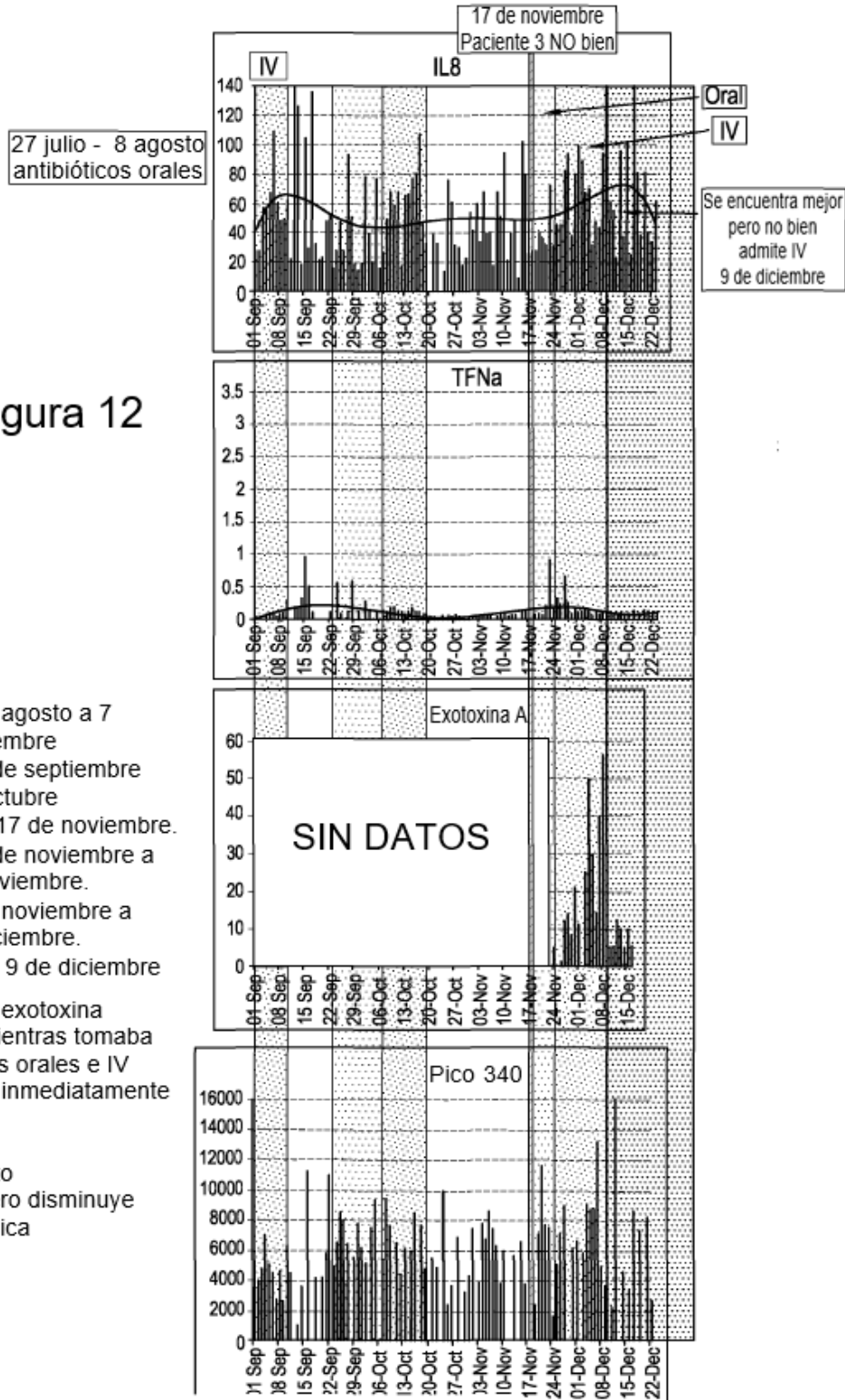
Figura 12

Paciente 3

- IV 22 de agosto a 7 de septiembre
- Oral 23 de septiembre a 5 de octubre
- No bien 17 de noviembre.
- Oral 19 de noviembre a 25 de noviembre.
- IV 25 de noviembre a 28 de diciembre.
- Admitido 9 de diciembre

Los niveles de exotoxina aumentaron mientras tomaba antimicrobianos orales e IV en casa. Cayó inmediatamente en admisión.

Pico de 340 alto continuo pero disminuye en IV en la clínica



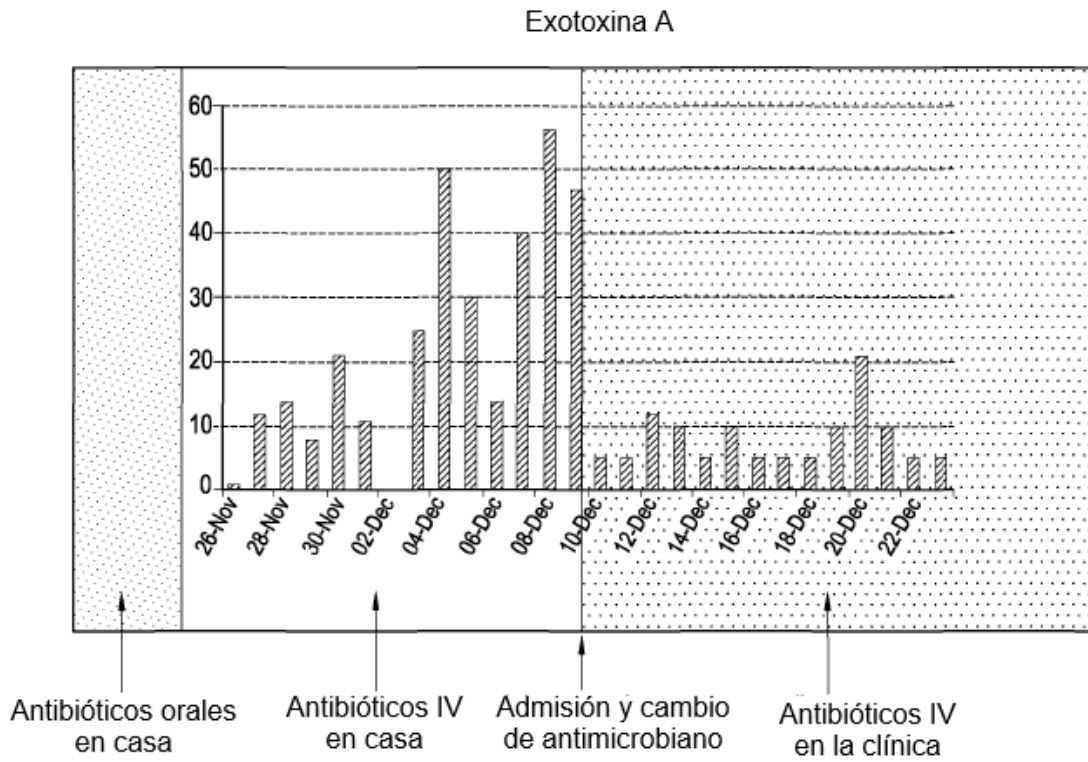


Figura 13