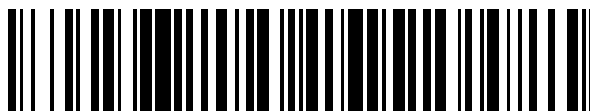


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 150**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2011** **E 11189024 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017** **EP 2592421**

54 Título: **Diagnóstico de la sepsis y del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
23.02.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITÄTSKLINIKUM JENA (100.0%)
Bachstrasse 18
07743 Jena, DE

72 Inventor/es:

KIEHNTOPF, MICHAEL;
SCHMERLER, DIANA;
DEUFEL, THOMAS y
BRUNKHORST, FRANK

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 656 150 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico de la sepsis y del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se inscribe en el campo de la medicina, más en particular en el campo del diagnóstico y, aún más en particular, en el campo del diagnóstico y el pronóstico de la sepsis.

10 **Antecedentes**

La presente invención se refiere al diagnóstico de las complicaciones sépticas. El término "sepsis" se ha usado para describir diversas afecciones clínicas relacionadas con manifestaciones sistémicas de inflamación acompañadas por una infección. Debido a las similitudes clínicas con las respuestas inflamatorias secundarias a etiologías no infecciosas, la identificación de la sepsis ha sido un problema de diagnóstico particularmente desafiante. En este sentido, se han proporcionado definiciones para el "síndrome de repuesta inflamatoria sistémica" (o "SRIS"), que se refiere, en general, a una respuesta sistémica grave a un ataque infeccioso o no infeccioso, y para los síndromes relacionados "sepsis", "sepsis grave" y "choque séptico" (Bone *et al.*, Chest 101:1644-53, 1992). El SRIS puede estar relacionado tanto con una infección como con numerosas etiologías no infecciosas, incluido el traumatismo.

A pesar de la disponibilidad de antibióticos y terapias de apoyo, la sepsis representa una causa considerable de morbilidad y mortalidad. Se han investigado varios análisis de laboratorio para su uso, junto con un examen clínico completo de un sujeto, para el diagnóstico/pronóstico de la sepsis (Giamarellos-Bourboulis *et al.*, Intensive Care Med. 28: 1351-56, 2002).

Se han considerado varios marcadores moleculares para facilitar el diagnóstico y la supervisión durante el tratamiento de la sepsis en seres humanos y en varias especies animales. Los utilizados de forma más extensa pueden ser la PCR (proteína C-reactiva) y la PCT (procalcitonina).

Asimismo, se han considerado diversas interleucinas como posibles biomarcadores de la sepsis. Sin embargo, estos tienen actualmente un uso limitado debido a la falta de especificidad. Por ejemplo, Carrigan *et al.* (Clinical Chemistry 50 (8) (2004) 1301-1314) informaron las siguientes sensibilidades y especificidades para estos marcadores en seres humanos:

Tabla 1. Resultados del análisis de curvas ROC para la predicción de sepsis basada en diversos biomarcadores en casos en adultos y neonatos.^a
Análisis de curvas ROC

Marcador	Grupo de edad	Intervalo de corte	Sensibilidad, %	Especificidad, %	Estudios de referencia
TUF α	Adultos	11,5 ng/l	55	66	(30)
	Neonatos	12-20 ng/l	67/79/88	43/71/86	(29,6163)
IL-6	Adultos	50-200 ng/l	51/67/86	53/65/79	(30,35,36,66)
	Neonatos	10-160 ng/l	71/84/100	43/71/96	(26, 29, 61, 63, 70-72)
IL-1ra	Niños	ND ^b	33	89	(85)
	Neonatos	10,9 μ g/l	93	92	(70)
IL-8	Adultos	30-340 ng/l	57/63/68	57/76/93	(30,35,85)
	Neonatos	50 ng/l	92	70	(61)
PCR	Adultos	4-150 mg/l	35/ 69 /89	18/ 61 /81	(30, 35, 36, 38, 46 66, 88, 89)
	Neonatos	1-23 mg/l	43/ 65 /96	80/ 90 /100	(22, 26, 63, 70, 89, 90)
PCT	Adultos	0,4-81 μ g/l	65/ 81 /97	48/ 73 /94	(30,35-38, 43, 46, 66, 88, 89, 122, 123)
	Neonatos	1,0-61 μ g/l	77/ 85 /99	62/ 83 /91	(22, 72, 89, 90)

^a Los valores enumerados son para diferenciar los individuos infectados de los controles no infectados más que de los individuos sanos. Las sensibilidades y especificidades se indican como porcentajes mínimos, medios [en negrita] y máximos.

^b ND. No disponible.

Esta visión de conjunto se puede encontrar en el documento EP 2 060 920 A1.

Estos datos muestran que, incluso en seres humanos, en donde los patrones de las enfermedades sépticas se han investigado extensamente, la sensibilidad y especificidad de los marcadores actuales pueden (incluso como valores medios) bajar tanto como hasta el 33 % y 66 %, respectivamente, sin mencionar la homogeneidad de los datos publicados actualmente.

En el documento DE 10 2005 056839 (SIRS LAB GMBH (2007)) se divulga un método para el diagnóstico de la sepsis en el que se utiliza transtiretina como marcador. Asimismo, el uso de la antitripsina y de la transtiretina para el diagnóstico de diferentes tipos de sepsis y para el diagnóstico diferencial de diferentes tipos de sepsis fue elucidado por Soares *et. al* (Revista Brasileira de Terapia Intensiva (2007) 14-22); Ren Yan *et. al* (Journal of Proteome Research (2007) 2812-2821) y el documento US 2009/104605 (Siuzdak Gary [EE. UU.] *et. al* (2009)). Sin embargo, la simple evidencia que se muestra sobre la transtiretina y la antitripsina, sin un valor de corte determinado o evidencia de fragmentos específicos de los marcadores, no es suficientemente sensible y/o específica para proporcionar un método fiable para la estratificación de riesgos y/o el diagnóstico diferencial de la sepsis.

Estos datos muestran que definitivamente existe una necesidad de contar con nuevos marcadores de diagnóstico con características clínicas mejoradas. Por lo tanto, el diagnóstico de la sepsis, particularmente el diagnóstico precoz de la sepsis, todavía es una necesidad importante en la medicina clínica. Un diagnóstico óptimo debería revelar las personas con riesgo de desarrollar sepsis o a las personas que están en una etapa precoz de la sepsis. En los pacientes con múltiples traumatismos, en concreto, tal diagnóstico suele ser muy difícil porque otros procesos patológicos interfieren con los parámetros y valores fisiológicos "normales" medidos en la medicina intensiva. El diagnóstico de las complicaciones sépticas en los pacientes con politraumatismos es un problema muy específico en el que existe una necesidad imperiosa en la medicina intensiva.

Así, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método adecuado para el diagnóstico de la sepsis que sea sensible y/o específico.

Definiciones

Los términos "sepsis" y "complicaciones sépticas" se utilizan como sinónimos en la presente solicitud y se entiende que incluyen la "sepsis", las "complicaciones sépticas", la "sepsis grave", el "choque séptico" e incluso las fases más precoces de los mismos, estando todos los síntomas relacionados con manifestaciones sistémicas de inflamación acompañadas por una infección.

En el presente documento, "síndrome de respuesta inflamatoria sistémica" (o "SRIS") se define como la respuesta inflamatoria sistémica a diversos ataques clínicos graves que se manifiestan mediante dos o más de las siguientes alteraciones: 1) temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$; 2) frecuencia cardíaca > 90 latidos por minuto; 3) frecuencia respiratoria > 20 respiraciones por minuto o $\text{PaCO}_2 < 32$ mm Hg; y 4) recuento de glóbulos blancos $> 12.000/\text{mm}^3$; $< 4.000/\text{mm}^3$, o > 10 % de formas inmaduras (en banda). Cuando el SRIS es el resultado de un proceso infeccioso confirmado, se denomina sepsis (Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, *et al*. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun.;101(6):1644–1655).

En el presente documento, "alfa-1-antitripsina" también se denomina antitripsina o "ATT". La alfa-1-antitripsina o α -1-antitripsina (A1AT) es un inhibidor de proteasas que pertenece a la superfamilia de las serpinas. Se la conoce generalmente como un inhibidor sérico de la tripsina. La alfa-1-antitripsina también denomina como inhibidor de la alfa-1 proteinasa (A1PI) porque inhibe una gran diversidad de proteasas. Protege a los tejidos frente a las enzimas de las células inflamatorias, especialmente la elastasa neutrofílica, y tiene un intervalo de referencia en sangre de 1,5 - 3,5 g/l, pero su concentración puede aumentar varias veces en caso de una inflamación aguda. En su ausencia, la elastasa neutrofílica puede degradar libremente la elastina, que contribuye a la elasticidad de los pulmones, lo que da como resultado complicaciones respiratorias tales como el enfisema o la EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) en adultos y cirrosis en adultos o niños.

En el presente documento, la "transtiretina" (TTR) es un transportador sérico y en líquido cefalorraquídeo de la hormona tiroidea tiroxina (T4) y el retinol. De hecho, la transtiretina debe su nombre a que transporta tiroxina y retinol. La TTR se denominaba originalmente prealbúmina porque se desplazaba más rápidamente que las albúminas en los geles de electroforesis. El pico distintivo de la TTR se encuentra en 13,8 kDa y se reivindica en el presente documento en el contexto de los métodos y kits reivindicados.

En el contexto de la presente invención, los términos "umbral", "valor umbral", "corte" y "valor de corte" se utilizan indistintamente.

Como se usa en el presente documento en referencia al uso de marcadores diagnósticos y pronósticos, el término "que correlaciona" se refiere a comprar la presencia o cantidad del marcador (o marcadores) en un paciente con su presencia o cantidad en personas que se sabe que padecen o se sabe que tienen riesgo de padecer una dada afección, o en personas que se sabe que no padecen una dada afección. Como se explicó anteriormente, el nivel de

un marcador en una muestra de un paciente se puede comparar con un nivel que se sabe que está asociado con un diagnóstico concreto. Se dice que el nivel del marcador de la muestra se ha correlacionado con un diagnóstico; es decir, la persona versada en la técnica puede usar el nivel del marcador para determinar si el paciente padece un diagnóstico de tipo concreto y responder de manera acorde. Alternativamente, el nivel de marcador de la muestra se puede comparar con un nivel de marcador que se sabe que está asociado con un buen resultado (p. ej., la ausencia de una enfermedad, etc.). En las realizaciones preferentes, un perfil de niveles de marcadores se correlaciona con una probabilidad global de un resultado particular.

Un "pronóstico" se refiere a la asignación de una probabilidad de que se produzca un curso o resultado determinado.

A menudo esto se determina examinando uno o más "indicadores de pronóstico". Estos son marcadores cuya presencia o cantidad en un paciente (o en una muestra obtenida del paciente) indica la probabilidad de que se produzca un dado curso o resultado. Por ejemplo, cuando uno o más indicadores de pronóstico alcanzan un nivel suficientemente alto en muestras obtenidas de tales pacientes, dicho nivel podría indicar que el paciente tiene una probabilidad aumentada de avanzar eventualmente hacia una insuficiencia renal terminal (IRT), es decir, el paciente tiene probabilidad aumentada de ser un paciente con progresión.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico, la predicción o la estratificación del riesgo de mortalidad y/o del resultado de la enfermedad en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene sepsis, que comprende:

- determinar la antitripsina (ATT) y su fragmento peptídico de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 en una muestra de sangre tomada de dicho sujeto, en donde el nivel de ATT, su fragmento peptídico de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 se correlaciona con un mayor aumento de mortalidad; y
- en donde dicho riesgo aumentado de mortalidad y/o mal resultado en la evolución de la enfermedad se da si el nivel de ATT (el fragmento maduro, 55Rd) está por debajo de determinado valor de corte y el nivel del fragmento de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 está por encima de determinado valor de corte.

Los fragmentos son los que se muestran en la Figura 9.

La invención también se refiere, en general, al uso de los fragmentos de ATT que consisten en las SEQ ID NO: 4 o 10 para el diagnóstico de la sepsis.

Numerosas proteasas digieren la α -1-antitripsina en el bucle del centro reactivo en el extremo C. Esto produce fragmentos de A-1-antitripsina (véanse las Figuras). Se reivindica la técnica SELDI-TOF-MS (espectrometría de masas de desorción/ionización por láser potenciada en superficie con analizador de tiempo de vuelo) como un método para analizar y/o determinar la presencia y/o los niveles de estos fragmentos en el contexto de la invención.

Se analizaron 240 pacientes con sepsis infecciosa o SRIS. El fragmento de 4789,7 Da de la α -1-antitripsina como se reivindica en la presente invención se distingue como un marcador para diferenciar entre el SRIS y la sepsis en general.

El método de acuerdo con la invención también implica comparar el nivel del marcador para el individuo/paciente/sujeto a diagnosticar con un valor predeterminado. El valor predeterminado puede diversas formas. Puede ser un valor de corte individual: este puede ser, por ejemplo, una mediana o media, o el percentil 75, 90, 95 o 99 de una población de referencia. También puede ser, por ejemplo, un valor de corte "óptimo". El valor corte óptimo para un dado marcador es el valor en donde el producto de la sensibilidad y especificidad de diagnóstico es máximo para este marcador. La sensibilidad de diagnóstico es la fracción relativa de pacientes que tienen la enfermedad o riesgo de desarrollar la enfermedad (dependiendo de la pregunta de diagnóstico o pronóstico a responder en cualquier caso en particular) que tal marcador reconoce correctamente ("verdaderos positivos"), y la especificidad de diagnóstico es la fracción relativa de pacientes que no tienen la enfermedad o riesgo de desarrollar la enfermedad (dependiendo de la pregunta de diagnóstico o pronóstico a responder en cualquier caso en particular) que el marcador reconoce como tales ("verdaderos negativos"). Esto puede hacerse mediante un valor de corte optimizado para un valor predictivo negativo máximo o un valor predictivo positivo máximo, dependiendo de las necesidades clínicas o económicas. De esta manera, se optimiza la especificidad o la sensibilidad.

Así, se puede adoptar el valor corte dependiendo de si se considera más adecuado identificar la mayoría de los sujetos en riesgo a costa de identificar también "falsos positivos", o de si se considera más adecuado identificar principalmente los sujetos en alto riesgo a costa de pasar por alto varios sujetos con riesgo moderado.

El valor predeterminado se puede establecer a partir de grupos comparativos, tal como cuando el riesgo en un grupo definido sea el doble del riesgo en otro grupo definido. Puede ser un intervalo, por ejemplo, en que la población analizada se divide por igual (o de forma desigual) en grupos, tales como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio y un grupo de alto riesgo, o en cuartiles, siendo el cuartil más bajo individuos con el menor riesgo y el cuartil más alto los individuos con el mayor riesgo.

El valor predeterminado puede variar entre poblaciones de referencia particulares seleccionadas, dependiendo de sus hábitos, su etnia, su genética, etc. Por consiguiente, los valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría en la que está incluido un individuo. Una persona versada en la técnica puede seleccionar intervalos y categorías adecuados a partir de experimentos de rutina.

