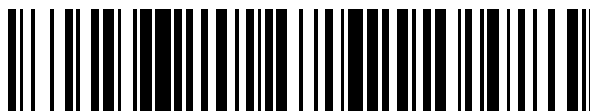


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 056**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2014** **PCT/FR2014/050039**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014** **WO14108646**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2014** **E 14703127 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017** **EP 2943588**

54 Título: **Procedimiento y kit para establecer in vitro un pronóstico de gravedad en un paciente con choque séptico**

30 Prioridad:

11.01.2013 FR 1350252

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

15.11.2017

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (50.0%)
69280 Marcy l'Étoile, FR y
HOSPICES CIVILS DE LYON (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CAZALIS, MARIE-ANGÉLIQUE;
TOURNOUD, MAUD;
VENET, FABIENNE;
LEPAPE, ALAIN y
MONNERET, GUILLAUME**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 642 056 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 establecer *in vitro* un pronóstico de gravedad en un paciente con choque séptico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento y a un kit para establecer *in vitro* un pronóstico de gravedad en un paciente con choque séptico.

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. Se definen como un síndrome de respuesta sistémica inflamatoria o SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome).

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

15 * una sepsis severa es una sepsis asociada a una hipotensión arterial y/o hipoperfusión y/o a la disfunción de al menos un órgano,

* el choque séptico es una sepsis severa asociada a una hipotensión persistente a pesar de los expansores adecuados y de los tratamientos vasopresores.

20 La diferencia entre SEPSIS, SEPSIS severa y choque séptico reside principalmente en la importancia de la perturbación de todas las funciones vitales.

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

30 Actualmente, la respuesta inmunitaria durante el choque séptico se describe generalmente en dos fases sucesivas. Después de una breve fase inicial muy inflamatoria, responsable de la sintomatología del choque propiamente dicho, se produce un estado de depresión inmunitaria inducida por los mecanismos inmunosupresores encargados de controlar la respuesta pro-inflamatoria. Así, este componente anti-inflamatorio de la reacción a la infección, inicialmente percibido como puramente compensatorio, se ha mostrado predominante en la mayoría de los enfermos y se acompaña de una inmunosupresión y de una hiporreactividad celular marcada. Además, parece ser que la mortalidad aparece principalmente a distancia del choque (o del fallo de órgano inicial) en un contexto en el que todos los pacientes presentan signos biológicos de inmunodepresión.

40 Ya se han descrito numerosos marcadores en un contexto séptico en la bibliografía científica.

45 En efecto, Thomas Shanley *et al.* [1] realizó un estudio en 2007 sobre los perfiles de expresión de las vías de señalización y de redes de genes en los niños que padecen un choque séptico. Esta publicación muestra una expresión diferencial de un número muy importante de genes, cerca de 2000 genes, en pacientes sanos y pacientes con choque séptico con respecto a pacientes sanos. En 2009, el mismo equipo [2] describió un estudio sobre el genoma de niños gravemente enfermos, que padecen SIRS, sepsis o también choque séptico. Los perfiles de expresión se determinaron con la ayuda de un chip de ADN. Un análisis estadístico muestra que un número muy elevado de genes, cerca de 700, están regulados diferentemente en muestras extraídas en pacientes que padecen SIRS, sepsis o un choque séptico con respecto a muestras de pacientes sanos.

50 La solicitud WO 2008143890 divulga la utilización de IL-8 como biomarcador para el pronóstico de supervivencia en pacientes con choque séptico, para adaptar la elección de los tratamientos y con fines de estructuración, de conducta o de evaluación de ensayos clínicos o de datos de ensayos clínicos.

55 En 2012, Hector R. Wang [3] realizó una revisión bibliográfica que trata de unas aplicaciones de los chips de ADN y el perfil de expresión genético en el campo de la sepsis. Las diferentes aplicaciones puestas en evidencia son la comprensión genómica de la sepsis, el descubrimiento de nuevos biomarcadores, la identificación de sub-categorías del choque séptico basada sobre la expresión de los genes y el descubrimiento de nuevas dianas y vías.

60 Finalmente, en la solicitud WO 2004/087949 A2 se describe un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de un SIRS, una sepsis y/o de estados de tipo sepsis. Este procedimiento permite evaluar el estado de gravedad y/o la evolución del seguimiento terapéutico de sepsis y de infecciones graves, en particular de infecciones sistémicas de tipo sepsis. Este documento divulga numerosos genes para su utilización como biomarcadores para el diagnóstico de SIRS, una sepsis o un estado de tipo sepsis.

65 Se han descrito así algunos marcadores en la bibliografía como pudiendo ser una ayuda para un pronóstico de mortalidad o de supervivencia en pacientes con choque séptico. Pero en todos los procedimientos descritos hasta

ahora, las muestras de sangre se extraen una primera vez en las 24 a 72 primeras horas después el inicio del choque (D1-D3), después, más tardíamente, durante el choque séptico. A pesar de su interés, la significatividad de estos marcadores se revela como muy pronto a D1-D3. En otras palabras, no son lo suficientemente precoces para un tratamiento muy reactivo y lo más rápido posible de un paciente con estado de choque. Ahora bien, es indispensable un tratamiento adecuado para el paciente lo más precoz posible después del choque. Por lo tanto, es necesario y muy importante disponer de marcadores que permiten reducir lo máximo posible esta ventana de pronóstico.

De manera completamente inesperada, los presentes inventores han mostrado que los productos de expresión de los genes *lilrb2* y/o *lilrb1* permiten establecer a partir de las primeras horas, y no más tarde de las 12 primeras horas, después del inicio del choque, un pronóstico de gravedad o de supervivencia/mortalidad en pacientes con choque séptico. Estos genes pertenecen a la familia de los genes receptores de las inmunoglobulinas que están localizadas sobre el cromosoma 19q13.4.

Existen varias variantes para los dos genes dianas que son todas pertinentes en el ámbito de la invención. Estas variantes están clasificadas en Genbank bajo las referencias y números de acceso siguientes:

LILRB2:

“Homo sapiens leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2 (LILRB2), transcript”

NM_005874.3	variante 1 Refseq
NM_001080978.2	variante 2 Refseq

LILRB1

“Homo sapiens leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1 (LILRB1), transcript”

NM_006669.3	variante 1 Refseq
NM_001081637.1	variante 2 Refseq
NM_001081638.1	variante 3 Refseq
NM_001081639.1	variante 4 Refseq

Así, la presente invención tiene por objeto un procedimiento para establecer *in vitro* un pronóstico de gravedad (de supervivencia o de riesgo incrementado de mortalidad) en un paciente en choque séptico, que comprende las etapas siguientes:

(i) a partir de una muestra biológica que proviene de dicho paciente, se mide *in vitro* el nivel de expresión del producto de expresión de al menos un gen seleccionado entre los genes *lilrb2* y *lilrb1*, (ii) se compara el nivel de expresión del producto de expresión de dicho al menos un gen con un nivel de expresión control de buen pronóstico de gravedad para el producto de expresión del mismo gen, en el que un nivel de expresión del producto de expresión de dicho al menos un gen por debajo de dicho nivel de expresión control es indicativo de un mal pronóstico de gravedad para el paciente.

En un modo de realización preferido, (i) se mide el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb2*, (ii) se compara el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb2* con el nivel de expresión control de buen pronóstico, en el que un nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilr2* del paciente por debajo del nivel de expresión control es indicativo de un mal pronóstico para el paciente.

En otro modo de realización, (i) se mide el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb2* y el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb1* del paciente, (ii) se compara el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb2* y del gen *lilrb1* del paciente respectivamente con el nivel de expresión control de cada gen, en el que un nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilr2* y del gen *lilrb1* del paciente por debajo respectivamente del nivel de expresión control de cada gen es indicativo de un mal pronóstico para el paciente.

La muestra biológica se selecciona entre la sangre, el plasma, el suero, la saliva, la orina, el líquido cefalorraquídeo, el líquido pleural y el líquido peritoneal.

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

El producto de expresión del gen o de los genes es o bien un ARN y preferentemente un ARN mensajero o también un ADNc, o bien una proteína o un polipéptido. Cuando el producto de expresión es un ARN, su nivel de expresión se determina con la ayuda de al menos una sonda de hibridación específica del producto de expresión y preferentemente con la ayuda de al menos dos, incluso tres sondas de hibridación y en particular por una

amplificación enzimática cuantitativa. Cuando el producto de expresión del o de los genes es un polipéptido o una proteína, su nivel de expresión se determina preferentemente mediante una determinación inmunológica cuantitativa.

La invención tiene también por objeto un procedimiento para realizar *in vitro* un seguimiento de un paciente con choque séptico, por medición de la evolución del nivel de expresión del producto de expresión de al menos un gen seleccionado entre los genes *ilrb2* e *ilrb1* en dicho paciente, en el que

(i) se mide el nivel de expresión de dicho al menos un gen en una muestra extraída del paciente a D1, es decir, como muy tarde en las 12 primeras horas del choque séptico,

(ii) se mide el nivel de expresión de dicho al menos un gen en una muestra extraída del paciente a Dx, es decir subsiguientemente a D1,

en el que un aumento de dicho nivel de expresión de dicho al menos un gen entre D1 y Dx indica que el paciente evoluciona hacia un buen pronóstico de gravedad.

Por supuesto, la etapa (ii) se puede realizar varias veces para seguir la evolución del nivel de expresión de dicho al menos un gen a lo largo del tiempo.

Como se ha descrito anteriormente, el nivel de expresión del producto de expresión se mide preferentemente por amplificación cuantitativa y por determinación inmunológica cuantitativa.

Definiciones

Muestra biológica significa la sangre, el plasma, el suero, la saliva, la orina, el líquido cefalo-raquídeo, el líquido pleural y el líquido peritoneal.

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

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

Se entiende por reactivo específico, un reactivo que reacciona con un material biológico de la muestra de sangre o 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 determinarse por análisis de ARNm procedentes de este gen, o por análisis de la proteína codificada por este gen.

A título indicativo, cuando se desea determinar la expresión de un gen diana por 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.

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 específico 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 y 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 más particularmente obtener únicamente los ADN complementarios de los ARN mensajeros, se realiza esta etapa enzimática en presencia de fragmentos nucleotídicos que comprenden únicamente unas fases timina (poliT), que se hibridan por complementariedad sobre la secuencia poliA de los diferentes ARNm a fin de formar un complejo poliT-poliA 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 diferentes ARN mensajeros inicialmente presentes en la muestra sanguínea o en los PBMCs. A continuación en el documento, se designa por ADNc, un ADN complementario de un ARN mensajero.

Por cebador de amplificación, se entiende un fragmento nucleotídico que comprende de 5 a 100 unidades nucleotídicas, preferentemente de 15 a 25 unidades nucleotídicas y que poseen una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para el inicio de una polimerización enzimática, por ejemplo en una reacción de amplificación enzimática.

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 específicos por la acción de al menos una enzima. Tales reacciones de amplificación son bien conocidas por el experto en la materia y se pueden citar en particular las técnicas siguientes: PCR (Reacción en cadena de polimerasa), LCR (reacción en cadena de ligasa), RCR (reacción de reparación en cadena), 3SR (Replicación de la Secuencia Autosostenida) con la solicitud de patente WO-A-90/06995, NASBA (Amplificación Basada en la Secuencia de Ácidos Nucleicos), y TMA (amplificación mediada por transcripción) con la patente US-A-5.399.491.

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 complementaria 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.

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.

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 tienen unas secuencias suficientemente complementarias, son susceptibles de formar una doble hebra con unos enlaces 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 determinarse en cada caso de manera conocida. Las condiciones de hibridación se determinan por la astringencia, es decir el rigor de las condiciones de realización. La hibridación es tanto más específica cuando se efectúa con mayor astringencia. La astringencia se define en particular en función de la composición en bases de un dúplex sonda/diana, así como por el grado de desemparejamiento entre dos ácidos nucleicos. La astringencia 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 desnaturizantes y/o la temperatura de hibridación. La astringencia de las condiciones en las que una reacción de hibridación se debe realizar dependerá principalmente de las sondas de hibridación utilizadas. Todos estos datos son bien conocidos y las condiciones apropiadas se pueden determinar 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. Existen numerosos marcadores de detección 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 colorimetría, fluorescencia o luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la gluco-6-fosfata deshidrogenasa; los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes 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 unas mediciones de impedancia; los grupos detectables por métodos ópticos como la difracción, la resonancia plasmónica de superficie, la variación de ángulo de contacto o mediante métodos físicos como la espectroscopía de fuerza atómica, el efecto túnel, etc.; las moléculas radioactivas como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I . Así, el polinucleótido se puede marcar 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 se puede marcar también 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 se inmoviliza o es inmovilizable 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 se puede marcar mediante un marcador. Se realiza entonces una reacción de hibridación entre dicha

sonda de captura y el fragmento nucleotídico diana.