5 En determinadas realizaciones, no se confía en umbrales particulares de uno o más marcadores de un panel para determinar si un perfil de niveles de marcadores de un sujeto es indicativo de un diagnóstico/pronóstico particular. En su lugar, la presente invención puede utilizar una evaluación de un "perfil" de un panel de marcadores como un todo. En efecto, un patrón característico de cambios particular en tal panel de marcadores puede actuar como un
10 indicador de diagnóstico o pronóstico específico. Como se discute en el presente documento, el patrón de cambios podría obtenerse a partir de una única muestra o de cambios temporales en uno o más miembros de un panel (o un valor de repuesta de un papel). En el presente documento, un panel hace referencia a un conjunto de marcadores. En el presente documento, uno de los marcadores conocidos podría combinarse con la ATT y su fragmento peptídico de la SEQ ID NO: 4 y/o 10. Se puede obtener un valor de respuesta del panel mediante distintos métodos. Un ejemplo es el análisis de riesgos proporcionales de Cox. Otro ejemplo es la optimización de las curvas ROC: esto
15 se puede lograr haciendo representando curvas ROC para la sensibilidad de un panel de marcadores particular frente a 1-(especificidad) del panel para diversos valores de corte.

En estos métodos, un perfil de mediciones de marcadores de un sujeto se considera conjuntamente para
20 proporcionar una probabilidad global (expresada como una puntuación numérica o como un riesgo porcentual) de un diagnóstico o pronóstico. En tales realizaciones, un aumento de determinado subconjunto de marcadores podría ser suficiente para indicar un diagnóstico/pronóstico particular en un paciente, mientras que un aumento en un subconjunto de marcadores distinto podría ser suficiente para indicar el mismo diagnóstico/pronóstico, o uno distinto, en otro paciente. También se pueden aplicar factores de ponderación a uno o más marcadores de un panel, por
25 ejemplo, cuando un marcador es de utilidad particularmente alta para la identificación de un diagnóstico/pronóstico en particular, este se puede ponderar de forma que a un dado nivel, sea suficiente, por sí solo, para indicar un resultado positivo. Asimismo, un factor de ponderación podría establecer que ningún nivel dado de un marcador particular sea suficiente para indicar un resultado positivo, sino que solo señala un resultado cuando otro marcador también contribuye al análisis.

30 En determinadas realizaciones, los marcadores y/o los paneles de marcadores se seleccionan de manera que presenten una sensibilidad de al menos aproximadamente el 70 %, más preferentemente una sensibilidad de al menos aproximadamente el 80 %, incluso más preferentemente una sensibilidad de al menos aproximadamente el 85 %, aún más preferentemente una sensibilidad de al menos aproximadamente el 90 % y muy preferentemente una
35 sensibilidad de al menos aproximadamente el 95 %, combinada con una especificidad de al menos aproximadamente el 70 %, más preferentemente una especificidad de al menos aproximadamente el 80 %, incluso más preferentemente una especificidad de al menos aproximadamente el 85 %, aún más preferentemente una especificidad de al menos aproximadamente el 90 % y muy preferentemente una especificidad de al menos aproximadamente el 95 %. En realizaciones particularmente preferentes, tanto la sensibilidad como la especificidad
40 son al menos aproximadamente del 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente del 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente del 85 %, aún más preferentemente al menos aproximadamente del 90 % y muy preferentemente al menos aproximadamente del 95 %. En este contexto, el término "aproximadamente" hace referencia a +/- 5 % de una dada medición.

45 En otras realizaciones, se utiliza una razón de verosimilitudes (*likelihood ratio*) positiva, una razón de verosimilitudes negativa, una razón de probabilidades (*odds ratio*) o una razón de riesgos instantáneos (*hazard ratio*) como medida de la capacidad de una prueba para predecir el riesgo de una enfermedad o diagnosticarla. En el caso de una razón de verosimilitudes positiva, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los sujetos de los grupos "de enfermedad" y de "control"; un valor mayor a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el
50 grupo de enfermedad; y un valor menor a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de control. En el caso de una razón de verosimilitudes negativa, un valor de 1 indica que un resultado negativo es igualmente probable entre los sujetos de los grupos "de enfermedad" y de "control"; un valor mayor a 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de prueba; y un valor menor a 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de control. En determinadas realizaciones preferentes, los marcadores y/o los paneles de
55 marcadores se seleccionan preferentemente para que presenten una razón de verosimilitudes positiva o negativa de al menos aproximadamente 1,5 o más o aproximadamente de 0,67 o menos, más preferentemente al menos aproximadamente de 2 o más o aproximadamente de 0,5 o menos, aún más preferentemente al menos aproximadamente de 5 o más o aproximadamente de 0,2 o menos, incluso más preferentemente al menos aproximadamente de 10 o más o aproximadamente de 0,1 o menos, y muy preferentemente al menos
60 aproximadamente de 20 o más o aproximadamente de 0,05 o menos. En este contexto, el término "aproximadamente" hace referencia a +/- 5 % de una dada medición.

En el caso de una razón de probabilidades, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los sujetos de los grupos "de enfermedad" y el de "control"; un valor mayor a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de enfermedad; y un valor menor a 1 indica que un resultado positivo es más probable
65 en el grupo de control. En determinadas realizaciones preferentes, los marcadores y/o los paneles de marcadores se seleccionan preferentemente para que presenten una razón de probabilidades de al menos aproximadamente 2 o

más o aproximadamente 0,5 o menos, más preferentemente al menos aproximadamente de 3 o más o aproximadamente de 0,33 o menos, aún más preferentemente al menos aproximadamente de 4 o más o aproximadamente de 0,25 o menos, incluso más preferentemente al menos aproximadamente de 5 o más o aproximadamente de 0,2 o menos, y muy preferentemente al menos aproximadamente de 10 o más o aproximadamente de 0,1 o menos. En este contexto, el término "aproximadamente" hace referencia a $\pm 5\%$ de una dada medición.

En el caso de una razón de riesgos instantáneos, un valor de 1 indica que el riesgo relativo de un criterio de valoración (p. ej., la muerte) es igual en los grupos "de enfermedad" y de "control"; un valor mayor a 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de enfermedad; y un valor menor a 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de control. En determinadas realizaciones preferentes, los marcadores y/o los paneles de marcadores se seleccionan preferentemente para que presenten una razón de riesgos instantáneos de al menos aproximadamente 1,1 o más o aproximadamente de 0,91 o menos, más preferentemente al menos aproximadamente 1,25 o más o aproximadamente de 0,8 o menos, aún más preferentemente al menos aproximadamente de 1,5 o más o aproximadamente de 0,67 o menos, incluso más preferentemente al menos aproximadamente de 2 o más o aproximadamente de 0,5 o menos, y muy preferentemente al menos aproximadamente de 2,5 o más o aproximadamente de 0,4 o menos. En este contexto, el término "aproximadamente" hace referencia a $\pm 5\%$ de una dada medición.

La persona versada en la técnica entenderá que asociar un indicador de diagnóstico o pronóstico con un diagnóstico o un pronóstico de riesgo de un resultado clínico futuro constituye un análisis estadístico. Por ejemplo, un nivel de marcador mayor a X podría indicar que un paciente tiene más probabilidad de experimentar un resultado adverso que los pacientes con un nivel menor o igual a X, determinado por un nivel de significación estadística. Además, un cambio en la concentración de un marcador respecto de los niveles basales podría reflejar el pronóstico del paciente, y el grado del cambio en el nivel del marcador podría relacionarse con la gravedad de los eventos adversos. A menudo, se determina la significación estadística comparando dos o más poblaciones y determinando un intervalo de confianza y/o un valor de p . Véase, p. ej., Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes de la invención son del 90 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % y 99,99 %, mientras que los valores de p preferentes son 0,1, 0,05, 0,025, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 y 0,0001.

En aún otras realizaciones, se pueden realizar múltiples determinaciones de los marcadores de diagnóstico o pronóstico, y se puede usar un cambio temporal en el marcador para determinar un diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, la concentración de un marcador en una muestra de un sujeto podría determinarse en un tiempo inicial y de nuevo una segunda vez a partir de una segunda muestra del sujeto. En tales realizaciones, un aumento del marcador entre el tiempo inicial y el segundo tiempo podría ser indicativo de un diagnóstico particular o pronóstico particular. Asimismo, una disminución del marcador entre el tiempo inicial y el segundo tiempo podría ser indicativo de un diagnóstico particular o pronóstico particular.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" hace referencia a una muestra de un fluido corporal obtenida para fines de diagnóstico, pronóstico o evaluación de un sujeto de interés, tal como un paciente. Las muestras de análisis preferentes incluyen las muestras de sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, esputo y derrames pleurales. Además, una persona versada en la técnica se dará cuenta de que algunas muestras de análisis se podrían analizar más fácilmente siguiendo un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo, la separación de la sangre entera en hemoderivados de suero y plasma). En el método de acuerdo con la presente invención, dicha muestra es una muestra de sangre. En una realización preferente de la invención, el nivel de ATT y su fragmento peptídico de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 se puede correlacionar preferentemente con la predicción o estratificación del riesgo de mortalidad y/o de evolución de la enfermedad mediante un método que puede seleccionarse del siguiente grupo de alternativas:

- correlación con respecto a la mediana del nivel de ATT y su fragmento peptídico de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 en un conjunto de muestras predeterminadas;
- correlación con respecto a los cuantiles del nivel de ATT y su fragmento peptídico de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 en un conjunto de muestras predeterminadas; y
- correlación con un modelo matemático tal como, por ejemplo, la regresión de Cox.

Preferentemente, el nivel límite de la ATT es aproximadamente de 2 g/l, y puede desviarse, dependiendo del paciente analizado, en aproximadamente el 5 %, el 10 % o incluso el 20 %.

Preferentemente, el valor de corte de los fragmentos de ATT es aproximadamente de 4,18 pmol/μl, p. ej., el fragmento 4789,7 (SEQ ID NO: 10 en la Tabla 3; PMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK), correspondientes a 20 ng/μl, y el fragmento de 50 kDa (4,18 pmol/μl) pueden desviarse en aproximadamente el 5 %, el 10 % o incluso el 20 % dependiendo del paciente analizado. Por lo tanto, se mide la concentración de proteína total de TTR.

El valor de corte de la TTR es aproximadamente de 10 mg/dl (véase la Fig. 4) y puede desviarse, dependiendo del paciente analizado, en aproximadamente el 5 %, el 10 % o incluso el 20 %.

De acuerdo con la divulgación, el nivel de ATT o de fragmentos de la misma, y/o de TTR o de fragmentos de la misma, asociado con un riesgo aumentado de mortalidad es

- para ATT, por debajo del nivel de la mediana de la población normal; y/o
- para los fragmentos de ATT, por encima del nivel de la mediana de la población normal y/o
- para TTR, está por debajo del nivel de la mediana de la población normal.

El método que se divulga podría comprender, adicionalmente, las siguientes etapas:

- tomar una muestra de un sujeto; y/o
- determinar el nivel de ATT o fragmentos de la misma; y/o
- determinar el nivel de TTR o fragmentos de la misma; y/o
- correlacionar el nivel de ATT o fragmentos de la misma con un riesgo por cuantil de mortalidad o supervivencia.

La invención se refiere a un método en donde se toma una muestra en uno o más de los siguientes puntos de tiempo, cuando el sujeto ingresa por primera vez a un establecimiento médico o en la ambulancia; cuando el sujeto está en el servicio de urgencias; cuando el sujeto está en la unidad de cuidados intensivos; antes del tratamiento; luego del inicio del tratamiento; 24 horas después del inicio del tratamiento; 48 horas después del inicio del tratamiento y/o 72 horas después del inicio del tratamiento.

El sujeto tiene una afección seleccionada del grupo que comprende: sepsis, sepsis grave y choque séptico.

Además de la predicción o la estratificación del riesgo de mortalidad y/o de evolución de la enfermedad de dicho sujeto, la determinación del nivel de ATT y su fragmento peptídico de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 en una muestra de sangre tomada de dicho sujeto se usa en el presente documento para diagnosticar diferencialmente si es probable que dicho sujeto tenga inflamación sistémica (SRIS), sepsis inicial, sepsis grave o choque séptico.

El nivel de ATT y sus fragmentos de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 se determina preferentemente con un ensayo de diagnóstico tal como una prueba de ELISA, espectrometría de masas, espectrometría de masas SELDI-TOF (espectrometría de masas de desorción/ionización por láser potenciada en superficie con analizador de tiempo de vuelo) o LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas).

La divulgación se refiere a un método para tomar decisiones médicas sobre la terapia de un paciente individual en relación con la gravedad de la enfermedad mediante la supervisión de la respuesta de un sujeto con sepsis o una enfermedad similar a la sepsis a la terapia con determinado fármaco, que comprende las etapas de,

- tomar al menos dos muestras de dicho sujeto en diversos puntos de tiempo seleccionados del grupo de,
 - i. antes del inicio de la terapia y/o
 - ii. después del inicio de la terapia y/o
 - iii. en uno o puntos de tiempo adicionales
- determinar ATT o fragmentos de la misma y/o TTR o fragmentos de la misma en dicha muestra tomada de dicho sujeto,
- asociar los niveles de ATT o fragmentos de la misma y/o de TTR o fragmentos de la misma en dichas muestras tomadas de dicho sujeto con una respuesta positiva o negativa a dicho determinado fármaco.

Tal respuesta positiva se da si el nivel de ATT aumenta durante el tratamiento con el fármaco y/o si el nivel de fragmentos de ATT disminuye durante el tratamiento con el fármaco; y/o dicha respuesta positiva se da si el nivel de TTR o de fragmentos de la misma aumenta durante el tratamiento con el fármaco.

La divulgación se refiere preferentemente a un método para tomar decisiones médicas para la terapia de pacientes individuales en un sujeto relacionadas con la gravedad de la enfermedad, que comprende las etapas de,

- tomar al menos una muestra de dicho sujeto en diversos puntos de tiempo posibles seleccionados del grupo de,
 - i. antes del inicio de la terapia y/o
 - ii. después del inicio de la terapia y/o
 - iii. en uno o más puntos de tiempo adicionales
- determinar ATT y/o TTR o fragmentos de las mismas en dicha muestra tomada de dicho sujeto; y
- asociar el/los nivel(es) de ATT y/o TTR o fragmentos de las mismas en dichas muestras tomadas de dicho sujeto

con necesidad de un determinado tratamiento.

Dicha correlación del nivel de ATT o fragmentos de la misma con (i) la sepsis inicial, (ii) la sepsis grave o (iii) el choque séptico se da si el nivel de ATT está por debajo de un determinado valor de corte y/o el nivel de fragmentos proteolíticos de ATT está por encima de un determinado valor de corte; y/o dicha correlación del nivel de TTR o fragmentos de la misma con (i) la sepsis inicial, (ii) la sepsis grave o (iii) el choque séptico se da si el nivel de TTR o fragmentos de la misma está por debajo de un determinado nivel. La invención se refiere preferentemente a un método para diagnosticar diferencialmente una enfermedad en un sujeto, en donde las enfermedades se seleccionan del grupo de (i) inflamación sistémica (SRIS), (ii) sepsis inicial, (iii) sepsis grave o (iv) choque séptico, comprendiendo dicho método las etapas de

- (1) determinar el nivel de ATT y su fragmento peptídico de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 en una muestra de sangre tomada de dicho sujeto, y
- (2) correlacionar el nivel de ATT y sus fragmentos de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 con (i) la sepsis inicial, (ii) la sepsis grave o (iii) el choque séptico,
- (3) en donde dicha correlación del nivel de ATT y sus fragmentos de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 con (i) sepsis inicial, (ii) sepsis grave o (iii) choque séptico se da si el nivel de ATT está por debajo de un determinado valor de corte y el nivel de los fragmentos proteolíticos de ATT de la SEQ ID NO: 4 y/o 10 está por encima de un determinado valor de corte.