Aunque se utilice una sonda denominada de captura o una sonda denominada de detección, la reacción de hibridación se puede realizar sobre un soporte sólido que incluye todos los materiales sobre los cuales se puede inmovilizar un ácido nucleico. Unos materiales de síntesis o unos materiales naturales, eventualmente modificados químicamente, se pueden utilizar como soporte sólido, en particular los polisacáridos tales como los materiales a base de celulosa, por ejemplo papel, unos 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, unos vidrios; unas cerámicas; unos látex; unas partículas magnéticas; unos derivados metálicos, unos 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 son transcritos 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 manera siguiente:

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 amplifica específicamente los ADNc. En este caso, el reactivo específico utilizado comprende al menos un cebador de amplificación específico 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 cuantificarse mediante la utilización de una gama 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 se 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 de referencia cuya expresión es similar en los diferentes grupos de pacientes. Realizando una relación entre la expresión del gen diana y la expresión del gen de referencia, 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 de un gen diana de la manera siguiente:

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 con sondas de hibridación específicas del gen diana previamente marcadas. Tales técnicas de hibridación son bien conocidas por el experto en la materia, 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 se expresa débilmente.

La expresión de un gen diana se puede también analizar mediante la expresión de las proteínas codificadas por el gen diana. En este caso, el material biológico es una proteína o un polipéptido 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 ligando específico de la proteína codificada por el gen diana para un sistema de detección con ligando.

En particular, el ligando es un anticuerpo o un derivado de anticuerpo (tal como un fragmento de anticuerpo) o un análogo de anticuerpo.

Los anticuerpos recombinantes, específicos de la proteína traducida del gen diana se pueden obtener según unos 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 extracelular.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar 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 primer lugar, se inmuniza un animal, generalmente un ratón, (o 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 se fusionan después con células mielomatosas “inmortales” (murinas en el ejemplo) para dar lugar a unos hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenidas, 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 se podrán ensayar 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 se purifican después, en particular según la técnica de cromatografía de afinidad.

Se pueden obtener unos fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, por proteólisis. Así, se pueden obtener por digestión enzimática, resultando en unos fragmentos de tipo Fab (tratamiento con papaína [5] o de tipo F(ab)₂ (tratamiento con pepsina; [6]. Se pueden preparar también por vía recombinante [7]. Otro fragmento de anticuerpo que es conveniente para 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 de la asociación de dos cadenas polipeptídicas. A fin de mejorar la estabilidad del fragmento Fv debido a la disociación de las dos cadenas polipeptídicas, este fragmento Fv se puede modificar por ingeniería genética insertando un enlace peptídico adecuado entre el dominio VL y el dominio VH [8]. Se habla entonces de fragmentos scFv (“fragmento variable de la cadena simple”) ya que está constituido de una única cadena polipeptídica. La utilización de un enlace peptídico compuesto preferiblemente de 15 a 25 aminoácidos permite unir el extremo C-terminal de un dominio con el extremo N-terminal del otro dominio, constituyendo así una molécula monomérica dotada de propiedades de enlace similares a las del anticuerpo en su forma completa. Las dos orientaciones de los dominios VL y VH son convenientes (VL-enlace-VH y VH-enlace-VL) ya que presentan unas propiedades funcionales idénticas. Por supuesto, cualquier fragmento conocido por el experto en la materia y que presenta las características inmunológicas definidas anteriormente es conveniente para los fines de la invención.

Por análogo de anticuerpo, se entienden en particular las proteínas de afinidad con las propiedades competitivas (nanofitinesTM).

Cuando el material biológico es un polipéptido o una proteína procedente de la expresión de un gen, se puede determinar la expresión de este último, detectando 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 (“ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”) es un análisis inmunoenzimático sobre soporte sólido. Este ensayo entra en el marco más general de los EIA (“inmunoensayos de enzima”) en el que el análisis se acopla 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 tales 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 se transfieren entonces 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 eliminar los anticuerpos primarios no enlazados, y después se enlaza con unos anticuerpos denominados secundarios, que se unirán a los anticuerpos primarios. Este anticuerpo secundario se enlaza habitualmente 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 sobre la membrana.

Figuras

Figura 1: las figuras 1A y 1B representan respectivamente los niveles de expresión de LILRB2 con 2 “conjuntos de sondas” Affymetrix independientes: 207967_x_at y 210146_x_at. Los datos se expresan en intensidad de fluorescencia para los 3 grupos de pacientes: voluntarios sanos (VS), pacientes no sobrevivientes (NS) y sobrevivientes (S).

Figura 2: La figura 2 representa la correlación de la intensidad de fluorescencia para LILRB2 con los 2 “conjuntos de sondas” Affymetrix.

Figura 3: La figura 3 muestra los niveles de expresión de LILRB1 con el conjunto de sondas Affymetrix 211336_x_at. Los datos se expresan en intensidad de fluorescencia para los 3 grupos de pacientes: voluntarios sanos (VS), pacientes no sobrevivientes (NS) y sobrevivientes (S).

Figura 4: La figura 4 representa la correlación de la intensidad de fluorescencia entre los 2 conjuntos de sondas Affymetrix de los genes LILRB1 (211336_x_at) y LILRB2 (207697_x_at).

Figura 5: La figura 5 muestra la correlación entre la intensidad de fluorescencia del conjunto de sondas (207697_x_at) obtenida con la plataforma Affymetrix y las mediciones CNRQ de LILRB2 obtenidas en RT-qPCR sobre la cohorte de descubrimiento.

Figura 6: La figura 6 presenta los CNRQ de LILRB2 para los pacientes sobrevivientes (S) y no sobrevivientes (NS).

Figura 7: La figura 7 representa la curva ROC de la asociación entre los valores de CNRQ de LILRB2 y la probabilidad de fallecimiento en los pacientes con choque séptico.

Figura 8: La figura 8 representa la curva de supervivencia de Kaplan Meier para los pacientes que presentan unos valores de CNRQ para LILRB2 por encima de la mediana (0,86) en caracteres en negrita, y por debajo de la mediana en caracteres normales.

Ejemplos: búsqueda de un perfil de expresión para el pronóstico de supervivencia o de gravedad de un paciente con choque séptico

Ejemplo 1: Descripción de los pacientes

1.1 Cohorte de descubrimiento

El estudio se ha realizado sobre una cohorte de 51 pacientes con choque séptico de 25 a 85 años de edad (33 hombres, 18 mujeres, edad media: 66 años) y admitidos en el servicio de reanimación del centro hospitalario Lyon Sud – Lyon (Francia) entre 2004 y 2009 para el tratamiento de un choque séptico. Sus características se describen en la tabla 1 siguiente. Todos los pacientes estaban en estado de choque séptico necesitando un tratamiento para las amins después del relleno vascular. El inicio del tratamiento con catecolaminas se considera como el T0 del choque séptico y del estudio. Entre los 51 pacientes de la cohorte, 17 pacientes (el 33%) han fallecido en los 28 primeros días después de haberse puesto en tratamiento por catecolamina (pacientes que no han sobrevivido: NS) y 24 pacientes han sobrevivido más allá de 28 días (pacientes que han sobrevivido: S). Los pacientes de menos de 18 años de edad se han excluido del estudio.

La gravedad de la afección se ha calculado mediante la puntuación SAPS-II (Simplified Acute Physiology Score) establecido por Le Gall, *et al.*, en 1993 que tiene en cuenta diferentes parámetros clínicos (la edad, la frecuencia cardiaca, la temperatura central, la PaO2/FiO2, la diuresis, la urea sanguínea, los glóbulos blancos, la caliemia, la natremia, la bicarbonatemia, la bilirrubina, el tipo de admisión, las patologías asociadas y la puntuación de Glasgow) y también la puntuación de SOFA (Sequential Organ Failure Assessment score) que tiene en cuenta los fallos de órganos (basado en seis notas diferentes, una para cada una de las vías respiratorias, cardio-vasculares, hepáticas, coagulación, los sistemas renales y neurológicos). Estos resultados son inversamente proporcionales a la supervivencia. Para el grupo de pacientes estudiado, la SAPSII mediana es 51 y la SOFA mediana es 10. Todas estas informaciones se resumen en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1

		No sobrevivientes n= 17 (el 33%)	sobrevivientes n= 34 (el 67%)	Total n=51 (%)	Valor de P
Mujer n (%)		9 (53)	9 (26)	18 (35)	0,062
Hombre n (%)		8 (47)	25 (74)	33 (65)	
Edad (años) media (Q1-Q3)		59 (48-70)	66 (56-76)	66 (54-74)	0,418
SAPS II mediana (Q1-Q3)		64 (56-70)	47 (38-55)	51 (43-61)	<0,001
SOFA mediana (Q1-Q3)		12 (10-15)	9 (8-11)	10 (8-12)	0,002
Tipo de infección	Comunitaria n(%)	8 (47)	17 (50)	25 (49)	ns

	nosocomial n (%)	8 (47)	17 (50)	25 (49)	
Sitio de la infección	abdominal n (%)	4 (38)	15 (40)	19 (39)	0,291
	pulmonar n (%)	10 (46)	13 (40)	23 (42)	
	otros n (%)	4 (16)	6 (20)	10 (19)	

1.2 Serie de control

- 5 Unos sujetos voluntarios sanos (VS) se han reclutado a fin de obtener una serie control cuyas muestras se han tratado y analizado en condiciones idénticas a las de los enfermos. Se trata de 24 sujetos sanos (12 mujeres y 12 hombres) de 57 años de edad media. Estas informaciones se resumen en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2

	VS n=24(%)
Mujer n (%)	12 (50)
Hombre n (%)	12 (50)
Edad (años) media (Q1-Q3)	57 52-60)

10 1.3 Cohorte de validación:

- 15 La cohorte de validación incluye 262 pacientes con choque séptico de 19 a 93 años (164 hombres, 93 mujeres, edad media: 67 años) admitidos en 6 servicios de reanimación de Lyon (Francia) entre 2009 y 2011 para el tratamiento de un choque séptico. Estos pacientes están todos en estado de choque que necesita un tratamiento por las amins después del relleno vascular. El principio del tratamiento con catecolaminas se considera como el T0 del choque séptico. Entre los 262 incluidos en el estudio, 90 pacientes (el 34%) han fallecido en los 28 primeros días después de haberse puesto en tratamiento por catecolamina.

- 20 Los pacientes de menos de 18 años de edad se han excluido del estudio.

- Se calcula la gravedad de la afección mediante la puntuación SAPS-II y mediante la puntuación SOFA. Para el grupo de pacientes estudiado la SAPS-II mediana es de 62 y la SOFA mediana es de 12.

- 25 La tabla 3 siguiente resume las informaciones sobre los pacientes de la cohorte de validación.

Tabla 3

		No sobrevivientes n= 90 (el 34%)	Sobrevivientes n= 172 (66%)	Total n=262 (%)	Valor de P
Mujer n (%)		33 (36,7)	65 (37,8)	98 (37,4)	0,965
Hombre n (%)		57 (63,3)	107 (62,2)	164 (62,6)	
Edad (años) mediana (Q1-Q3)		71,5 (63-78)	65 (56-77)	67 (58-78)	0,003
SAPS II mediana (Q1-Q3)		77 (63-93)	57 (44-68)	62 (50-77)	<,001
SOFA mediana (Q1-Q3)		14(12-16)	11 (9-13)	12 (10-14)	<,001
Tipo de infección	comunitaria (%)	48 (53,3)	114 (66,3)	162 (61,8)	0,041
	nosocomial n (%)	42 (46,7)	58 (33,7)	100 (38,2)	
Sitio de infección	abdominal n (%)	30 (33,3)	41 (23,8)	71 (27,1)	0,212
	pulmonar n (%)	36 (40,0)	72 (41,9)	108 (41,2)	
	otros n (%)	24 (26,7)	59 (34,3)	83 (31,7)	

Ejemplo 2: Muestreo y recogida de los datos:

- 30 Las primeras muestras sanguíneas se obtienen como muy tarde 12 horas después del inicio del choque séptico.

2.1 Extracción de los ARN totales de la muestra biológica:

- 35 Las extracciones se recogieron directamente en unos tubos PAXgene™ blood RNA (PreAnalytix, Hilden, Alemania). Después de la extracción, los tubos se dejan a temperatura ambiente durante 4 horas y después se conservan a -80°C hasta la extracción del material biológico con el objetivo de optimizar y estandarizar las condiciones de

conservación de las muestras. Más precisamente, en este protocolo, los ARN totales se han extraído con la ayuda de los kits PAXgene™ Blood RNA® (PreAnalytix) respetando las recomendaciones del fabricante.