Además, la divulgación se refiere a un kit para diagnosticar la sepsis y/o predecir el pronóstico de un paciente con sepsis, que comprende un anticuerpo, un aptámero u otra molécula diana específica para la ATT o fragmentos de la misma y/o la TTR o fragmentos de la misma; datos patrón que muestren la correlación entre las cantidades de ATT o fragmentos de la misma contenidas en la muestra y el pronóstico, y un manual.

Tabla 2: α 1-antitripsina

Secuencia completa de aminoácidos (N- al C-terminal; SEQ ID NO: 1)

10	20	30	40	50	60
MPSSVSWGIL	LLAGLCCLPV	VSLAEDPQGD	AAQKTDTS HH	DQDHPTFNKI	TPNLAEFAFS
70	80	90	100	110	120
LYRQLAHQSN	STNIFFSPVS	IATAFAMLSL	GTKADTHDEI	LEGLNFNLTE	IPEAQIHEGF
130	140	150	160	170	180
QELLRTLNP	DSQLQLTTGN	GLFLSEGLKL	VDKFLEDVKK	LYHSEAFVTN	FGDTEEAKKQ
190	200	210	220	230	240
INDYVEKGTQ	GKIVDLVKEL	DRDTVFAVN	YIFFKGKWER	PFEVKDTEEE	DFHVDQVTTV
250	260	270	280	290	300
KVPMMKRLGM	FNIQHCKKLS	SWVLLMKYLG	NATAIFFLPD	EGKLQHLENE	LTHDIITKFL
310	320	330	340	350	360
ENEDRRSASL	HLPKLSITGT	YDLKSVLGQL	GITKVFSNGA	DLSGVTEEAP	LKLSKAVHKA
370	380	390	400	410	
VLTIIDEKGTE	AAGAMFLEAI	PMSIPPEVKF	NKPFVFLMIE	QNTKSPLFMG	KVVNPTQK

La SEQ ID NO: 14 es la proteína anterior sin el líder y tiene la siguiente secuencia.

EDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAEFAFS LYRQLAHQSN
 STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF
 QELLRTLNP DSQLQLTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEAFVTN
 FGDTEEAKKQ INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTVFAVN YIFFKGKWER
 PFEVKDTEEE DFHVDQVTTV KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG
 NATAIFFLPD EGKLQHLENE LTHDIITKFL ENEDRRSASL HLPKLSITGT
 YDLKSVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA VLTIIDEKGTE
 AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK

La SEQ ID NO: 14 es la proteína anterior sin el líder y tiene la siguiente secuencia.

Tabla 3: Fragmentos preferentes:

SEQ ID NO:	Grado	Tamaño [Dalton]	Sitio de escisión	Secuencia
2	6	2503,9	F ₃₉₆ -L ₃₉₇	LMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
3	4	4047,8	S ₃₈₃ -I ₃₈₄	IPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
4	2	4134,9	M ₃₈₂ -S ₃₈₃	SIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KWNPTQK
5	3	4266,1	P ₃₈₁ -M ₃₈₂	MSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
6	5	4363,2	I ₃₈₀ -P ₃₈₁	PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KWNPTQK
7	3	4476,4	A ₃₇₉ -I ₃₈₀	I PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KWNPTQK
8	4	4547,5	E ₃₇₈ -A ₃₇₉	AI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
9	5	4676,6	L ₃₇₇ -E ₃₇₈	EAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
10	1	4789,7	F ₃₇₆ -L ₃₇₇	LEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
11	6	4936,9	M ₃₇₅ -F ₃₇₆	FLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
12	5	5068,1	A ₃₇₄ -M ₃₇₅	MFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
13	6	5139,2	G ₃₇₃ -A ₃₇₄	AMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK

La Tabla 3 muestra fragmentos de la proteína de longitud completa. La tabla también clasifica los fragmentos en más o menos preferentes para el diagnóstico/pronóstico de la sepsis (véase “grado”: siendo 1 muy preferente y siendo 6 solo preferente).

SEQ ID NO: 6 es un fragmento usado muy preferente para los métodos descritos anteriormente.

SEQ ID NO: 2 se puede usar muy preferentemente.

SEQ ID NO: 3 y/o 4 se pueden usar preferentemente.

SEQ ID NO: 5 se puede usar.

SEQ ID NO: 1, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 también se pueden usar.

En los métodos descritos anteriormente, pueden detectarse uno o más de los fragmentos. Por lo tanto, se divulga cualquier combinación de los fragmentos anteriores.

Además, la invención también se refiere al uso *in vitro* de un polipéptido de acuerdo con las SEQ ID NO: 4 y/o 10 para la estratificación del riesgo y/o el diagnóstico diferencial de la sepsis.

Leyendas de las figuras

Fig. 1: Clasificación de pacientes con SRIS y sepsis

Clasificación de pacientes con SRIS no provocado por una infección (SRIS-PCT+) y pacientes con sepsis (sepsis grave y choque séptico) mediante dos algoritmos de árbol de decisión e identificación del marcador CM_{6.51} como aptitud y su relación con la terapia con Trasylol. A y B, árboles de clasificación (parte superior); CM = conglomerado obtenido a partir de matrices de CM10; C1 = conglomerado obtenido a partir de matrices de Q10. Análisis de la curva de eficacia diagnóstica (centro) y resultados de significación de clase (parte inferior) al usar conglomerados de picos y algoritmos de árboles de decisión para discriminar grupos de pacientes (sepsis; SRIS-PCT+); azul = muestras de entrenamiento, verde = muestras de prueba con ocultación, naranja = muestras de prueba con ocultación reanalizadas 5 meses más tarde, rojo = 19 muestras de prueba de la UCI que se recogieron prospectivamente para la validación del árbol de decisión. C, perfiles representativos de la región m/z adyacente al marcador 6.51 de Trasylol (parte superior), procedente de un único individuo con SRIS no provocado por una infección (SRIS-PCT+) (centro) y de un único individuo con sepsis (parte inferior) en chips de CM10. Los picos de los patrones internos usados para calibración interna se marcan (flechas).

Fig. 2: Segundo árbol de decisión alternativo sin considerar CM_{6.51} para la clasificación de pacientes con SRIS no provocado por una infección (SRIS-PCT+) y pacientes con SRIS provocado por una infección (sSEPSIS) (sepsis grave/choque séptico) investigados mediante el algoritmo de árboles de decisión.

Árbol de clasificación; QC y C1= conglomerado obtenido a partir de matrices de Q10 (panel de la parte superior); análisis de la curva ROC (panel inferior derecho) y resultados de clasificación (panel inferior izquierdo) al usar

conglomerados de picos y el algoritmo de árbol de decisión para discriminar grupos de pacientes (SRIS-PCT+; sSEPSIS) azul = muestras de entrenamiento, verde = muestras de prueba con ocultación, naranja = muestras de prueba con ocultación reanalizadas 5 meses más tarde, rojo = 19 muestras de prueba de la UCI que se recogieron prospectivamente para la validación del árbol de decisión.

Fig. 3: Ejemplos representativos de perfiles normalizados de matrices ProteinChip de muestras de SRIS-PCT+ y sSEPSIS

Ejemplos representativos de perfiles normalizados de matrices ProteinChip de muestras de SRIS-PCT+ y sepsis. Patrones proteicos de SELDI-TOF-MS representativos de pacientes de los diferentes grupos investigados ilustrados en un gel. Izquierda: Chip tipo Q10; intervalo bajo, 4,4 a 5 kd Chip tipo Q10; conglomerado de picos C1_4.7. Centro: Chip tipo Q10; intervalo medio, 12,5 a 15 kd; conglomerado de picos C1_13.8. Derecha: Chip tipo Q10; intervalo alto, 30 a 60 kd; conglomerado de picos QC_55.7. Los conglomerados de picos que diferencian los pacientes de SRIS-PCT+ y sepsis están destacados con flechas y recuadros.

Fig. 4: Identificación y validación del pico expresado diferencialmente C1_13.8 como transtiretina (TTR)

(A) Análisis por transferencia de Western de la TTR; sSRIS = muestra de paciente de SRIS-PCT+; sSEPSIS = muestra de paciente de sSEPSIS; + = control positivo de TTR; - control negativo. (B) Diagrama de cajas de las concentraciones de TTR (en µg/ml) de 69 muestras de sSEPSIS y 59 de SRIS-PCT+. (C) Perfiles representativos normalizados de matrices ProteinChip de muestras luego del empobrecimiento inmunitario utilizando un anticuerpo específico frente a TTR (panel inferior) o un anticuerpo de control para confirmar la relación entre la TTR y el marcador expresado diferencialmente C1_13.8.

Fig. 5: Purificación e identificación de QC_55.7 y C1_4.7

(A) Gel PAGE Maxi al 10 % de muestras de SRIS-PCT+ y sSEPSIS que muestra tres manchas identificadas como alfa-1-antitripsina (AAT) y fibrinógeno (FBG) por digestión en gel, análisis MALDI-TOF/TOF y de MS (B) Transferencia de Western anti-AAT que muestra que la AAT está presente en dos isoformas, donde la banda inferior se expresa predominantemente en las muestras de sSEPSIS (C) Isoelectroenfoco de la AAT para demostrar la fragmentación aumentada de la AAT en las muestras de sSEPSIS en comparación con las muestras de los pacientes de SRIS-PCT+. (D) Para respaldar que el pico de 4,79 kDa se genera mediante la escisión de la AAT en los pacientes de sSEPSIS, los inventores incubaron AAT con una pequeña cantidad de plasma de los pacientes de sSEPSIS; la AAT se escinde en presencia de plasma de sSEPSIS, lo que da como resultado un fragmento de 4,78 kDa. (E) Perfil representativo de una matriz ProteinChip luego de la precipitación de las proteínas séricas contaminantes en presencia de agentes reductores. El enriquecimiento de la AAT se demuestra por un aumento de la intensidad de los picos de AAT a 55,7 kDa y el pico con marcado doble en el intervalo de 28 kDa (55982,11 +2H) en comparación con un pico de albúmina casi ausente.

Fig. 6: Secuencias de aminoácidos

Secuencias de aminoácidos del centro activo de la antitripsina (con tamaños).

Fig. 7: Paciente con sepsis

Espectro SELDI de un paciente con sepsis con fragmentos de la antitripsina.

Fig. 8: Paciente con sepsis

Cuantificación de los fragmentos de antitripsina de 4,8 kd mediante LC-MS en cuatro poblaciones de pacientes. Los niveles son significativamente mayores en las poblaciones de pacientes con infección subyacente en comparación con pacientes con politraumatismo y SRIS sin infección. Puede medirse una concentración media-alta en los pacientes con neutropenia e infección leve.

Fig. 9: Secuencia completa de aminoácidos de la α1-antitripsina (N- al C-terminal) y fragmentos de la misma.

Fig. 10: El nivel de biomarcador únicamente aumenta en los pacientes con sepsis grave. Comparación del nivel de biomarcador en muestras tomadas de sujetos que tienen sepsis grave o SRIS grave y el nivel de biomarcador en muestras tomadas de sujetos que tienen mastocarcinoma (Mamma-Ca).

Ejemplos

Tabla 1: Características clínicas de los pacientes

Los datos se presentan como media ± DT (los valores se redondearon a la décima más cercana) y porcentajes. SRIS-PCT- corresponde a niveles séricos de PCT <0,3 ng/ml; SRIS-PCT+ corresponde a niveles séricos de PCT >0,3 ng/ml. *APACHE-II = forma sigla en inglés de *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*, clasificación fisiológica de enfermedades agudas y crónicas. Esta escala varía de 0 a 71, donde los valores más altos indican una mayor gravedad de la dolencia. **SOFA= Puntuación de evaluación de insuficiencia orgánica secuencial. Las subpuntuaciones del SOFA varían entre 0 y 4 para cada uno de los seis sistemas de órganos, con una puntuación total de 0 a 24 y con puntuaciones más altas que indican una disfunción orgánica más grave..

Materiales y métodos

Los pacientes que ingresaron a la unidad de cuidados intensivos (UCI) del Dto. de Anestesiología y Cuidados Intensivos entre septiembre de 2002 y septiembre de 2003, y entre enero de 2006 y marzo de 2006 participaron en este estudio si cumplían los criterios de sepsis establecidos por la Conferencia de consenso ACCP/SCCM o con los criterios de SRIS de origen no infeccioso con disfunción orgánica aguda, respectivamente (código ICD-10-GM).

En los pacientes con SRIS de origen no infeccioso, se obtuvieron muestras de sangre luego del ingreso a la UCI; en 67 pacientes con SRIS (83 %) dentro de las 24 horas, en 7 pacientes (8,6 %) dentro de las 48 horas y para el resto de los pacientes más de 48 horas después del ingreso a la UCI, y en pacientes con sepsis grave/choque séptico dentro de las 24 horas posteriores al inicio de la disfunción orgánica inicial inducida por la sepsis. Se excluyeron los pacientes menores de 18 años, las embarazadas y los pacientes sin consentimiento informado. Los pacientes con SRIS de origen no infeccioso se estratificaron a su vez en función de sus concentraciones de procalcitonina sérica el día de la inclusión en el estudio. Los niveles séricos de PCT <0,3 ng/ml se clasificaron como SRIS con PCT-negativa (SRIS-PCT-), los niveles elevados de PCT sérica se clasificaron como SRIS con PCT-positiva (SRIS-PCT+). Un comité local de ética aprobó este estudio.

De acuerdo con un protocolo normalizado, se extrajeron 10 ml de sangre arterial en tubos con EDTA (Sarstedt, Nuembrecht, Alemania). Inmediatamente después, se añadieron 800 µl de un cóctel inhibidor de proteasas (Complete Mini, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Los tubos se mezclaron con cuidado y se centrifugaron a 3750 rpm (2516 g en el centro del tubo) a 4 °C durante 10 minutos, inmediatamente después, se congelaron alícuotas de plasma a -80 °C. En total, se recogieron 166 muestras de 159 pacientes; en 7 pacientes que cambiaron de estado, p. ej., de SRIS a sSEPSIS, se recogieron dos muestras en distintos momentos de la estadía en la UCI y se las asignó a los grupos de muestras correspondientes.