- 5 La calidad de los ARN totales extraídos se analizó por el bio analizador AGILENT 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) con la ayuda del sistema Lab-on-chip RNA 6000 Nano Assay (Agilent). Los ARN totales comprenden los ARN de transferencia, los ARN mensajeros (ARNm) y los ARN ribosomales.

2.2 Estudio de descubrimiento:

- 10 Para el estudio de descubrimiento, la reacción de transcripción inversa de los ARNm se realiza según el protocolo de Affymetrix a partir de 50 ng de ARN total. Se ha utilizado un cebador oligonucleotídico para dirigir todos los ARN durante la transcripción inversa. El conjunto de las etapas se ha realizado con el kit WTO NuGen y se han hibridado sobre unos chips de ADN. La hibridación del ARNc se realiza con los biochips GeneChipHuman Genome U133 Plus
- 15 2 antes de la etapa de amplificación de la señal por la incubación con la mezcla SAPE que contiene la estreptavidina ficoeritrina, y 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 normalizan después por RMA (Robust Multile-Array Average). Todos los datos basados en la intensidad de la señal se utilizan después de la normalización. Las diferencias de niveles de expresión en ARNm entre los pacientes fallecidos en los 28
- 20 primeros días (pacientes no sobrevivientes) y los pacientes sobrevivientes, se determinan mediante el método SAM (Tusher, Tibshirani, and Chu, 2001).

- Entre los genes diferencialmente expresados entre los pacientes sobrevivientes, no sobrevivientes y los controles sanos, se constata una sobreexpresión de LILRB2 en los pacientes sobrevivientes comparada con el nivel de
- 25 expresión obtenido al mismo tiempo en los controles sanos y en los no sobrevivientes, cuyos niveles de expresión son comparables. Estos resultados se presentan en la figura 1 anexa con 2 conjuntos de sondas Affymetrix independientes, respectivamente identificados en 207697_x_at y 210146_x_at, lo que confirma la fortaleza y la fiabilidad de los resultados. En la figura 1, respectivamente figura 1A y figura 1B, los datos se presentan en intensidad de fluorescencia para los 2 conjuntos de sondas Affymetrix 207697_x_at y 210146_x_at,
- 30 respectivamente, para los 3 grupos de pacientes: voluntarios sanos (véase la tabla 2), pacientes no sobrevivientes y sobrevivientes (véase la tabla 1).

- La intensidad de fluorescencia de los conjuntos de sondas 207697_x_at y 210146_x_at se ha comparado para los
- 35 pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes. Los resultados se presentan a continuación.

Conjunto de sondas	SFC	AUC	Valor de p
207697_x_at	1,53	0,84	0,0002
210146_x_at	1,19	0,78	0,0012

SFC: Standard Fold Change

AUC: Area Under Curve

Valor de p: según el ensayo de Mann Whitney

- 40 Después, se ha correlacionado la intensidad de fluorescencia para los 2 conjuntos de sondas Affymetrix. Los resultados se presentan en la figura 2.

Correlación r del coeficiente de Spearman	0,68
Intervalo de confianza 95%	0,565 a 0,762
Significatividad del valor P del ensayo de Spearman	< 0,0001

- 45 Como se destaca de la figura 2, se constata una muy buena correlación para los 2 conjuntos de sondas Affymetrix.

- Entre los genes diferencialmente expresados entre los pacientes sobrevivientes, no sobrevivientes y los controles sanos, se constata también una sobreexpresión de LILRB1 en los pacientes sobrevivientes comparada con el nivel de
- 50 expresión obtenido al mismo tiempo en los controles sanos y en los no sobrevivientes. Estos resultados se presentan en la figura 3 anexa con 1 conjunto de sondas Affymetrix independiente, respectivamente identificada en 207697_x_at y 211336_x_at para los 3 grupos de pacientes: voluntarios sanos, pacientes no sobrevivientes y sobrevivientes. Los resultados se dan en intensidad de fluorescencia.

- Después, se ha correlacionado la intensidad de fluorescencia entre los 2 conjuntos de sondas Affymetrix de los
- 55 genes LILRB1 (211336_x_at) y LILRB2 (207697_x_at). Los resultados se presentan en la figura 4. Se observa una correlación significativa (0,86[0,81-0,90]) entre los resultados de expresión de los dos genes LILRB2 y LILRB1.

2.3 Validación técnica (transferencia de plataforma):

A fin de confirmar los resultados con la ayuda de otra técnica de biología molecular, se ha medido la expresión de ARN de LILRB2 por RT-PCR cuantitativa sobre la misma cohorte.

Brevemente, se ha realizado una reacción de transcripción inversa (RT) a partir de 200 ng de ARN total en un volumen final de 20 µl, con la ayuda de los kits SuperScript® VILO™ system (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) respetando las recomendaciones del fabricante. Cada solución de ADNc se ha diluido al 1/10 de agua DEPC. Se ha preparado un estándar para el gen de interés (LILRB2) y el gen de referencia (HPRT1) mediante una amplificación PCR (reacción en cadena de polimerasa) llevada a cabo hasta saturación. Los amplicones obtenidos se purificaron después (kit PCR de purificación, Qiagen Ltd) y se verificó la presencia de un amplicón único mediante electroforesis capilar con la ayuda del bioanalizador AGILENT 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) y del sistema Lab-on-chip DNA Assay (Agilent).

Se ha utilizado el LightCycler™ 480 (Roche), y se han efectuado las reacciones PCR con la ayuda del kit LightCycler® 480 Probes Master (Roche Molecular Biochemicals). Se ha efectuado cada PCR en un volumen final de 20 µl que contiene 10 µl de LightCycler® 480 Probes Master, 2x conc, 2 µl de cebadores-sonda MIX, 10x conc que contiene los cebadores sentido y antisentido (0,5 µM de concentración final) así como la sonda Taqman (0,1 µM de concentración final), y 8 µl de solución de ADNc diluida a la 20ª. Después de una etapa de desnaturalización de 10 minutos a 95°C, la amplificación se ha efectuado con la ayuda de 40 ciclos de un protocolo de "touch-down" PCR (10 segundos a 95°C, 29 segundos de hibridación a 68-58°C, seguido de una extensión de 11 segundos a 72°C). Al final de cada ciclo, se ha medido la fluorescencia liberada por la sonda de hidrólisis Taqman.

Las combinaciones de cebadores necesarias para la cuantificación del gen de referencia HPRT1 y del gen de interés LILRB2 se describen a continuación. Para HPRT1, el nº de acceso Genbank es NM_000194.2 y la región amplificada es 630-788. Para LILRB2, variante 1, el nº de acceso Genbank es NM_005874.3 y la región amplificada es 2006-2182 y para la variante 2, el número de acceso Genebank es NM_001080978.2 y la región amplificada es 1791-1879.

LILRB2:

Cebador sentido 5'-->3'	CCAGAGCCCCACAGACAGAGG	(SEC ID Nº 1)
Cebador antisentido 5'-->3'	TGTCCTTCACGGCAGCATAGA	(SEC ID Nº 2)
Sonda TaqMan	GACTCCACACTCAGTAGAAG	(SEC ID Nº 3)

HPRT1: amplicón 158pb

Cebador sentido 5'-->3'	CCAAAGATGGTCAAGGTCGC	(SEC ID Nº 4)
Cebador antisentido 5'-->3'	GACACAAACATGATTCAAATCC	(SEC ID Nº 5)
Sonda TaqMan	CAAGTTTGTGTAGGATATGCC	(SEC ID Nº 6)

La cantidad de ARNm diana LILRB2 relativa a la cantidad de ARNm del gen de referencia HPRT1 se ha analizado mediante la técnica de cuantificación relativa con el LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals). La "Second Derivative Maximum Method" del programa LightCycler™ (Roche) se ha utilizado para determinar automáticamente el Crossing Point (Cp) para cada muestra. El valor de Cp se ha definido como el número de ciclos para el cual la fluorescencia era significativamente diferente del ruido de fondo.

Se han realizado cinco diluciones en series a 1/10 por cuadruplicado con cada estándar a fin de generar una curva de calibración que expresa el Cp en función del logaritmo del número de copias. Las diluciones del estándar se han optimizado a fin de que la curva de calibración cubra el nivel de expresión esperado para el gen diana y el gen de referencia. Las curas estándar relativas que describen la eficacia de PCR para el gen diana y el gen de referencia se han generado y utilizado para realizar una cuantificación relativa denominada CRNQ (calibrated normalized relative quantities) descrita por Jan Hellemans *et al.* (qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biology 2007).

La figura 5 anexa muestra la correlación entre la intensidad de fluorescencia del conjunto de sondas (207697_x_at) obtenida con la plataforma Affymetrix y las mediciones CNRQ obtenidas en RT-qPCR sobre la cohorte de descubrimiento para el gen LILRB2. Los resultados muestran una correlación significativa (0,81[0,72-0,86]) entre los resultados Affymetrix y los de RT-PCR cuantitativa, confirmando la pertinencia del gen.

Correlación r del coeficiente Spearman	0,8075
Intervalo de confianza 95%	0,7254 a 0,8670
Significatividad del valor p del ensayo Spearman	< 0,0001

2.4 Validación biológica:

A fin de validar la asociación entre la expresión de LILRB2 y la predicción de supervivencia en los pacientes con choque séptico, se ha medido la expresión de los ARNm de LILRB2 mediante RT-PCR cuantitativa sobre una cohorte de validación (que incluye 262 pacientes en choque séptico, con 172 sobrevivientes y 90 no sobrevivientes

(fallecidos en los 28 primeros días) (véase la tabla 3).

La figura 6 presenta los CNRQ de LILRB2 para los pacientes sobrevivientes (S) y no sobrevivientes (NS).

5 Se ha utilizado un modelo logístico para describir la asociación entre LILRB2 y la probabilidad de fallecimiento. El modelo logístico describe la probabilidad de fallecer antes del día 28. La medición de asociación entre la probabilidad de fallecimiento y la covariable es Odds Ratio (OR). Esta medición de asociación se puede interpretar como un riesgo relativo. Por ejemplo, un OR = 2 para el grupo 1 frente al grupo 2 significa que la probabilidad de fallecimiento para los pacientes del grupo 1 es igual a 2 veces la probabilidad de fallecimiento para los pacientes del grupo 2.

10 Odds Ratio para un incremento de 1 punto de CNRQ de LILRB2 es 0,47 ($p=0,0028$). Odds Ratio entre los pacientes que presentan valores de CNRQ para LILRB2 = 1,3 (3er cuartil) y 0,5 (1er cuartil) es 0,55. Así, los pacientes con un nivel de expresión de LILRB2 elevado tienen una probabilidad de fallecimiento significativamente más baja que los pacientes con un nivel de expresión más bajo.

15 La figura 7 representa la curva ROC de la asociación entre los valores de LILRB2 y la probabilidad de fallecimiento en los pacientes con choque séptico.

20 LILRB2 está también asociado a la fecha de supervivencia de los pacientes con choque séptico (y no solamente a la probabilidad de fallecimiento en los 28 primeros días). La figura 8 representa la curva de supervivencia de Kaplan Meier para los pacientes con choque séptico a D1 que presenta unos valores de CNRQ para LILRB2 por encima de la mediana (0,86) caracteres en negrita, y por debajo de la mediana en caracteres normales.

25 Referencias bibliográficas

1. Thomas Shanley *et al.* Molecular Medicine, vol. 13, nº 9-10
2. Hector R. Wang *et al.* Critical Care Medicine, vol. 37, nº 5
3. Hector R. Wang. Critical Care, vol. 16

Listado de secuencias

35 <110> bioMérieux Hospices Civils de Lyon
 <120> Procedimiento y kit para establecer in vitro un pronóstico de gravedad en un paciente con choque séptico
 <130> SEPTICHOC PCT
 <150> FR1350252
 <151> 2013-01-11

40 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 20

45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LILRB2 CEBADOR 1
 <400> 1

50 ccagagccca cagacagagg 20

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN

55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LILRB2 CEBADOR 2
 <400> 2

60 tgtccttcac ggcagcatag a 21

<210> 3
 <211> 20
 <212> ADN

65 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LILRB2 SONDA 3

<400> 3
 gactccacac tcagtagaag 20

 5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HPRT1 CEBADOR 4
 10 <400> 4
 ccaaagatgg tcaaggtcgc 20

 <210> 5
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HPRT1 CEBADOR 5
 <400> 5
 20 gacacaaaca tgattcaaatt cc 22

 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HPRT1 SONDA 6
 <400> 6
 30 caagtttgtt gtaggatatg ccc 23

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para establecer *in vitro* un pronóstico de gravedad en un paciente en choque séptico, que comprende las etapas siguientes:

(i) a partir de una muestra biológica que proviene de dicho paciente, se mide *in vitro* el nivel de expresión del producto de expresión de al menos un gen seleccionado entre los genes *lilrb2* y *lilrb1*, (ii) se compara el nivel de expresión del producto de expresión de dicho al menos un gen con un nivel de expresión control de buen pronóstico de gravedad para el producto de expresión del mismo gen, en el que un nivel de expresión del producto de expresión de dicho al menos un gen por debajo de dicho nivel de expresión control es indicativo de un mal pronóstico de gravedad para el paciente.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que

(i) se mide el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb2*, (ii) se compara el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb2* con el nivel de expresión control del gen *lilrb2*,

en el que el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb2* del paciente por debajo del nivel de expresión control es indicativo de un mal pronóstico para el paciente.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que

(i) se mide el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb2* y el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb1* del paciente, (ii) se compara el nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb2* y del gen *lilrb1* del paciente respectivamente con el nivel de expresión control de cada gen,

en el que un nivel de expresión del producto de expresión del gen *lilrb2* y del gen *lilrb1* del paciente por debajo respectivamente del nivel de expresión control umbral predeterminado de cada gen es indicativo de un mal pronóstico para el paciente.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica se selecciona entre la sangre, el plasma, el suero, la saliva, la orina, el líquido cefalo-raquídeo, el líquido pleural y el líquido peritoneal.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el producto de expresión del gen es un ARN, preferentemente un ARN mensajero o un ADNc.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el producto de expresión es una proteína o un polipéptido.

7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el nivel de expresión del ARN se determina con la ayuda de al menos una sonda de hibridación específica del producto de expresión.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el nivel de expresión del ARN se determina mediante una amplificación enzimática cuantitativa.

9. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el nivel de expresión del polipéptido se determina mediante una determinación inmunológica cuantitativa.

10. Procedimiento para realizar, *in vitro*, un seguimiento de un paciente con choque séptico, mediante la medición de la evolución del nivel de expresión del producto de expresión de al menos un gen seleccionado entre los genes *lilrb2* y *lilrb1* en dicho paciente, en el que

(i) se mide el nivel de expresión de dicho al menos un gen en una muestra del paciente extraída a D1,

(ii) se mide el nivel de expresión de dicho al menos un gen en una muestra del paciente extraída a Dx,

en el que un aumento de dicho nivel de expresión de dicho al menos un gen entre D1 y Dx indica que el paciente evoluciona hacia un buen pronóstico de gravedad.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho nivel de expresión se mide por amplificación cuantitativa.

12. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el nivel de expresión se mide mediante un análisis inmunológico cuantitativo.

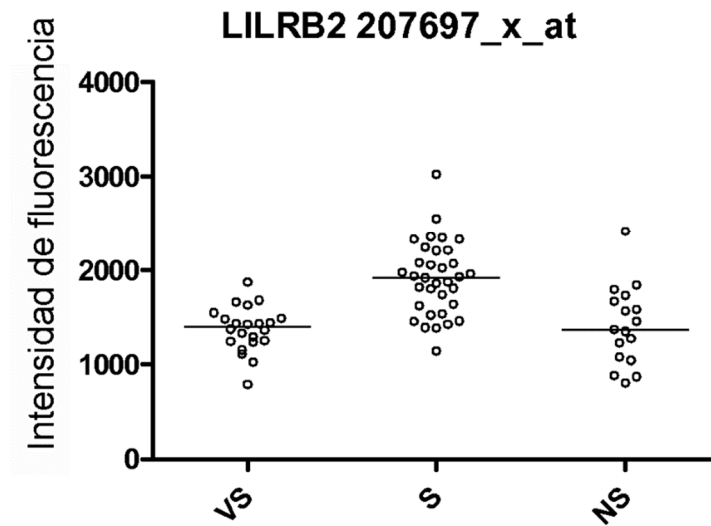


Figura 1A

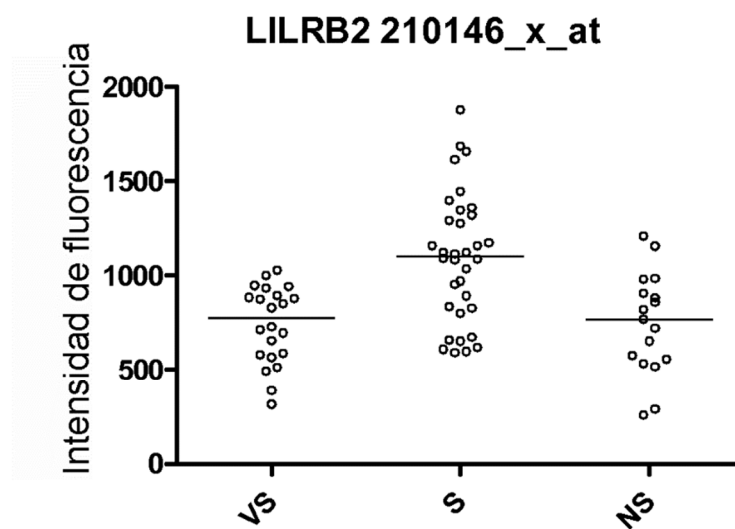


Figura 1B

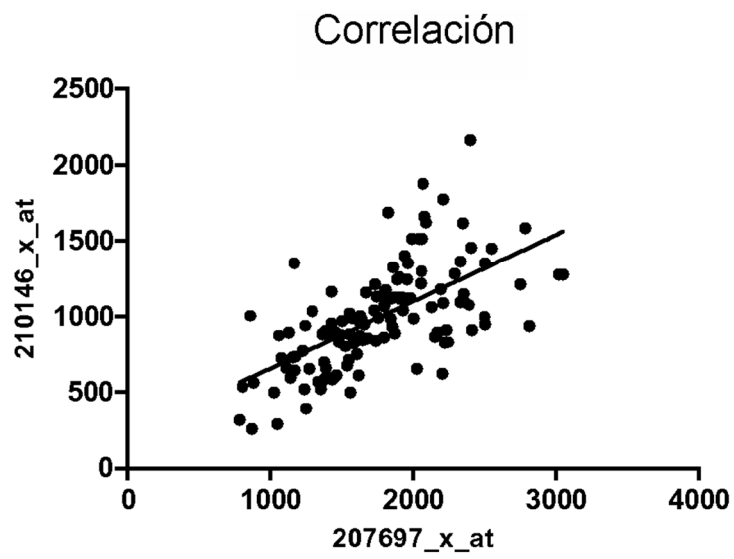


Figura 2

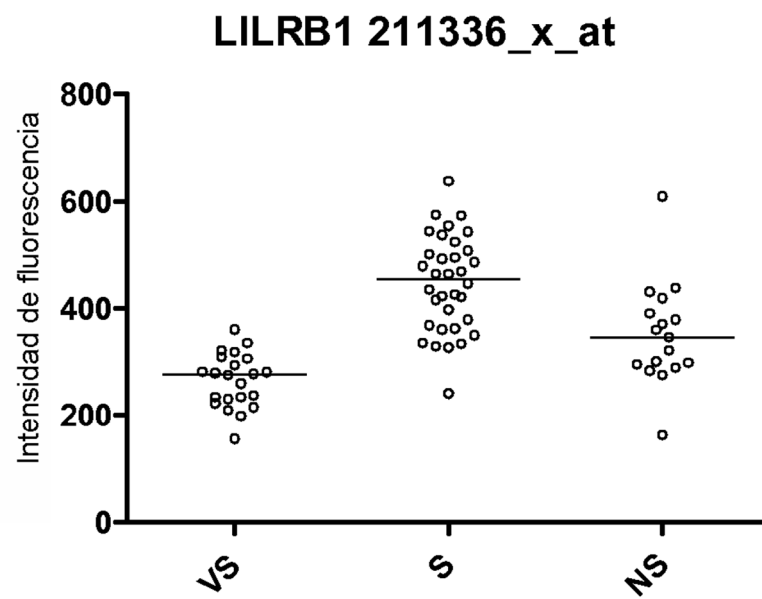
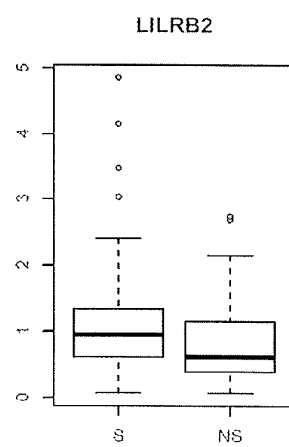
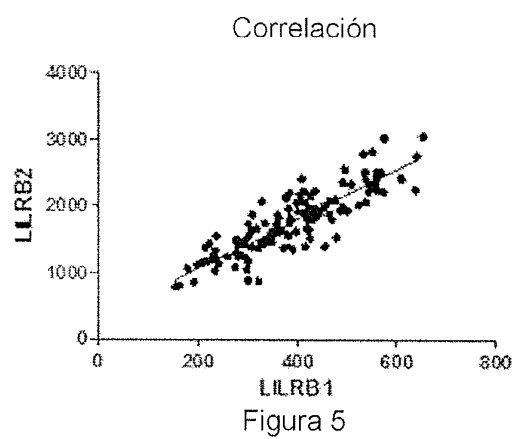
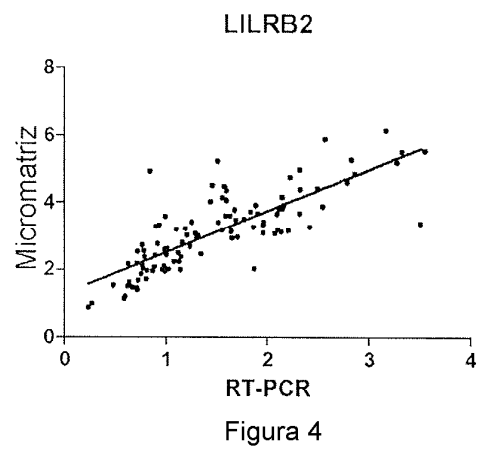


Figura 3



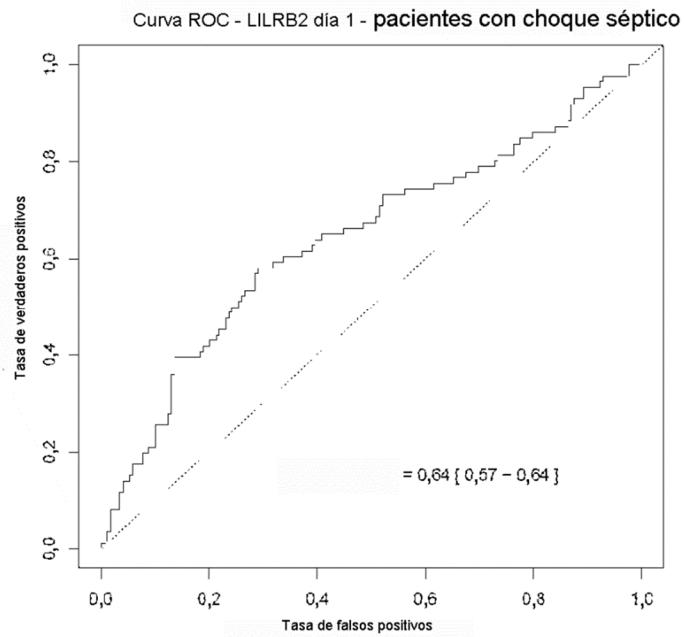


Figura 7

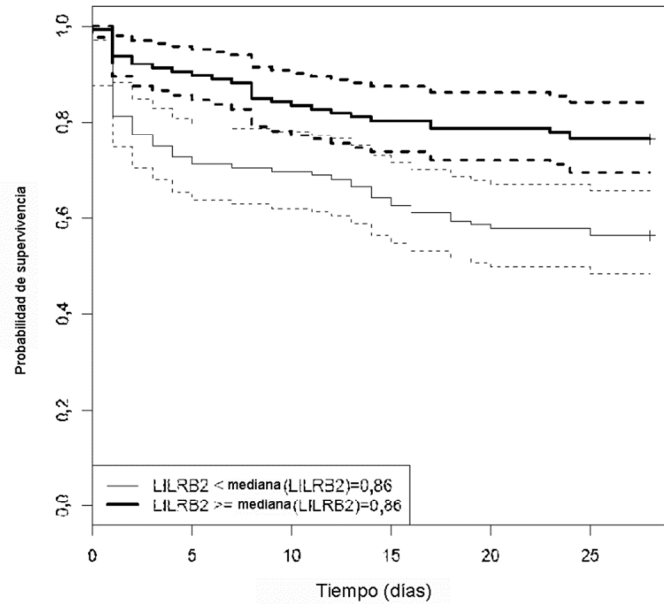


Figura 8