Se realizó espectrometría de masas SELDI-TOF en un lector de SELDI ProteinChip Serie 4000 (Bio-Rad, Hercules, CA), para la dilución de las muestras y el procesamiento de los ProteinChip se usó una estación de manipulación de líquidos Biomek 2000. Las muestras se descongelaron de un día para otro a 4 °C y se analizaron por duplicado. Se descongelaron alícuotas una o dos veces para el primer experimento y el tercero, respectivamente. En el segundo experimento, se usaron las alícuotas restantes del primer experimento, ya desnaturalizadas con tampón U9 y luego conservadas a -80 °C hasta el análisis. Para el análisis de los chips de proteínas, se desnaturalizaron muestras de 40 µl con 60 µl de tampón desnaturalizante (urea 9 M, CHAPS al 1 %) y se las incubó durante 30 minutos. 20 µl de la muestra desnaturalizada se diluyeron en una proporción 1 a 5 en Tris-HCl 0,1 mol/l, pH 9,0 (Q10), o en HEPES 0,05 mol/l de, pH 7,3 (CM10) y se cargaron en matrices ProteinChip Q10 (matriz de intercambio aniónico fuerte; Ciphergen Biosystems Inc, Fremont, CA) y en matrices ProteinChip CM10 (matriz de intercambio catiónico débil; Ciphergen Biosystems Inc, Fremont, CA), respectivamente, luego de realizar el debido tratamiento previo y lavado de los chips. Luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en un agitador DPC MicroMix 5 (Promega, Madison, WI), los chips se lavaron tres veces con tampones adecuados y se enjuagaron dos veces con agua. Para eliminar el líquido restante, los ProteinChip se centrifugaron durante 10 segundos a 2950 rpm y se dejaron secar al aire durante 5 minutos. Antes de analizar los chips se aplicaron a la superficie de aplicación puntual 1 µl de una solución saturada de moléculas absorbentes de energía (MAE) (5 mg de ácido sinapínico disueltos en 75 µl de acetronitrilo y 75 µl de ácido trifluoroacético al 1 %). El análisis de masas se realizó en un lector ProteinChip (PCS 4000, Ciphergen Biosystems Inc, Fremont, CA) con un protocolo automático de recolección de datos que incluía 350 disparos de láser. Se usó un intervalo de masas de 1-200 kDa dividido en dos partes espectrales: 1-30 kDa y 30-200 kDa. La energía del láser para las mediciones en el intervalo de 1-30 kDa y de 30-200 kDa se ajustó, respectivamente, a 3000 nJ y 4900 nJ para los chips CM10 (disparos de calentamiento de 3700 nJ y 5500 nJ) y a 3250 nJ y 5200 nJ para los chips Q10 (disparos de calentamiento de 3750 nJ y 5900 nJ). En cada punto, los datos se promediaron para formar un espectro. La precisión de masa se calibró internamente con patrones proteicos conocidos y externamente utilizando un patrón de pesos moleculares peptídicos/proteicos de tipo "todo en uno".

Los espectros se normalizaron por corriente iónica total (CIT). En la mayoría de los casos, en concreto en los primeros árboles de decisión, esto se hizo en dos regiones diferentes (1,5-200 kDa y 5,5-200 kDa); los espectros con factores de normalización por encima de 2,55 veces y por debajo de 0,42 veces el factor de normalización medio se excluyeron del análisis. Para garantizar que las intensidades de los picos se pudiesen comparar entre distintos experimentos, se usaron coeficientes de normalización externos obtenidos luego de la normalización del primer experimento. Los picos se detectaron utilizando el programa informático Ciphergen Express Software (versión 3.0; Ciphergen Biosystems Inc, Fremont CA) en tres regiones diferentes (es decir, m/z de 1500-10.000, 10.000-30.000 y 30.000-200.000) para cada tipo de chip. Se detectaron los conglomerados de picos luego de restar el nivel basal en las siguientes condiciones: razón S/R > 5 con un umbral de pico mínimo de 5 % en la primera pasada y una S/R > 2 con una ventana másica del conglomerado del 0,1 % al 0,3 % dependiendo de la región de conglomerado analizada para la finalización de conglomerados en la segunda pasada. Después, los valores de intensidad de cada pico se promediaron para cada pareja de muestras duplicadas analizada. Los datos sobre los picos en las tres regiones m/z distintas se exportaron como archivos CSV a Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA). Se realizó un análisis CART (forma siglada del inglés *classification and regression tree analysis*, análisis de árboles de clasificación y regresión), con el programa informático Ciphergen Biomarker Pattern (BPS) versión 5.0. Los archivos

CSV que contenían los datos sobre los picos en las tres regiones másicas distintas procedentes de los dos tipos de chips se combinaron para obtener un archivo que comprendía las intensidades de los picos de todo el intervalo de masas (1,5 a 200 kDa). Los datos del conjunto de entrenamiento se importaron al programa informático BPS y se estableció un árbol de clasificación como se describió anteriormente.

El análisis estadístico se realizó con SPSS 18. Para el cálculo de las intensidades medias de los picos y la creación de los diagramas de caja y las curvas ROC de marcadores individuales del segundo árbol de decisión (Fig. S2 A-C), únicamente se incluyeron las muestras con conjuntos de datos completos de los tres marcadores.

Las proteínas se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico y/o por SDS-PAGE unidimensional. Se extrajeron las manchas de un tamaño correspondiente, se digirieron con tripsina en el gel y se analizaron por MS. Para obtener más detalles, véase el texto complementario que acompaña la versión en línea del presente artículo.

La α -1-antitripsina (AAT) se enriqueció de acuerdo con un método modificado de Glaser *et al.* (15). La transtiretina (TTR) se midió por nefelometría cinética en un sistema IMAGE® Immunochemistry System de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Beckman Coulter, Brea, CA).

Resultados

Para evaluar la capacidad de la SELDI-TOF MS para distinguir los pacientes con SRIS de origen no infeccioso de los pacientes con sSEPSIS, se analizaron los perfiles proteicos plasmáticos en muestras de pacientes agrupados de acuerdo con los criterios consenso de la Conferencia de Consenso ACCP/SCCM. Se incluyeron 166 muestras de 159 pacientes individuales, 81 muestras de pacientes con sepsis grave o choque séptico (sSEPSIS) y 85 muestras de pacientes con SRIS sin infección. En 7 pacientes que cambiaron de estado, p. ej., de SRIS a sSEPSIS, se incluyeron dos muestras y se las asignó a los grupos de muestras respectivos. Los pacientes con SRIS de origen no infeccioso se clasificaron a su vez, de acuerdo con su concentración sérica de PCT el día de la inscripción, en pacientes con SRIS con PCT negativa (PCT < 0,3 ng/ml) (SRIS-PCT-) y pacientes con SRIS con PCT positiva (PCT > 0,3 ng/ml) (SRIS-PCT+).

El protocolo para identificar los patrones de masa diagnósticos incluyó las siguientes etapas: (1) el análisis de un conjunto de entrenamiento que comprende muestras con diagnóstico conocido para obtener un árbol de decisión; (2) validación de la capacidad de discriminación de un árbol de decisión dado en un conjunto de prueba de otros pacientes de la misma cohorte; (3) un prueba de la reproducibilidad de esta discriminación, repitiendo el análisis del mismo conjunto de prueba 5 meses más tarde; y (4) la replicación del análisis en un conjunto de prueba independiente con ocultación. Las características clínicas de los pacientes de SRIS-PCT-, SRIS-PCT+ y sSEPSIS asignados a los grupos de entrenamiento, de prueba y de prueba prospectivo se muestran en la Tabla 1.

UN ALGORITMO PERFECCIONADO DISTINGUE ENTRE LOS PACIENTES de SRIS-PCT-POSITIVOS Y sSEPSIS PERO DEPENDE DE LA APROTININA, RELACIONADA CON LA TERAPIA CON TRASYLOR

La PCT no logra discriminar las muestras de pacientes de SRIS de las muestras de pacientes de sSEPSIS

En primer lugar, los inventores evaluaron el valor diagnóstico de la PCT para la discriminación de los pacientes con SRIS inducido por infección y no inducido por infección en la cohorte de estudio de los inventores. Los valores de la mediana de PCT de las muestras SRIS (n = 75; PCT = 6,79 [mediana]; 3,38-11,50 [percentil 25-75]) y sSEPSIS (n= 72; PCT= 4,02 [mediana]; 1,84 a 12,46 [percentil 25-75]) no fueron significativamente diferentes (p= 0,62, prueba U de Mann-Whitney). Un análisis de la curva ROC reveló que la PCT no es suficiente para discriminar las muestras de pacientes de SRIS de los de sSEPSIS (ABC=0,525; IC al 95 % = 0,428-0,621; Fig. S1A del material complementario en línea). Esto es cierto si observamos la capacidad de discriminación de la PCT para distinguir únicamente las muestras SRIS-PCT+ de las sSEPSIS en el grupo de entrenamiento, de prueba y de prueba prospectivo (ABC = 0,411-0,69; Fig. S1B-D del material complementario en línea).

Un algoritmo discrimina los pacientes de SRIS-PCT+ de los pacientes de sSEPSIS y se valida en un conjunto de prueba con ocultación

A continuación, los inventores se preguntaron si los perfiles de masas podían estratificar, a su vez, entre los pacientes de SRIS-PCT+ y sSEPSIS. Para tal fin, se realizó un análisis CART con espectros de 54 pacientes (sSEPSIS: n=31, PCT=25,84 $\pm$ 75,4; SRIS-PCT+: n=23 PCT=20,01 $\pm$ 34,3; Tabla 1). Los algoritmos de clasificación obtenidos revelaron un pico en 6,5 kDa como importante para la discriminación entre los casos de sSEPSIS y SRIS-PCT+. Dos algoritmos de ejemplo representados en la Figura 1 permitieron la correcta identificación del 96 % y el 100 % de los casos de sSEPSIS y SRIS-PCT+, respectivamente. Para la validación de estos resultados, se usó un conjunto de prueba con ocultación con otros 77 pacientes (Tabla 1) de la misma serie (SRIS-PCT+: n=36, PCT=16,98 $\pm$ 26,1; sSEPSIS: n=41, PCT=15,82 $\pm$ 33,1). Nuevamente, los algoritmos de clasificación que se representan en la Figura 1A/B predijeron correctamente 37/36 pacientes con sSEPSIS y 24/25 pacientes con SRIS-PCT+, respectivamente (sensibilidad=90,2 %/87,8 %, especificidad=66,6 %/69,4 %, ABC para la predicción del conjunto de prueba: sSEPSIS=0,756/0,753).

La repetición muestra la reproducibilidad del análisis del patrón de proteínas de diagnóstico a lo largo del tiempo y permite la validación clínica en un conjunto de prueba independiente

El conjunto de prueba con ocultación se reanalizó 5 meses más tarde usando las mismas condiciones que en el conjunto de entrenamiento. Usando los mismos árboles de decisión, los inventores obtuvieron resultados similares para la identificación correcta de los pacientes de sSEPSIS (78 %; 29/37; ABC=0,841) y SRIS-PCT+ (92,8 %; 26/28; ABC=0,872) (Fig. 1). Para una validación adicional, el análisis se repitió en una muestra con ocultación independiente de 19 pacientes de la UCI PCT-positivos al momento del muestreo y luego asignados retrospectivamente al grupo sSEPSIS (n=9) o SRIS-PCT+ (n=10) de acuerdo con criterios clínicos convencionales. Como se muestra en la Fig. 1, las muestras se identificaron correctamente en el 77 %/66 % y 100 %/100 % de los casos de sSEPSIS y SRIS-PCT+, respectivamente.

El marcador CM_6.51 se identifica como relacionado con la aprotinina para el tratamiento con Trasylol®

A continuación, los inventores intentaron identificar el primer marcador expresado de forma diferencial expreso, CM_6.51. En 2002/2003, cuando se recogieron las muestras para el presente estudio, los pacientes sometidos a una cirugía de injerto de revascularización coronaria (CIRC) recibían comúnmente aprotinina (Trasylol®) para reducir la hemorragia perioperatoria y la necesidad de transfusiones sanguíneas; la mayoría de los pacientes de SRIS-PCT+ se sometieron a una cirugía cardíaca (Tabla 1). En 70 de los 98 pacientes sometidos a cirugía cardíaca, se disponía de registros para la evaluación retrospectiva de la dosis de aprotinina; la mayoría (94,29 %) recibió dosis totales de Trasylol de entre 0,5 y 8 millones de UIK. La aprotinina es un inhibidor natural de proteinasas con un peso molecular de 6,512 kDa. La prueba de que CM_6.51 es la aprotinina se obtuvo comparando los espectros de SELDI-TOF luego de la aplicación de Trasylol® en chips CM10 con los espectros de los pacientes de SRIS-PCT+ que recibieron Trasylol® (Fig. 1). El marcador CM_6.51, en 6512,74 Da, corresponde al pico de la aprotinina en 6512,78 Da; además, el marcador CM_6.51 únicamente está presente en el paciente SRIS-PCT+ (muestra 162; 5 millones de UIK de Trasylol®) pero está casi ausente en el paciente de sSEPSIS (muestra 140) que no recibió Trasylol®. La intensidad del pico de CM_6.51 se correlaciona con la dosis total de Trasylol® aplicada a los pacientes con SRIS que recibieron más de 1,5 millones de UIK de Trasylol® (coeficiente de correlación de Pearson = 0,848; $p < 0,001$). Así, CM_6.51 realmente discrimina entre grupos de pacientes diferentes, dado que refleja la administración profiláctica de Trasylol® en los pacientes sometidos a una cirugía de circulación extracorpórea; sin embargo, no es un marcador patofisiológico en el curso de la SRIS infecciosa (sepsis grave/choque séptico) / no infecciosa con disfunción orgánica grave.

UN ÁRBOL DE DECISIÓN ALTERNATIVO DE DISCRIMINACIÓN ES INDEPENDIENTE DE CM_6.51

Para la generación de árboles de decisión alternativos, los inventores evaluaron diferentes situaciones de análisis, por ejemplo, la exclusión del marcador CM_6.51 anteriormente mencionado). La Fig. 2 representa un segundo árbol de decisión que discrimina los pacientes de sSEPSIS de los pacientes de SRIS-PCT+ (93 % de sensibilidad, 95 % de especificidad) en el conjunto de aprendizaje. Resulta interesante que este árbol comprende dos conglomerados (4,7 kDa, 13,8 kDa) que ya se habían mostrado como predictores importantes en los primeros árboles de decisión. El otro separador principal adicional se detectó en la superficie de Q10 con una masa molecular de aproximadamente 55,7 kDa. En la Fig. 3 se muestra un ejemplo representativo de perfiles de matrices ProteinChip normalizados obtenidos. La primera validación de este árbol de decisión en el conjunto de prueba dio como resultado sensibilidades y especificidades del 85,3 % y el 86,1 % (Fig. 2). Esta validación se reprodujo tras 5 meses como valores del 86,4 % y el 92,8 %, respectivamente (Fig. 2). Utilizando este árbol de decisión en el conjunto de prueba con ocultación de repetición dio como resultado una vez más la identificación correcta del 88,8 % y el 90 % de los pacientes con sSEPSIS y SRIS-PCT+ (área bajo la curva ROC (integral de ROC) del algoritmo de clasificación completo ABC=0,911, Fig. 2). Las áreas de las curvas ROC individuales de los tres marcadores relevantes en las primeras muestras de prueba y en las muestras de prueba independientes con ocultación para la predicción de SRIS-PCT+ y sSepsis estuvieron en el intervalo de 0,895-0,933 (QC_55.7), 0,656-0,910 (C1_13.8) y 0,712-0,922 (C1_4.7), respectivamente (Fig. S2 A-C del material complementario en línea).

LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS DE FORMA DIFERENCIAL PERMITE LA VALIDACIÓN MEDIANTE INMUNOENSAYOS CONVENCIONALES E INMUNOCAPTURA CON SELDI-TOF MS

Para la identificación de proteínas expresadas de forma diferencial se usaron muestras en las cuales los picos de las proteínas de interés estaban presentes en gran abundancia. Para la identificación de la fracción proteica de 13,8 kDa 4, obtenida tras el fraccionamiento de una alícuota de la muestra p218 por cromatografía de intercambio aniónico, se purificó en un Mini-PAGE al 12 %. El pico en m/z 55,7 kDa se purificó en un Maxi-PAGE al 10 %; se extrajeron las manchas del tamaño correspondiente y se digirieron con tripsina en el gel. El análisis por MALDI-TOF/TOF de los fragmentos obtenidos y la posterior búsqueda en MASCOT permitió identificar al marcador C1_13.8 como la transtiretina (TTR). La asignación de la TTR a la proteína expresada de forma diferencial de 13,8 kDa se confirmó inicialmente por análisis de transferencia western, lo que mostró que la TTR se expresa predominantemente en un paciente de SRIS-PCT+, aunque no se detecta en un paciente de sSEPSIS (Fig. 4A). En segundo lugar, la TTR se midió en 69 muestras de sSEPSIS y 59 de SRIS-PCT+; las concentraciones medias fueron

de 7,15 mg/dl (IC al 95 % = 6,35-7,95) y 10,7 mg/dl (IC al 95 % = 10,0-11,5), respectivamente (Fig. 4B), lo que demuestra que las intensidades del pico de C1_13.8 se correlacionan con los resultados de inmunoensayos convencionales para la TTR (Fig. S2B). Por último, el empobrecimiento inmunitario utilizando un anticuerpo específico frente a la TTR da como resultado una reducción notable de la intensidad del pico de 13,8 kDa en comparación con la intensidad del pico observada tras utilizar un anticuerpo de control (Fig. 4C).

Para la identificación del pico en m/z 55,7 kDa, el análisis de tres manchas obtenidas tras la purificación en un Maxi-PAGE al 10 % (Fig. 5A) llevó a la identificación de la alfa-1-antitripsina (AAT) y el fibrinógeno (FBG). El análisis de transferencia de western en los pacientes de SRIS-PCT+ y sSEPSIS no mostró diferencias en la expresión del FBG (datos no mostrados), mientras que la AAT está presente en dos isoformas, siendo la banda inferior predominante en las muestras de sSEPSIS (Fig. 5B). Esto lleva a los inventores a la suposición de que la AAT se degrada en los pacientes con sSEPSIS. Para confirmar esta hipótesis los inventores analizaron las isoformas de AAT por isoelectroenfoque. Como se muestra en la Fig. 5C, los inventores observaron una fragmentación más pronunciada de la AAT en las muestras de sSEPSIS en comparación con las muestras de los pacientes de SRIS-PCT+. Este resultado está de acuerdo con los hallazgos de Vissers *et al.*, quienes mostraron que las metaloproteinasas liberadas por los neutrófilos en los sitios de inflamación escinden la AAT (16). El tamaño esperado del fragmento es de 4790 Da, que es exactamente el tamaño del tercer pico discriminatorio importante observado en los pacientes de sSEPSIS en los chips de Q10 en 4,79 kDa. Para confirmar que este pico se genera por la escisión de la AAT en los pacientes de sSEPSIS, los inventores incubaron AAT (Prolastin®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Alemania) con una pequeña cantidad de plasma de pacientes de sSEPSIS; como se muestra en la Fig. 5D, la AAT se escinde en presencia de plasma de sSEPSIS, dando como resultado un fragmento de 4,78 kDa que está ausente en la muestra de control. Este resultado concuerda con el hallazgo de que la expresión reducida del pico de 55,7 kDa observada en las muestras de sSEPSIS (Fig. S2C del material complementario en línea) viene acompañada de una intensidad aumentada del pico en el intervalo de 50 kDa (datos no mostrados). Por último, para confirmar adicionalmente que el pico de 55,7 kDa corresponde a la AAT, en primer lugar los inventores inmunocapturaron la AAT. Después, en segundo lugar, luego de observar solo una pequeña reducción en la intensidad del pico de 55,7 kDa y el pico de 28 kDa con marcado doble (datos no mostrados), los inventores enriquecieron la AAT basándose en un método modificado de Glaser *et al.* (15) por precipitación de proteínas plasmáticas contaminantes en presencia de agentes reductores. Como se muestra en la Fig. 5E, el enriquecimiento de la AAT trae aparejado un aumento notable del pico de 55,7 kDa y el pico con doble marcado en el intervalo de 28 kDa, en comparación con las intensidades de los picos de otras proteínas, por ejemplo albúmina, lo que respalda aún más que el pico de 55,7 kDa es efectivamente la AAT.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universitätsklinikum Jena

<120> Diagnóstico de la sepsis y del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

<130> T3191 EP BLN

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 418

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 656 150 T3

Met	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Trp	Gly	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Cys	1	5	10	15
Cys	Leu	Val	Pro	Val	Ser	Leu	Ala	Glu	Asp	Pro	Gln	Gly	Asp	Ala	Ala	20	25	30	
Gln	Lys	Thr	Asp	Thr	Ser	His	His	Asp	Gln	Asp	His	Pro	Thr	Phe	Asn	35	40	45	
Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Leu	Ala	Glu	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Tyr	Arg	Gln	50	55	60	
Leu	Ala	His	Gln	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Ile	Phe	Phe	Ser	Pro	Val	Ser	65	70	75	80
Ile	Ala	Thr	Ala	Phe	Ala	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Ala	Asp	Thr	85	90	95	
His	Asp	Glu	Ile	Leu	Glu	Gly	Leu	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Pro	100	105	110	
Glu	Ala	Gln	Ile	His	Glu	Gly	Phe	Gln	Glu	Leu	Leu	Arg	Thr	Leu	Asn	115	120	125	
Gln	Pro	Asp	Ser	Gln	Leu	Gln	Leu	Thr	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Phe	Leu	130	135	140	
Ser	Glu	Gly	Leu	Lys	Leu	Val	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Lys	145	150	155	160
Leu	Tyr	His	Ser	Glu	Ala	Phe	Thr	Val	Asn	Phe	Gly	Asp	Thr	Glu	Glu	165	170	175	
Ala	Lys	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Tyr	Val	Glu	Lys	Gly	Thr	Gln	Gly	Lys	180	185	190	

```

Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu
    195                                200                                205

Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val
    210                                215                                220

Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val
    225                                230                                235                                240

Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys
    245                                250                                255

Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala
    260                                265                                270

Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu
    275                                280                                285

Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp
    290                                295                                300

Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr
    305                                310                                315                                320

Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe
    325                                330                                335

Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys
    340                                345                                350

Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly
    355                                360                                365

Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile
    370                                375                                380

Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu
    385                                390                                395                                400

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr
    405                                410                                415

Gln Lys

```

<210> 2
 <211> 22
 <212> PRT

ES 2 656 150 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val
1 5 10 15

Val Asn Pro Thr Gln Lys
20

5

<210> 3

<211> 36

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met
1 5 10 15

Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn
20 25 30

Pro Thr Gln Lys
35

15

<210> 4

<211> 37

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu
1 5 10 15

Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val
20 25 30

Asn Pro Thr Gln Lys
35

25

<210> 5

<211> 39

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 5

ES 2 656 150 T3

Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val
1 5 10 15

Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys
20 25 30

Val Val Asn Pro Thr Gln Lys
35

<210> 6
<211> 40
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 6

Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe
1 5 10 15

Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly
20 25 30

Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys
35 40

<210> 7
<211> 42
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 7

Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys
1 5 10 15

Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe
20 25 30

Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys
35 40

<210> 8
<211> 43
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 8

ES 2 656 150 T3

Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn
1 5 10 15

Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu
20 25 30

Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys
35 40

<210> 9
<211> 44
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 9

Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe
1 5 10 15

Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro
20 25 30

Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys
35 40

<210> 10
<211> 45
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 10

Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys
1 5 10 15

Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser
20 25 30

Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys
35 40 45

REIVINDICACIONES

1. Un método para la estratificación del riesgo de mortalidad y/o de la evolución de la enfermedad de un sujeto que tiene o del que se sospecha que tiene sepsis, que comprende:
 - a) determinar el nivel de antitripsina (ATT) y de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 en una muestra de sangre tomada de dicho sujeto
 - b) en donde el nivel de ATT y de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 se correlaciona con un riesgo de mortalidad aumentado, y en donde
 - c) dicho riesgo de mortalidad aumentado y/o de mala evolución de la enfermedad se da si el nivel de ATT está por debajo de determinado valor de corte y el nivel del fragmento de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 está por encima de determinado valor de corte.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el nivel de ATT y de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 se correlaciona con la predicción o la estratificación del riesgo de mortalidad y/o de la evolución de la enfermedad mediante un método que se selecciona de las siguientes alternativas:
 - a) la correlación del nivel de ATT y de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 con respecto a la mediana del nivel en un conjunto de muestras predeterminadas,
 - b) la correlación del nivel de ATT y de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 con respecto a los cuantiles en un conjunto de muestras predeterminadas, y
 - c) la correlación con un modelo matemático, tal como, por ejemplo, la regresión de Cox.
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - a) en donde el valor de corte de ATT es de 2 g/l y puede desviarse hasta un 20 % dependiendo del paciente analizado.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el nivel de ATT o de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 se correlaciona con un riesgo de mortalidad aumentado
 - a) para ATT por debajo del nivel de la mediana de la población normal
 - b) para el fragmento peptídico de ATT de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 por encima del nivel de la mediana de la población normal.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una muestra corresponde a uno o más de los siguientes puntos temporales: cuando el sujeto ingresa por primera vez a un establecimiento médico o en la ambulancia, cuando el sujeto está en el servicio de urgencias, cuando el sujeto está en la unidad de cuidados intensivos, antes del tratamiento, después del inicio del tratamiento, 24 horas después del inicio del tratamiento, 48 horas después del inicio del tratamiento y/o 72 horas después del inicio del tratamiento.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto se encuentra en un estado seleccionado del grupo que comprende: sepsis, sepsis grave y choque séptico.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde, además de la predicción o la estratificación del riesgo de mortalidad y/o de la evolución de la enfermedad de dicho sujeto, la determinación de la presencia y/o el nivel de ATT y su fragmento de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 en una muestra tomada de dicho sujeto se utiliza para diagnosticar diferencialmente si es probable que dicho sujeto tenga inflamación sistémica (SRIS), sepsis inicial, sepsis grave o choque séptico.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el nivel de ATT y su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 se determina con un ensayo diagnóstico tal como una prueba de ELISA o espectrometría de masas, o espectrometría de masas de desorción/ionización por láser potenciada en superficie con analizador de tiempo de vuelo, espectrometría de masas y HPLC.
9. Un método para tomar decisiones médicas para la terapia de un paciente individual relacionado con la gravedad de la enfermedad, mediante la supervisión de la respuesta terapéutica a un determinado fármaco en un sujeto con sepsis, que comprende las etapas de:
 - a) determinar el nivel de ATT y de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 en al menos dos muestras de sangre de dicho sujeto proporcionadas en diversos puntos temporales seleccionados del grupo de
 - i. antes del inicio de la terapia y/o
 - ii. después del inicio de la terapia,
 - iii. en uno o más puntos temporales adicionales;

b) asociar los niveles de ATT y de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 en dicha muestra tomada de dicho sujeto con una respuesta positiva o una negativa a dicho determinado fármaco.

5 10. Un método para diagnosticar diferencialmente una enfermedad en un sujeto, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que comprende (i) inflamación sistémica (SRIS), (ii) sepsis inicial, (iii) sepsis grave o (iv) choque séptico, comprendiendo el método las etapas de:

a) determinar el nivel de ATT y de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 en una muestra de sangre tomada de dicho sujeto, y

10 b) correlacionar el nivel de ATT y de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 con (i) sepsis inicial, (ii) sepsis grave o (iii) choque séptico,

en donde dicha correlación del nivel de ATT y de su fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 con (i) sepsis inicial, (ii) sepsis grave o (iii) choque séptico se da si el nivel de ATT está por debajo de un determinado valor de corte y el nivel del fragmento peptídico de las SEQ ID NO: 4 y/o 10 está por encima de un determinado valor de corte.

15

11. Uso *in vitro* de un polipéptido que consiste en la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 o 10 para la estratificación del riesgo y/o el diagnóstico diferencial de sepsis.

20

FIG 1A:

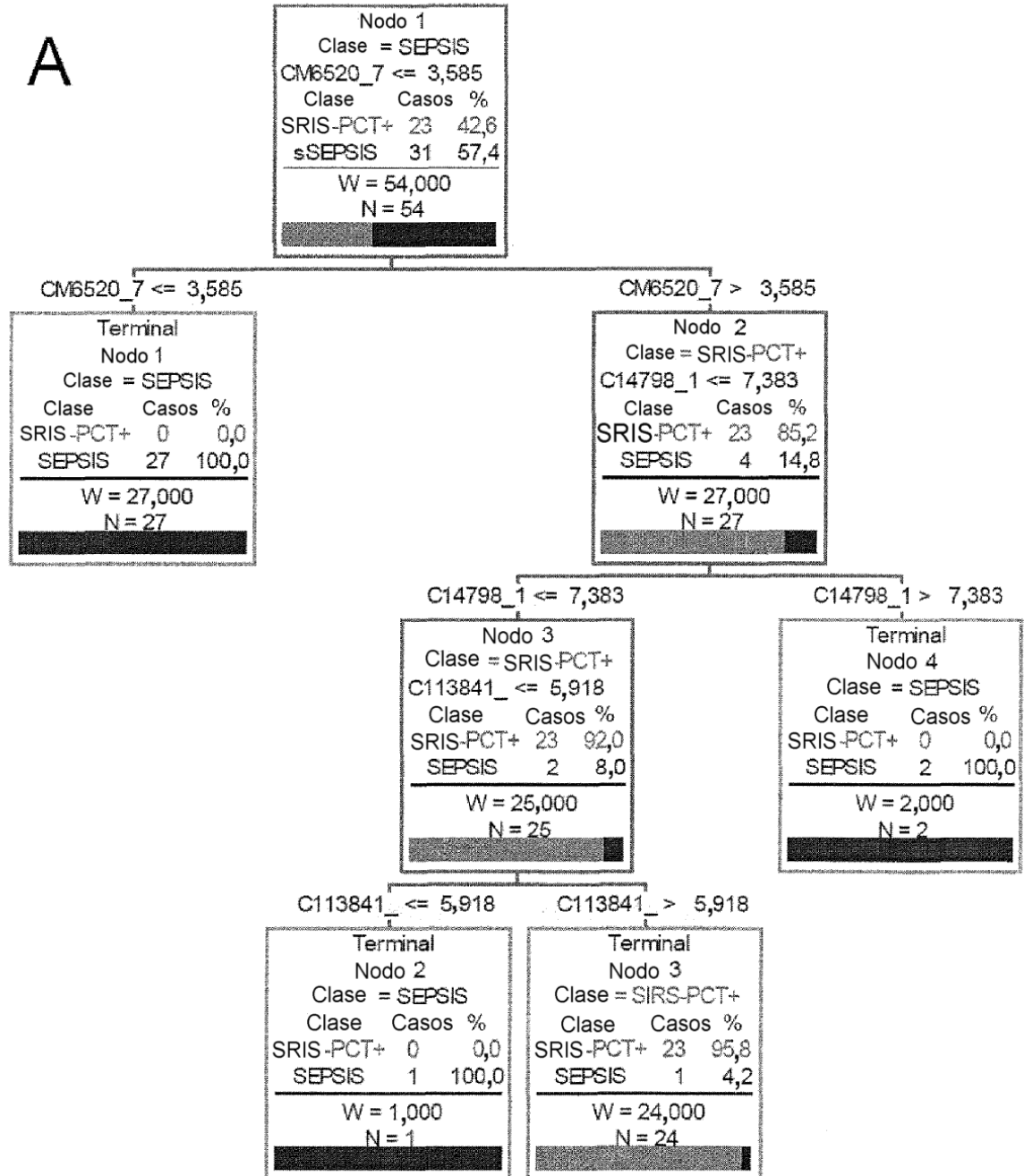


FIG 1 A (continuación):

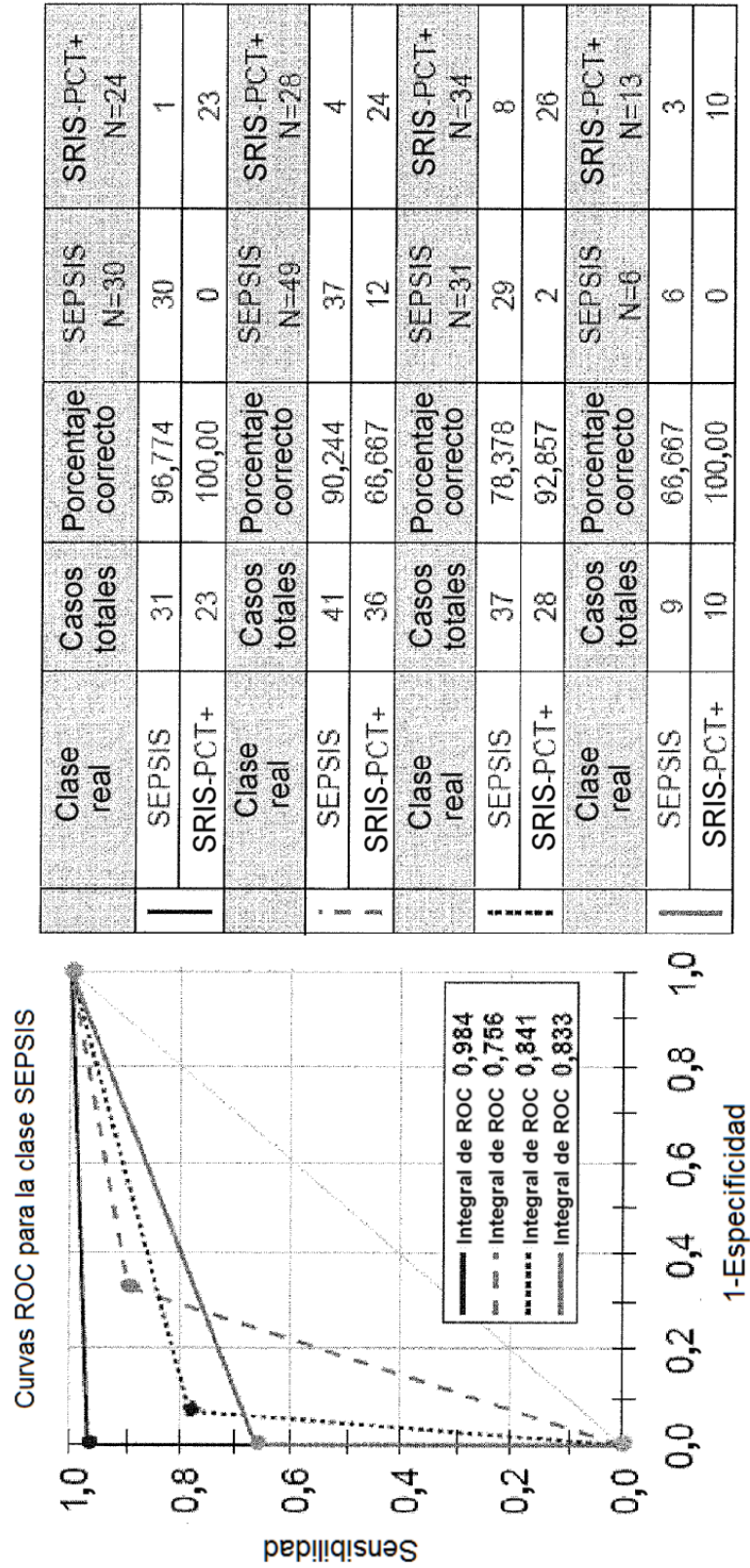


FIG 1B:

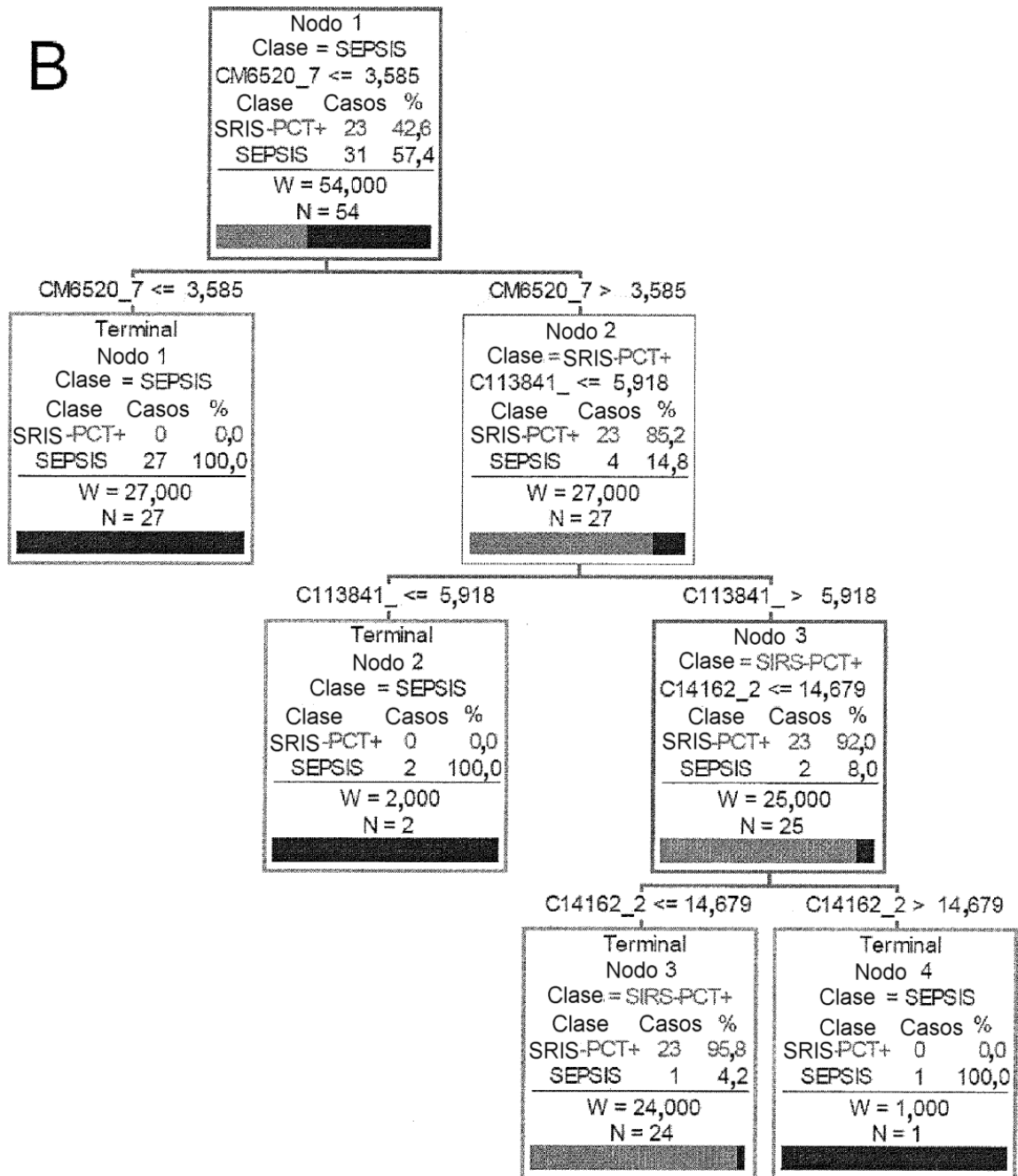
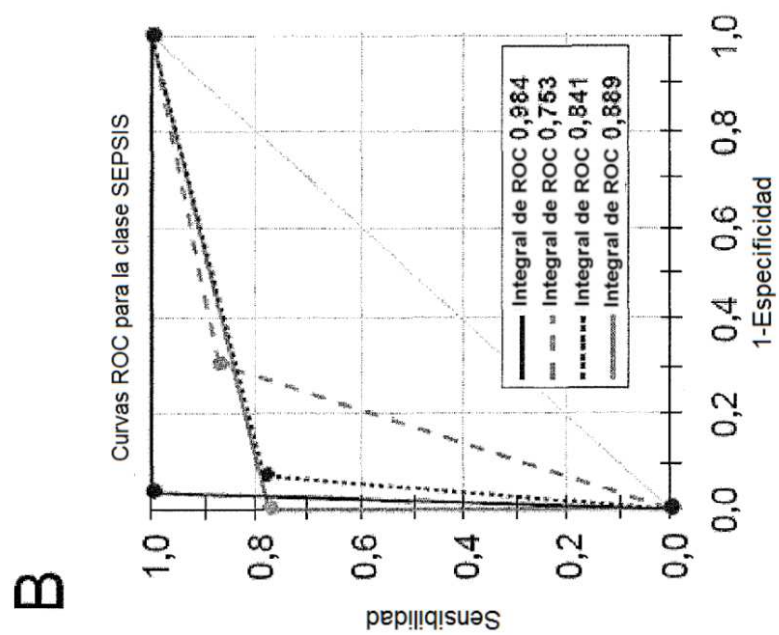


FIG. 1B (continuación):



	Clase real	Casos totales	Porcentaje correcto	SEPSIS N=30	SRIS-PCT+ N=24
I	SEPSIS	31	96,774	30	1
	SRIS-PCT+	23	100,00	0	23
II	Clase real	Casos totales	Porcentaje correcto	SEPSIS N=47	SRIS-PCT+ N=30
	SEPSIS	41	87,805	36	5
	SRIS-PCT+	36	69,444	11	25
III	Clase real	Casos totales	Porcentaje correcto	SEPSIS N=31	SRIS-PCT+ N=34
	SEPSIS	37	78,378	29	8
	SRIS-PCT+	28	92,857	2	26
IV	Clase real	Casos totales	Porcentaje correcto	SEPSIS N=7	SRIS-PCT+ N=12
	SEPSIS	9	77,778	7	2
	SRIS-PCT+	10	100,00	0	10

FIG 1C:

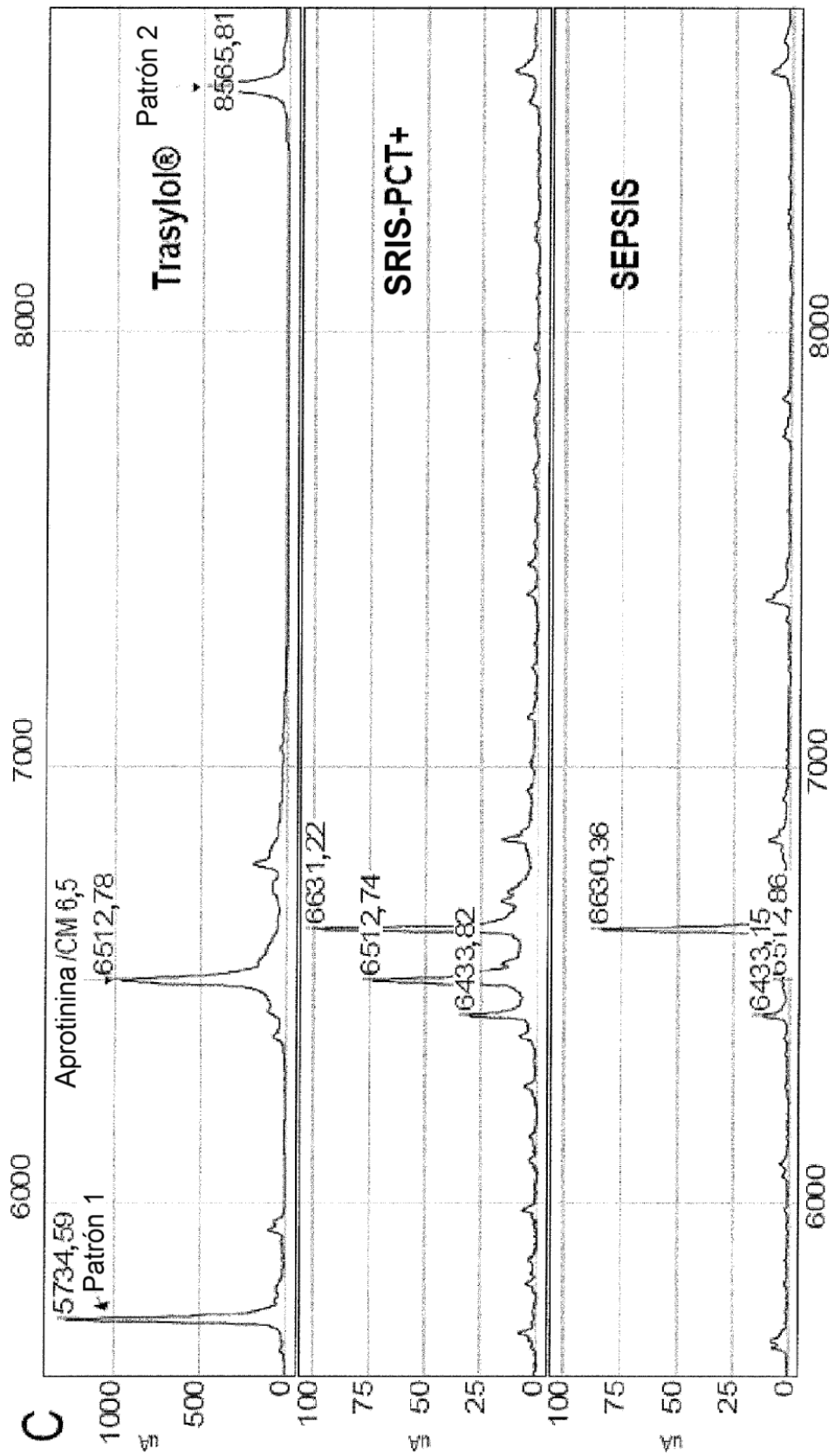


FIG 2A:

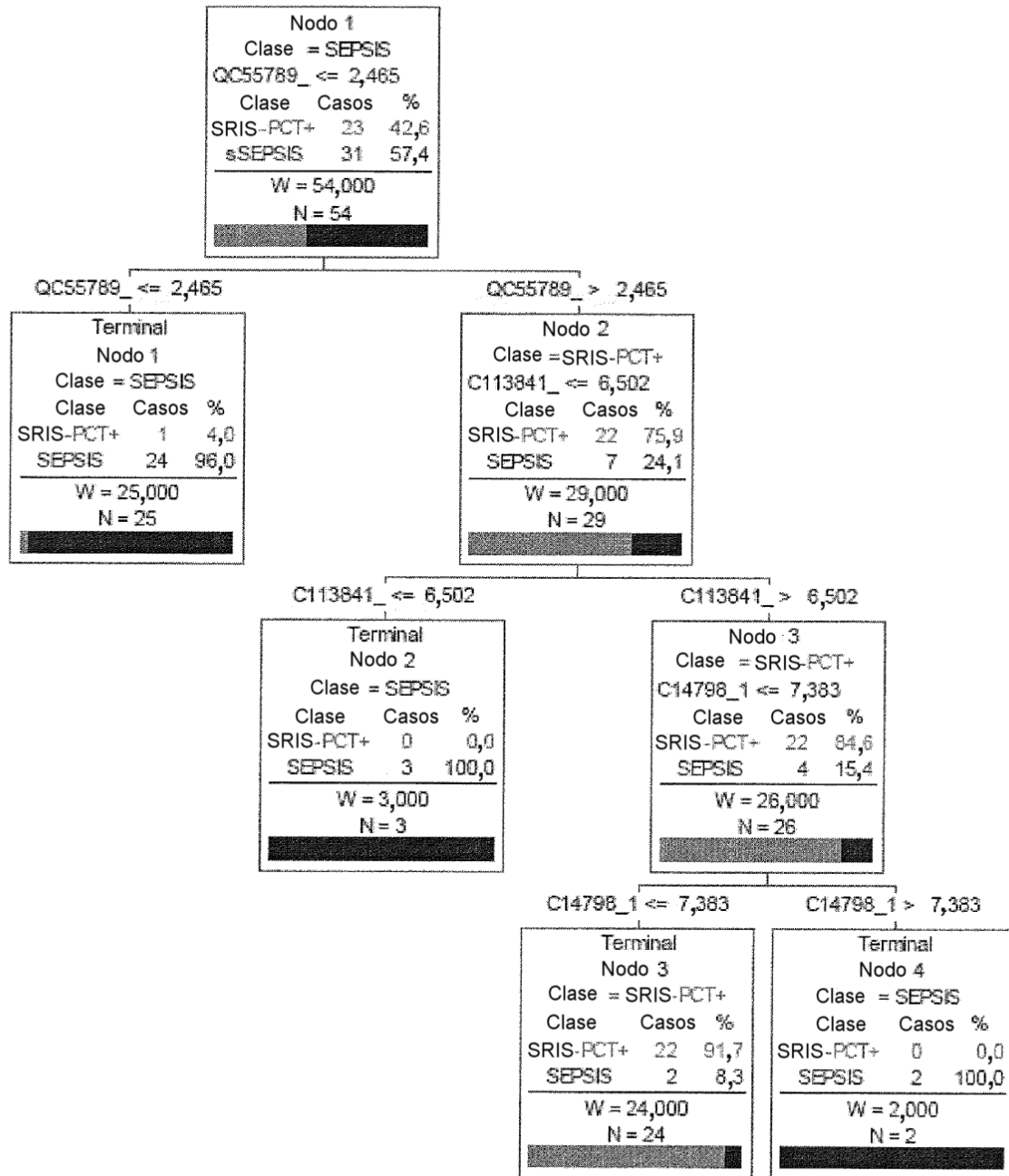


FIG 2B:

	Clase real	Casos totales	Porcentaje correcto	SEPSIS N=30	SSRIS-PCT + N=24
I	SEPSIS	31	93,548	29	2
	SRIS -PCT+	23	95,652	1	22
II	Clase real	Casos totales	Porcentaje correcto	SEPSIS N=40	SSRIS-PCT + N=37
	SEPSIS	41	85,366	35	6
III	SRIS -PCT+	36	86,111	5	31
	Clase real	Casos totales	Porcentaje correcto	SEPSIS N=34	SSRIS-PCT + N=31
IV	SEPSIS	37	86,486	32	5
	SRIS -PCT+	28	92,857	2	26
V	Clase real	Casos totales	Porcentaje correcto	SEPSIS N=10	SSRIS-PCT + N=9
	SEPSIS	9	88,889	8	1
VI	SRIS -PCT+	10	90,000	1	9

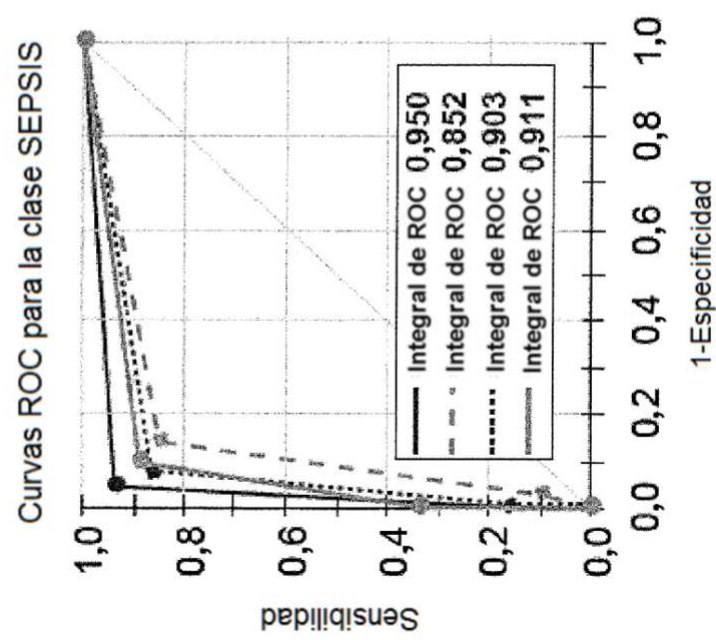


FIG 3:

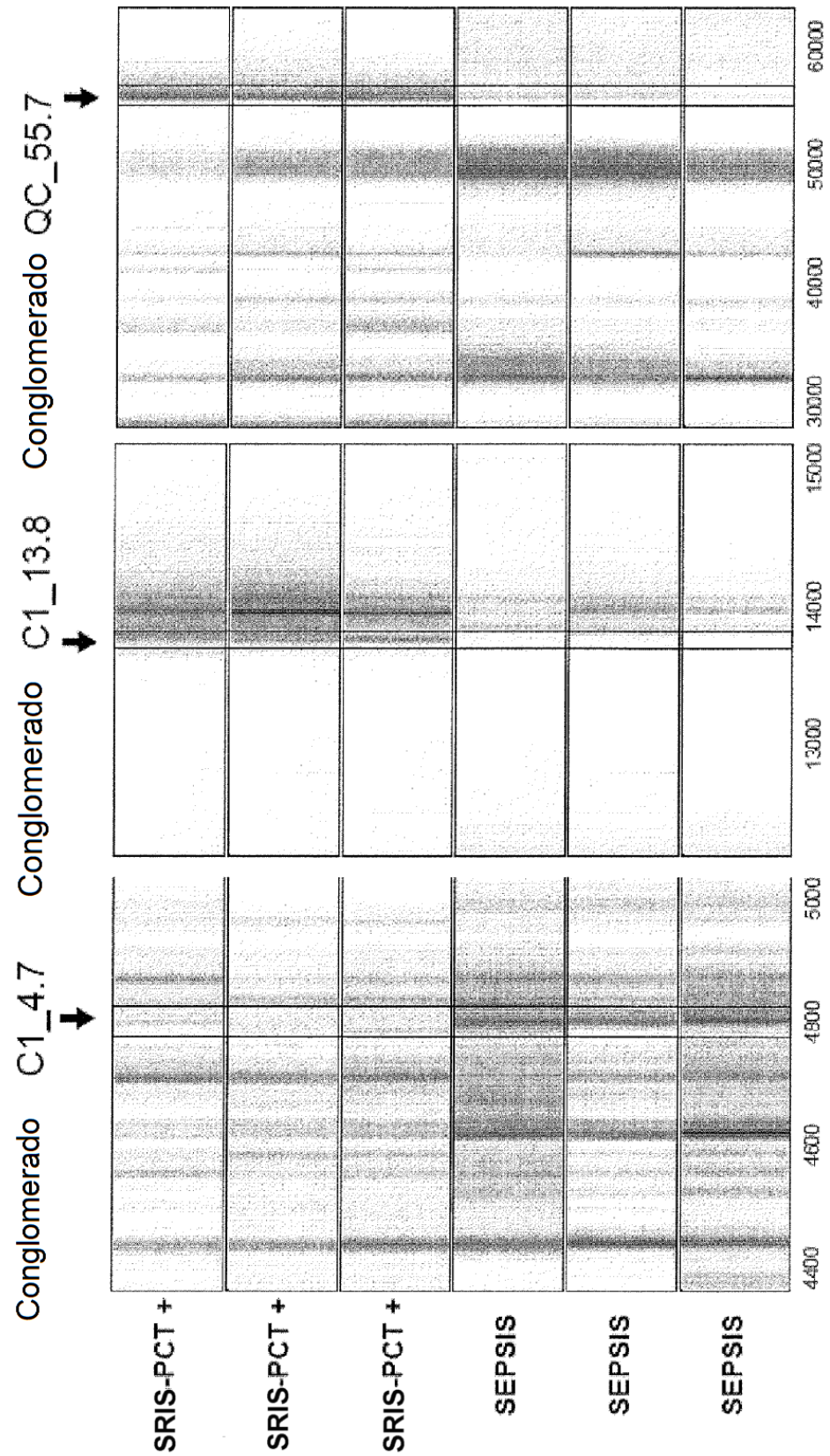


FIG 4A:

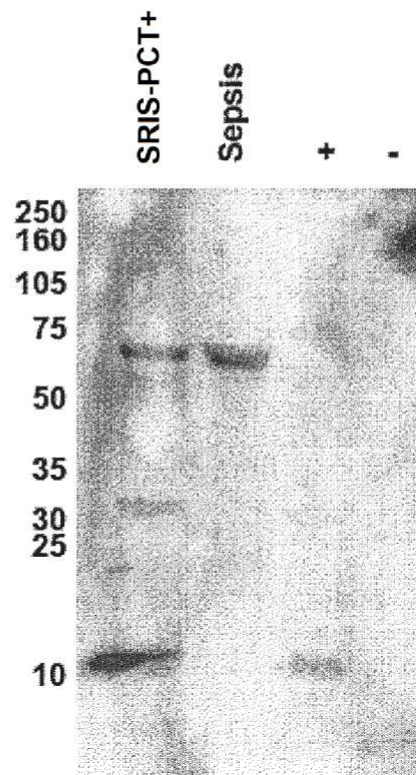


FIG 4B:

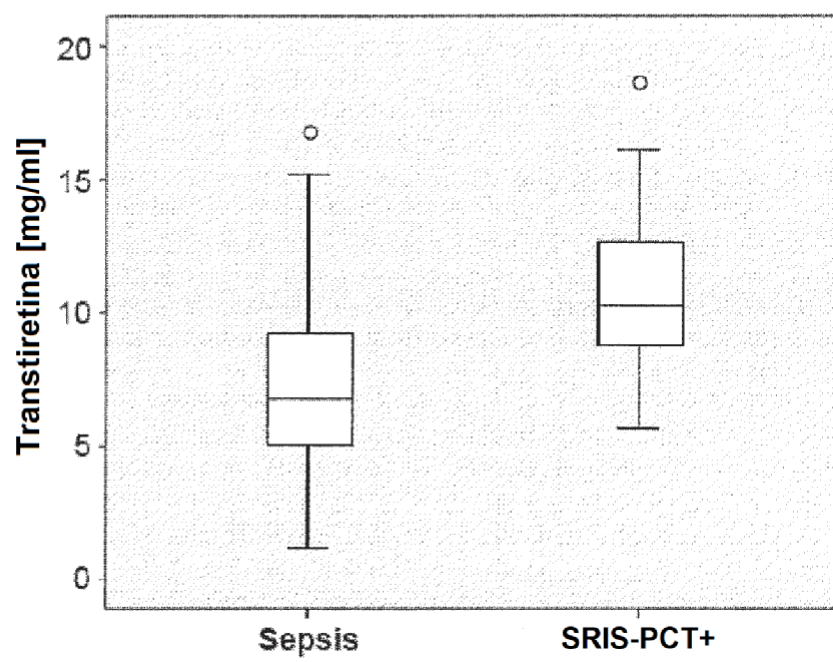


FIG 4C:

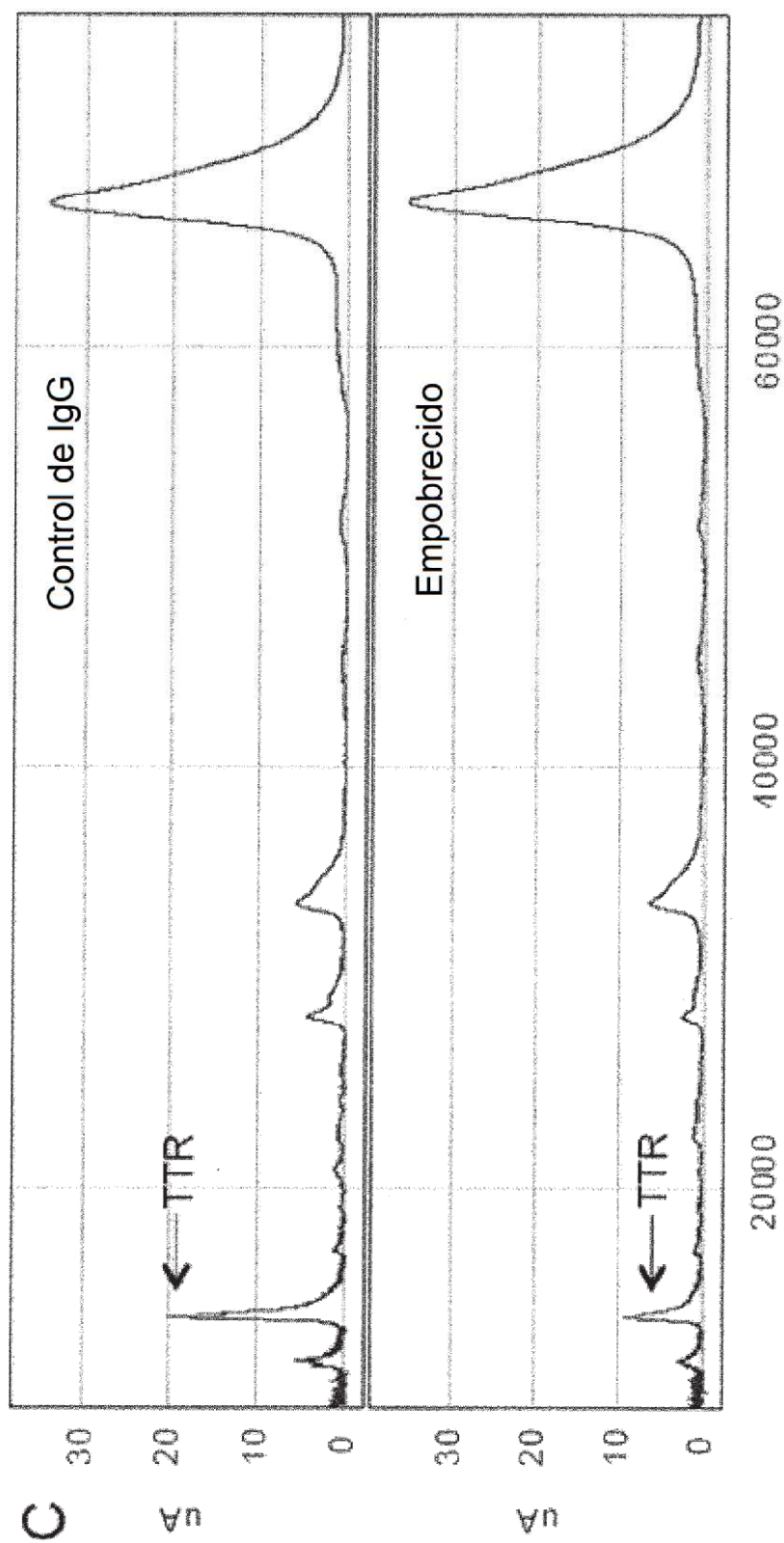


FIG 5 A, B, C:

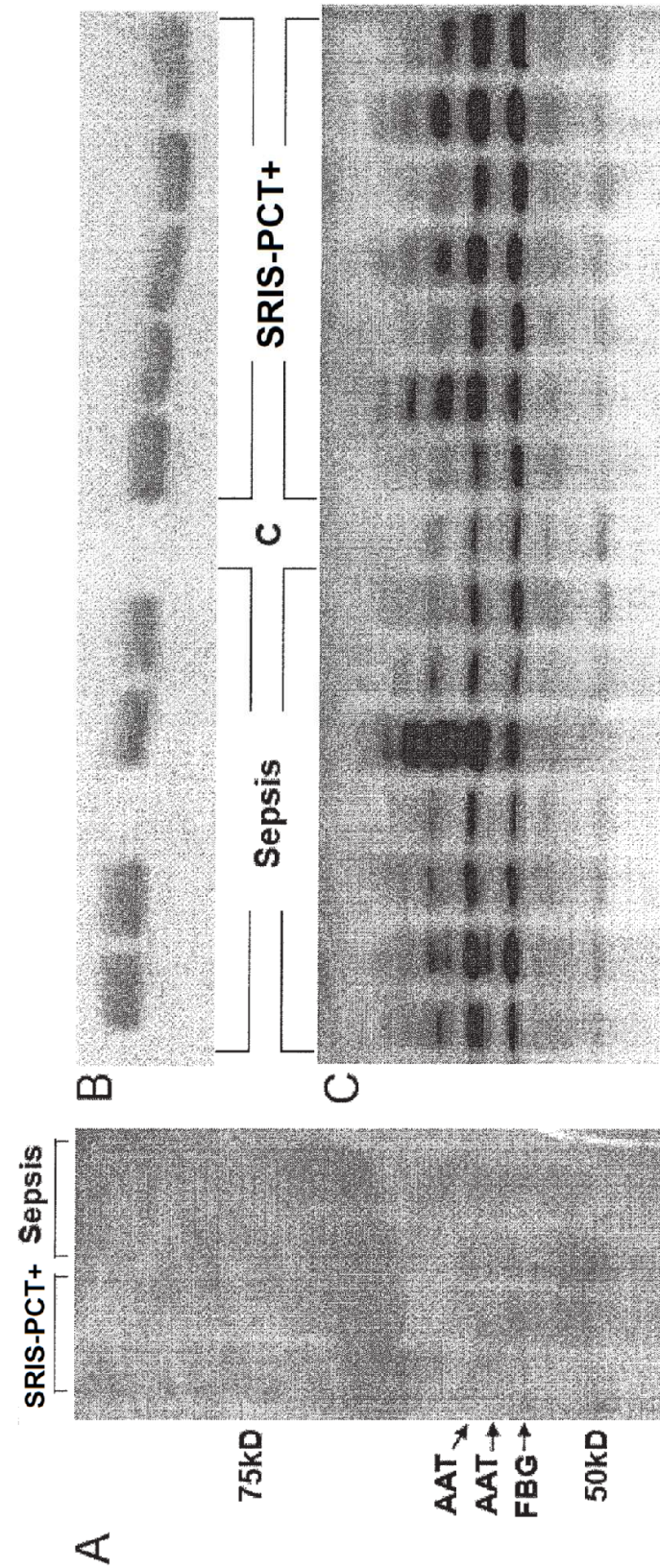


FIG 5 D, E:

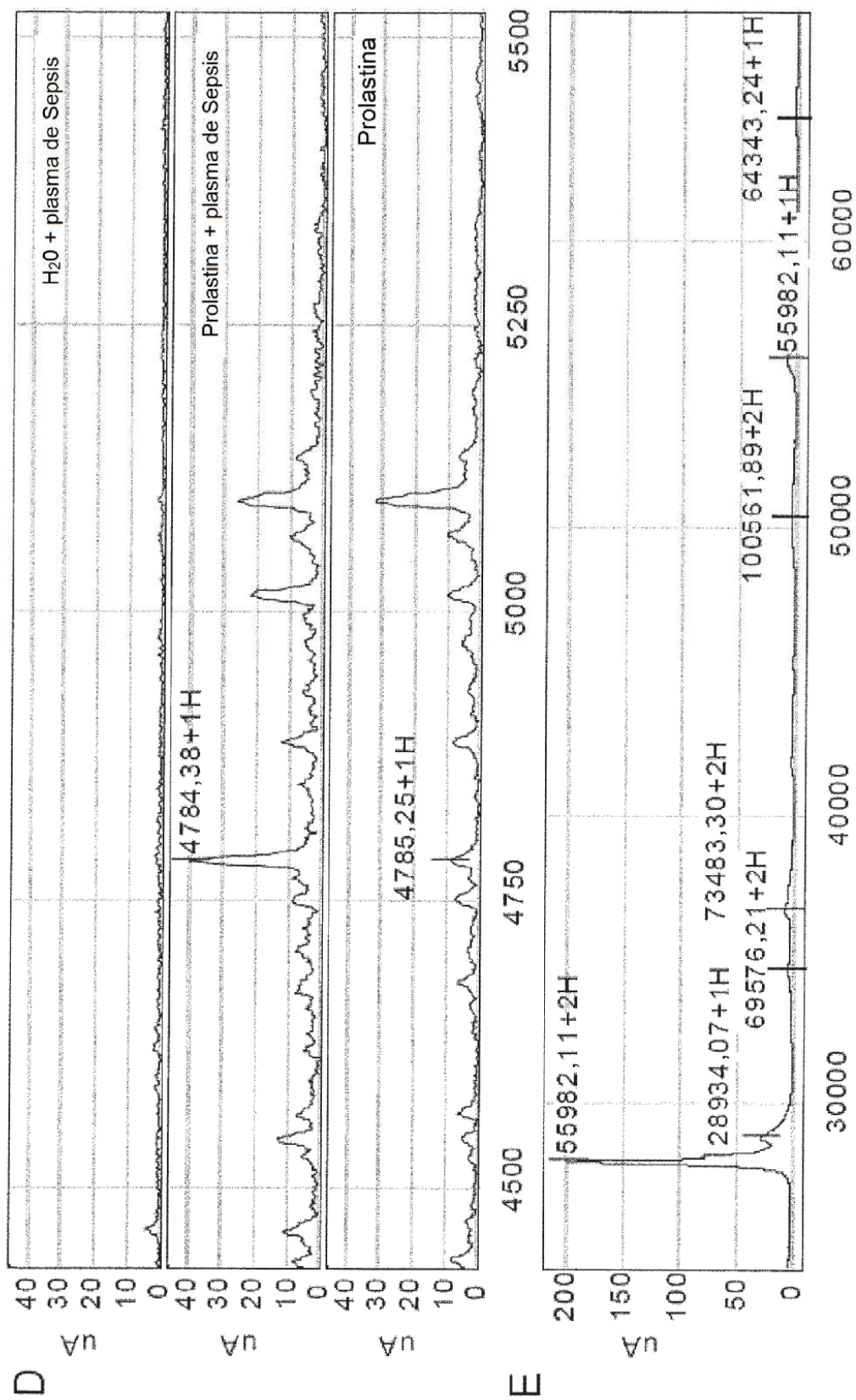


FIG 6:

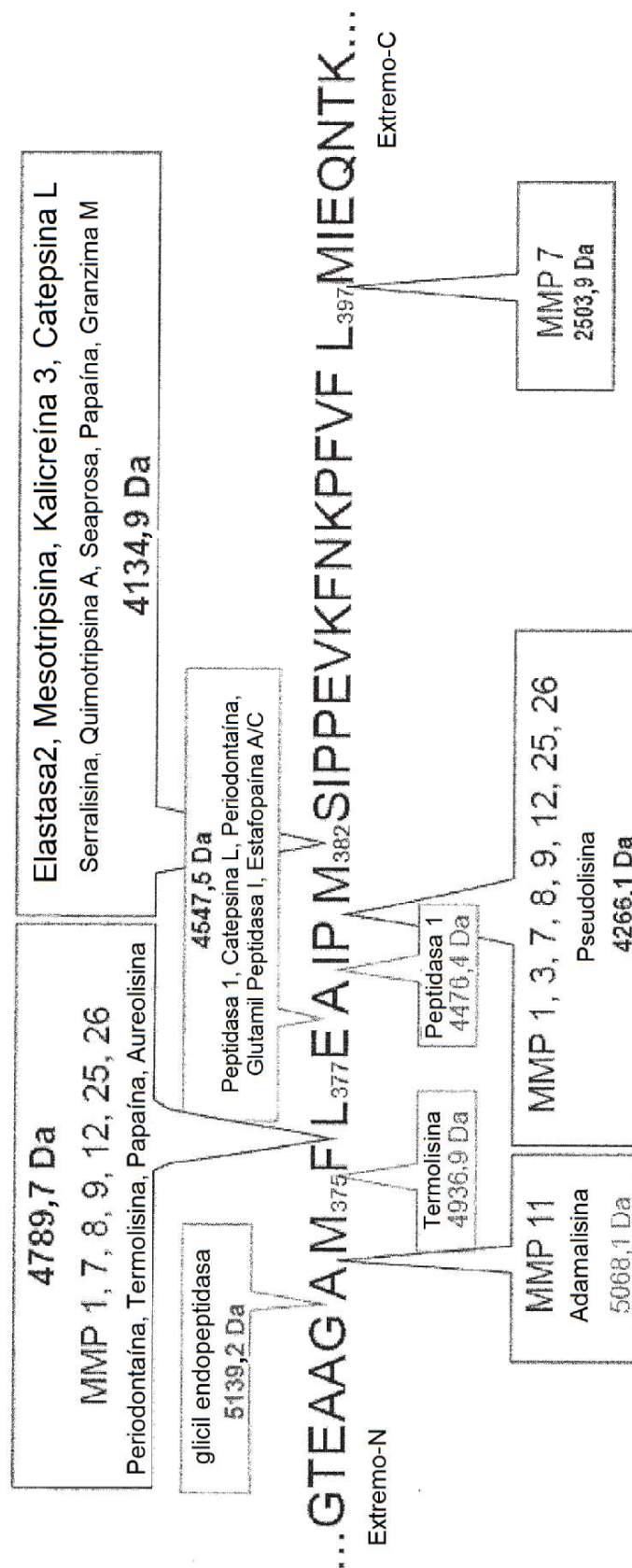


FIG 7:

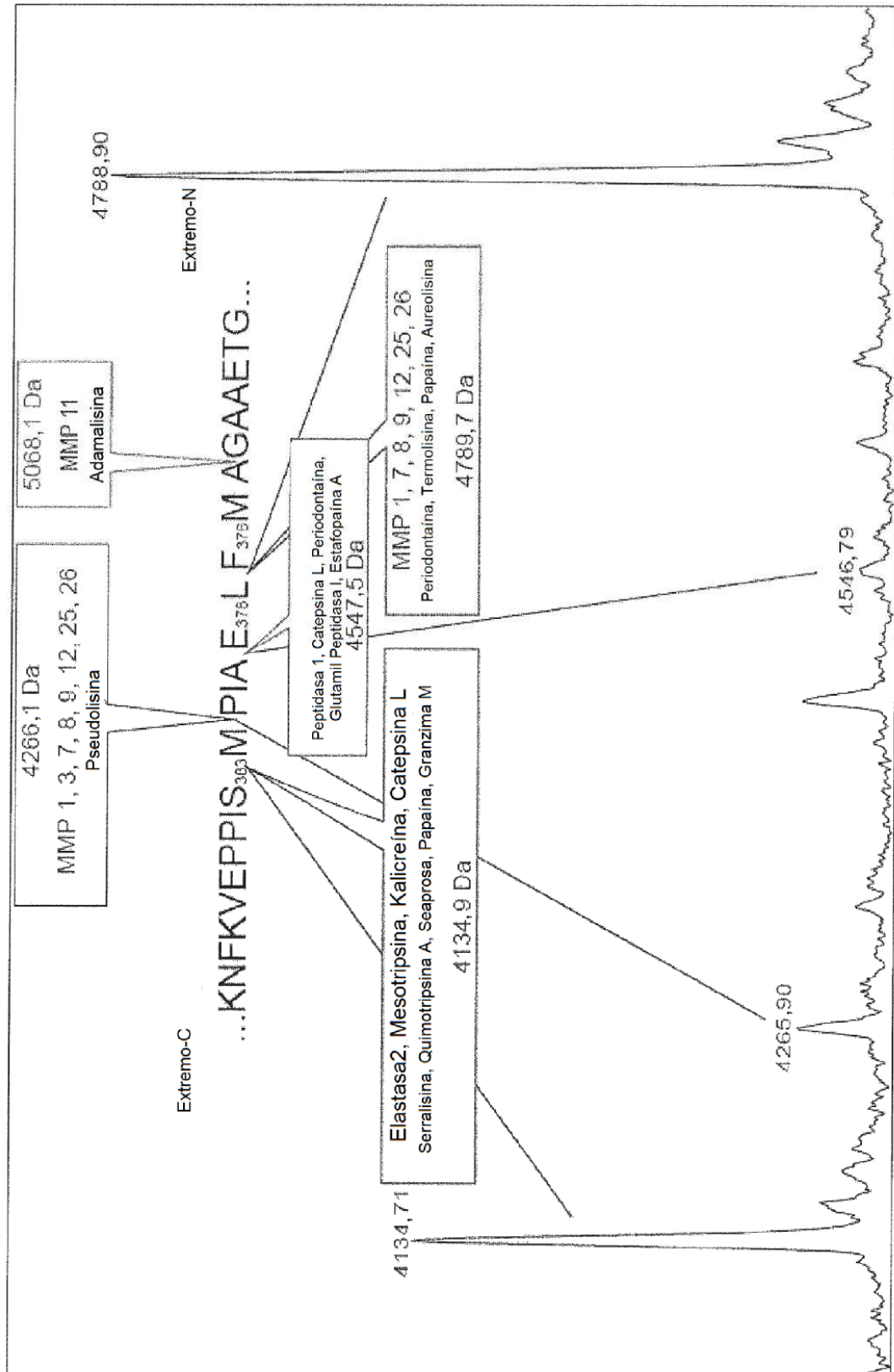


FIG 8:

