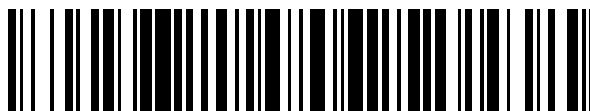


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 854**

51 Int. Cl.:

G01N 33/573 (2006.01)
G01N 30/90 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/565 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2014 PCT/FI2014/050051**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14125164**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2014 E 14752032 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2956772**

54 Título: **Un método para determinar biomarcadores relacionados con el síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), un método para monitorizar el desarrollo y tratamiento de ARDS en un paciente**

30 Prioridad:

14.02.2013 FI 20130049

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2018

73 Titular/es:

FARON PHARMACEUTICALS OY (100.0%)
Tykistökatu 6 B
20520 Turku, FI

72 Inventor/es:

MAKSIMOW, MIKAEL;
SALMI, MARKO;
JALKANEN, MARKKU y
JALKANEN, SIRPA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 683 854 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un método para determinar biomarcadores relacionados con el síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), un método para monitorizar el desarrollo y tratamiento de ARDS en un paciente

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a un método para monitorizar el desarrollo del síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS) en un paciente. El método para monitorizar el desarrollo de ARDS está basado en comparar el nivel o actividad de los biomarcadores obtenidos en una muestra extraída en un punto de tiempo posterior con los niveles o actividades de los mismos biomarcadores en una muestra extraída en un punto de tiempo anterior. Un cambio favorable del nivel o actividad de un biomarcador específico representa una regresión de la enfermedad (recuperación del paciente), y, al contrario, un cambio adverso en el nivel o actividad de un biomarcador específico representa un empeoramiento de la enfermedad. Si, por ejemplo, el nivel o actividad para uno o más de los biomarcadores monitorizados deja de mostrar un cambio favorable o empieza a mostrar un cambio desfavorable, el tratamiento del paciente se mejora administrando un agente terapéuticamente activo útil en el tratamiento de ARDS.

Antecedentes de la invención

- 15 Los ensayos multiplex, es decir, los métodos para la detección o cuantificación simultánea de múltiples analitos en una muestra son de por sí bien conocidos. Tales ensayos son ensayos que miden simultáneamente múltiples analitos en un único ensayo. Los ensayos multiplex se pueden clasificar en base a cuantos analitos se pueden medir por ensayo: la cantidad de analitos varía desde unos pocos (por lo menos dos) hasta un número muy alto. Los ensayos multiplex comerciales están diseñados típicamente para la detección simultánea de hasta alrededor de 50 analitos. Estos métodos se pueden usar para análisis de ácidos nucleicos y proteínas, tales como anticuerpos. También se pueden medir carbohidratos y otros compuestos químicos.

Los métodos multiplex se pueden llevar a cabo de muchos modos alternativos.

- 25 Como un ejemplo se puede mencionar una micromatriz que es una matriz 2D sobre un soporte sólido que analiza simultáneamente un gran número de analitos biológicos. En un microensayo de proteínas tal como un microensayo de anticuerpos se han fijado diferentes anticuerpos sobre un soporte sólido en localizaciones separadas en un patrón predeterminado. Estos anticuerpos se usan como moléculas de captura capaces de capturar analitos (proteínas) presentes en una muestra.

- 30 Como un ejemplo de un ensayo disponible comercialmente se puede mencionar Luminex® xMAP Technology, que es un ensayo basado en perlas realizado directamente en una placa de microtitulación. Cada ensayo contiene una mezcla de diferentes microesferas (mezcla de perlas), en la que cada tipo de perla se define por un tono de color fluorescente individual para clasificación de analitos y lleva un reactivo de captura específico tal como proteínas específicas (anticuerpos) en su superficie. Durante la incubación de la mezcla de perlas con la muestra del paciente el compañero de reacción complementario (antígenos) se une a los anticuerpos de captura sobre las microesferas. En una segunda etapa de incubación los antígenos unidos se detectan con anticuerpos marcados que llevan un marcador fluorescente específico. La cantidad de analito unido (antígeno) se correlaciona directamente con la intensidad de fluorescencia del anticuerpo de detección que permite la cuantificación de analitos. La clasificación de las perlas y la cuantificación de los antígenos se realizan con el sistema de análisis Luminex, que está basado en la tecnología de citometría de flujo usando dos láseres diferentes

- 40 El uso de múltiples biomarcadores secuenciales para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades también se ha sugerido.

- 45 Chirag R Parikh et al., Crit Care Med 2008 Vol. 36, No. 4 (Suppl); p S159-S165, sugiere el uso de múltiples biomarcadores secuenciales para evaluar la duración de AKI (lesión renal aguda) y para predecir el pronóstico en general con respecto al requisito de diálisis y la mortalidad. Los biomarcadores eran NGAL (lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo) y cistatina C en un panel de plasma y NGAL, IL-18 (Interleukina-18) y KIM-1 (molécula-1 de lesión renal) en un panel de orina.

- O Beran et al., Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2009) 28: 793-799 describe el análisis secuencial de biomarcadores tales como IL-6 (interleukina-6), IL-1ra (antagonista de receptor de interleukina-1), IL-1beta (interleukina 1beta), IL-8 (interleukina-8), MIP-1beta (proteína-1-beta inflamatoria de macrófagos) y MCP-1 (proteína-1 quimioatrayente de monocitos) y su correlación con IMD (enfermedad meningocócica invasiva) y su severidad.

- 50 El documento WO 2009/053523, Faron Pharmaceuticals Oy, describe que CD73 es un biomarcador útil para monitorizar el desarrollo de enfermedades inflamatorias, en particular, SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), ALI (lesión pulmonar aguda), ARDS y MOF (fallo multiorgánico) en un paciente. Se extrajeron muestras de fluido de tejido de los pacientes en diferentes puntos de tiempo y se determinó la actividad de CD73 en las muestras. Se encontró que un aumento del nivel de actividad de CD73 se correlaciona con la regresión de la enfermedad.

Hasta el momento, nadie ha sugerido el uso de múltiples biomarcadores secuenciales para monitorizar el desarrollo de ARDS en un paciente. Particularmente, nadie ha sugerido el uso de un conjunto de biomarcadores que consiste en, o incluye CD73 e IL-6 para este propósito.

Sumario de la invención

5 El objetivo de esta invención es proporcionar métodos y medios para seguir la gravedad de ARDS durante el período de tratamiento de esta afección. Usualmente, los pacientes con ARDS reciben el mejor cuidado intensivo posible, pero, lo que es más importante, el uso de biomarcadores para predecir cualquier tratamiento farmacológico se está volviendo un activo muy valioso para evaluar la eficacia del tratamiento. Uno de tales tratamientos es Traumakine®
 10 FP-1201 (interferón beta), que ha demostrado reducir la mortalidad de pacientes de ARDS. Al tener valiosos datos predictivos acerca del estado del paciente el médico de UCI puede optimizar el cuidado del paciente.

De este modo, la invención se refiere a un método para la determinación simultánea de múltiples biomarcadores relacionados con ARDS en una muestra extraída de un paciente, en el que uno de los biomarcadores es la proteína CD73. Según una realización de la invención, dicho método comprende las etapas de

15 i) cuantificar los niveles de los biomarcadores en dicha muestra por someter la muestra a aglutinantes que reconocen los biomarcadores, o

ii) determinar las actividades de los biomarcadores en dicha muestra usando cromatografía de capa fina o sometiendo dicha muestra a sustratos para los biomarcadores, y monitorizando el cambio de dichos sustratos.

20 Un kit de diagnóstico para uso en un método de ensayo de bioafinidad se puede usar para la determinación simultánea de múltiples biomarcadores relacionados con ARDS en una muestra extraída de un paciente, en el que el número de biomarcadores que incluyen CD73 y biomarcadores adicionales es de por lo menos 2, preferentemente 2-50, más preferentemente 2-8. Según la descripción, dicho kit comprende

- un conjunto de aglutinantes de captura inmovilizados en un soporte sólido o capaz de ser inmovilizado en un soporte sólido, en el que cada aglutinante de captura es específico para un determinado biomarcador a determinar, y

25 - un conjunto de componentes de bioafinidad marcados, en el que cada uno de tales componentes de bioafinidad marcado tiene una bioafinidad específica para un determinado biomarcador inmovilizado, o en el que cada uno de tales componentes de bioafinidad marcado tiene una capacidad para competir por el sitio de unión con un biomarcador inmovilizado específico.

30 Un método según la invención para monitorizar el desarrollo de ARDS en un paciente, en el que se han determinado 3-8 biomarcadores relacionados con ARDS en muestras extraídas de un paciente en diferentes puntos del tiempo, y en el que por lo menos dos de los biomarcadores son la proteína CD73 e IL-6 y otros biomarcadores se seleccionan de IL-8, IL-15, Eotaxina, MPC-1, MIP-1a e IL-1ra, estando basado dicho método en la comparación de los niveles o actividades de los biomarcadores obtenidos en una muestra extraída en un punto de tiempo posterior con los niveles o actividades de los mismos biomarcadores en una muestra extraída en un punto de tiempo anterior, en el que un cambio favorable en el nivel o actividad de un determinado biomarcador representa una regresión de la enfermedad,
 35 y en el que un cambio adverso en el nivel o actividad de un determinado biomarcador representa un empeoramiento de la enfermedad.

40 Un método para el tratamiento de un paciente que padece ARDS puede comprender la administración al paciente de un agente terapéuticamente activo efectivo en el tratamiento de ARDS, en el que la administración se inicia tan pronto como uno o más de los biomarcadores usados en la monitorización del desarrollo de ARDS según esta invención

- deja de mostrar un cambio favorable, o

- comienza a mostrar un cambio desfavorable.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra un soporte con puntos capaces de aglutinar aglutinantes de captura,

45 La Figura 1B muestra el soporte de la Fig. 1A sobre el que se inmovilizan aglutinantes de captura,

Figura 1C muestra el soporte de la Fig. 1B en la que los biomarcadores a determinar se han inmovilizado en los aglutinantes de captura,

La Figura 1D muestra el soporte de la Fig. 1C sobre el que se han inmovilizado los aglutinantes marcados en los biomarcadores a determinar,

50 La figura 2 muestra un anticuerpo marcado que comprende un conjunto de anticuerpo primario dirigido al biomarcador y un anticuerpo secundario, que lleva la etiqueta y se une a la región Fc del anticuerpo primario,

La Figura 3 muestra un conjunto de curvas para los niveles de biomarcadores medidos como función del tiempo. Todas las líneas de B1 a B4 indican que los cambios en el tiempo son favorables. La línea de puntos para B5 quiere decir que la disminución de su nivel representa un cambio adverso.

5 Las Figuras 4a a 4h muestran el nivel o la actividad de ocho biomarcadores como función del tiempo para un grupo de pacientes que se recuperan de ALI o ARDS (las figuras 4a-4g muestran el nivel; la figura 4h muestra la actividad).

10 La figura 5 muestra tanto la actividad como el nivel (concentración) de CD73 soluble como función del tiempo para un paciente que se recupera de LPA o ARDS como un ejemplo. La actividad de CD73 soluble (■, eje Y izquierdo) y la concentración de CD73 soluble (●, eje Y derecho) se midieron a partir de alícuotas de las mismas muestras. La figura 5 muestra que las medidas de actividad y concentración son comparables. Se puede ver que los valores de CD73 (figura 5) e IL-6 (Figura 4b) muestran un cambio drástico en las concentraciones en plasma, que indican cambios favorables.

Descripción detallada de la invención

La muestra puede ser cualquier fluido de los tejidos, que baña y rodea las células. El término incluye, por ejemplo, plasma sanguíneo, suero, sangre completa, linfa, orina, exudados (pleural, peritoneal) y fluido cerebroespinal.

15 Los biomarcadores relacionados con ARDS se refieren a un conjunto de biomarcadores presentes en una muestra derivada del paciente. El conjunto de biomarcadores comprende por lo menos dos, preferentemente de dos a ocho biomarcadores, en particular alrededor de cinco biomarcadores, de los cuales uno es la proteína CD73. Como ejemplos de otros biomarcadores se pueden mencionar citocinas, que son proteínas o péptidos usados en los organismos como compuestos de señalización. Las citocinas incluyen, por ejemplo, interferones, interleukinas, en particular IL-6, quimiocinas tales como eotaxinas. Como ejemplos de otros biomarcadores apropiados se pueden mencionar CRP (proteína C reactiva) y otras pentraxinas.

20 Preferentemente, los biomarcadores se seleccionan del grupo que incluye los siguientes: IL-1*, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, Basic FGF, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN-*, IP-10, MCP-1, MIP-1*, MIP-1*, PDGF-BB, RANTES, TNF-*, VEGF, IL-1*, IL-2R*, IL-3, IL-12 (p70), IL-16, IL-18, CTACK, GRO-*, HGF, IFN-2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, *-NGF, SCF, SCGF-*, SDF-1*, TNF-*, TRAIL, CD73, CRP, Neopterin, MxA, y beta-2-microglobulina.

30 Un conjunto particularmente preferido de biomarcadores incluye CD73 e IL-6, cualquiera de estos dos biomarcadores, o estos dos biomarcadores en combinación con uno o unos pocos biomarcadores adicionales. En particular, tal biomarcador adicional se selecciona del grupo que consiste de IL-8, IL-15, Eotaxina, MPC-1, MIP-1a e IL-1ra. Preferentemente, tal conjunto de biomarcadores comprende de tres a ocho de los biomarcadores CD73, IL-6, IL-8, IL-15, eotaxina, MPC-1, MIP-1a e IL-1ra, con tal de que por lo menos dos de ellos sean CD73 e IL-6. Un conjunto particularmente preferido comprende todos los ocho biomarcadores CD73, IL-6, IL-8, IL-15, eotaxina, MPC-1, MIP-1a e IL-1ra.

35 En una alternativa, se determinan las actividades de los biomarcadores. Esto se lleva a cabo, por ejemplo, ya sea mediante el uso de cromatografía de capa fina o sometiendo la muestra a sustratos para los biomarcadores, y monitorizando el cambio de dichos sustratos.

40 La actividad de los biomarcadores se puede medir, por ejemplo, usando cromatografía en capa fina según protocolos publicados. La actividad se puede medir también usando cualquier ensayo enzimático que mide la conversión de un sustrato apropiado. Por ejemplo, para CD73 se puede medir la actividad mediante la conversión de AMP u otro mononucleótido de purina que se puede usar como sustrato de CD73, en el nucleósido correspondiente. Por ejemplo, el ensayo puede estar basado en la conversión de sustratos marcados radiactivamente o fluorescentemente. Los métodos de detección se pueden basar en la cuantificación de la disminución de la concentración de sustrato, o un incremento de la concentración de producto o la liberación del grupo fosfato. La dependencia de CD73 de la reacción se puede determinar realizando el ensayo en presencia y ausencia de un conocido inhibidor de CD73, tal como AMPCP.

45 En general, las líneas celulares indicadoras para medidas de la actividad son tales líneas celulares genéticamente modificadas en las que un compuesto o molécula (es decir, el biomarcador) de interés específicamente induce una expresión del gen indicador. Tal expresión del gen indicador puede dar como resultado la producción de luz u otra función medible que es cuantificable. La cuantificación de la actividad del gen indicador se puede usar a continuación para calcular la actividad y/o el nivel del compuesto o molécula de interés.

50 Se describen anticuerpos monoclonales específicos para los biomarcadores mencionados anteriormente en la bibliografía y están disponibles de muchas fuentes comerciales, tales como Bio-Rad Laboratories, Inc., Jena Bioscience GmbH y Sino Biological, Inc.

55 Para cumplir los requisitos para "biomarcador relacionado con ARDS", se tiene que haber encontrado que dicho biomarcador se correlaciona con el estado de la enfermedad de ARDS de modo que una alteración del nivel del biomarcador con el tiempo indica el cambio del estado de la enfermedad. Aquellos biomarcadores con las

- 5 asociaciones más fuertes se combinarán con el panel biomarcador de ARDS. Por ejemplo, un nivel creciente de CD73 de un punto de tiempo a un punto de tiempo posterior indica la eficiencia de un tratamiento con un agente terapéuticamente activo y, en consecuencia, la regresión del ARDS. Para la CRP, sin embargo, un nivel creciente indica el empeoramiento de la enfermedad. Por lo tanto, es importante estudiar primero cada biomarcador apropiado para averiguar si un incremento o una disminución de su nivel es un cambio favorable o un cambio adverso con respecto al estado de la enfermedad.
- El "ensayo de bioafinidad" puede ser un inmunoensayo si los biomarcadores son proteínas. Alternativamente, se refiere a un ensayo de hibridación si los biomarcadores son ácidos nucleicos.
- 10 El "aglutinante" (aglutinante de captura o aglutinante marcado) se refiere a anticuerpos o similares (por ejemplo, aflicuerpos y aptámeros) cuando los biomarcadores a determinar son proteínas o péptidos. Si los biomarcadores son ácidos nucleicos los aglutinantes son preferentemente oligonucleótidos.
- La expresión "soporte sólido" es, por ejemplo, una microesfera o perla, que lleva un marcador. Alternativamente, el soporte sólido se refiere a una placa de microtitulación o un chip. Preferentemente, el soporte sólido es un chip, tal como una micromatriz, apropiado para uso en una tecnología de biochip. Aquí, la micromatriz es un componente en un conjunto de tecnología de biochip que comprende además medios para la transducción, procesado de señales y la visualización de los resultados.
- 15 El término "anticuerpo" se entiende que incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, cualquiera de sus fragmentos y anticuerpos manipulados genéticamente.
- El "marcador" puede ser, por ejemplo, una enzima o un marcador fluorescente. Un grupo particularmente preferido de marcadores fluorescentes es marcadores fluorescentes con resolución temporal, tales como quelatos de lantánido. Si el marcador es una enzima, se añade un sustrato para dicha enzima, en el que la reacción subsecuente entre la enzima y su sustrato produce una señal detectable. Si el marcador es un marcador fluorescente, la excitación se lleva a cabo por la radiación, por ejemplo por láser, en la que se crea una señal detectable.
- 20 Preferentemente, todos los biomarcadores a determinar son proteínas o péptidos, cada uno de los cuales se puede inmovilizar en un determinado anticuerpo de captura. En este caso, los aglutinantes marcados son también anticuerpos. Cada anticuerpo marcado se dirige a un epítipo de cierto biomarcador, en el que dicho epítipo es diferente del epítipo que se une al anticuerpo de captura.
- Los múltiples biomarcadores relacionados con ARDS se determinan simultáneamente en la muestra usando un ensayo de bioafinidad analizado por ejemplo como sigue: los aglutinantes de captura se inmovilizan sobre posiciones predeterminadas sobre la superficie de un soporte sólido, típicamente sobre puntos o pocillos biotinilados de una placa de microtitulación o similares. Los aglutinantes de captura de este modo estarán dispuestos en forma de una matriz sobre el soporte sólido (placa de microtitulación). Cada aglutinante de captura es específico de un determinado biomarcador a determinar. Añadir la muestra a la matriz e incubar los biomarcadores en la misma con los aglutinantes de captura inmovilizados provoca la inmovilización de cada biomarcador en el aglutinante de captura correspondiente.
- 30 La detección de los biomarcadores se puede llevar a cabo de dos formas: por un denominado "ensayo de sándwich" no competitivo o mediante un ensayo competitivo. En el ensayo no competitivo los componentes de bioafinidad marcados, por ejemplo, anticuerpos marcados, se añaden a la placa que lleva los biomarcadores inmovilizados. Después de la incubación y opcionalmente la retirada de los componentes de bioafinidad marcados no unidos, el marcador es excitado para dar una señal detectable. En este tipo de ensayos, la fuerza de la señal es directamente proporcional a la concentración del biomarcador inmovilizado. La posición del "sándwich" en la placa de microtitulación informa que biomarcador se ha detectado.
- 35 En la tecnología de Luminex®, los anticuerpos de captura se inmovilizan en las perlas, marcadas con colores fluorescentes de manera que un determinado color se refiere a un determinado tipo de anticuerpos de captura. Tras la incubación con la muestra que contiene los biomarcadores a detectar y la subsecuente adición de un conjunto de segundos anticuerpos (anticuerpos marcados, marcados con un color fluorescente diferente del color de la perla) se forma un sándwich que comprende "perla - anticuerpo de captura - biomarcador - anticuerpo marcado". Cada uno de tales sándwiches se transporta a un citómetro de flujo y cada sándwich se clasifica y se cuantifica usando un equipo de dos láseres.
- 45 En un ensayo competitivo, la placa que lleva los biomarcadores inmovilizados derivados de la muestra se somete a un conjunto de antígenos marcados, en el que cada antígeno marcado es capaz de competir por el sitio de unión en el aglutinante de captura con el correspondiente biomarcador inmovilizado derivado de la muestra. Cuando el marcador se excita, la señal detectada será indirectamente proporcional a la concentración del biomarcador derivado de la muestra.
- 50 La invención se ilustra más en detalle por referencia a los dibujos en los que La Fig. 1A muestra un soporte (placa de microtitulación) con puntos S1 a S5. Se han unido anticuerpos de captura C1 a C5 a los puntos predeterminados (Fig. 1B), que pueden estar biotinilados para permitir la unión de anticuerpos de captura sobre los mismos. Cada
- 55

anticuerpo de captura es específico para un determinado biomarcador B1 a B5 a determinar. Tras la adición de la muestra a la placa mostrada en la Fig. 1B, cada anticuerpo de captura inmovilizará el biomarcador hacia el anticuerpo de captura cuya producción se ha inducido. Los biomarcadores no unidos se pueden lavar antes de la adición de anticuerpos marcados L1 a L5, de los cuales un anticuerpo marcado es específico para un determinado biomarcador inmovilizado. Tras la excitación del marcador L (irradiación o adición de un sustrato de enzima, dependiendo del marcador L), se crea una señal detectable.

Aunque el anticuerpo marcado puede ser un único anticuerpo que lleva la especificidad necesaria y el marcador, el anticuerpo marcado puede ser alternativamente un conjunto de anticuerpo primario (PA) dirigido al biomarcador y un anticuerpo secundario (SA), que lleva la etiqueta L y se une a la región Fc del anticuerpo primario. Véase la Fig. 2. Este conjunto evita el costoso procedimiento de creación de anticuerpos marcados para cada biomarcador que se quisiera detectar.

Cuando se repite el método con muestras extraídas en puntos separados de tiempo, la señal obtenida de cada anticuerpo marcado se registra y se representa gráficamente frente al tiempo (Fig. 3). Para algunos biomarcadores (B1 y B2), un nivel incrementado representa un cambio favorable de la enfermedad del paciente, mientras que un nivel disminuido de B3 y B4 también representa un cambio favorable. Por el contrario, el nivel disminuido de B5 representa un cambio adverso de la enfermedad del paciente y por lo tanto la curva preferentemente se podría representar en diferentes signos o color con el fin de distinguirla rápidamente de las curvas, que representan un cambio favorable.

Los datos de las determinaciones se recogen en una base de datos, opcionalmente junto con las observaciones clínicas, las medidas terapéuticas etc.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no restrictivos.

Ejemplo 1

En un estudio clínico a 26 pacientes con ALI o ARDS se les dieron dosis de 10 microgramos de interferón beta-1a durante seis días consecutivos. Este tratamiento reduce la mortalidad en un 75% si se compara con la frecuencia normal observada sin tratamiento. Se analizaron muestras de suero derivadas de los pacientes con respecto a los siguientes biomarcadores: IL-1ra (ra = antagonista del receptor), IL-6, IL-8, IL-15, Eotaxina, MCP-1 (proteína 1 quimiotáctica de monocito), MIP-1a (proteína inflamatoria de macrófagos) y CD73. En la figura 4, de a) a h) el nivel de cada biomarcador (actividad para CD73) se muestra como valor medio para todos los pacientes junto con los errores estándar de las medias (SEM), se representan frente al tiempo. El Día 1 se refiere al valor antes de la administración de interferón beta. El Día 2 se refiere al valor 22 horas después de la primera administración de interferón beta; el Día 3 se refiere al valor 22 horas después de la segunda dosis (Día 2) y así sucesivamente. El Día 7 representa los niveles de 22 horas después de la última administración de interferón beta. La Figura 4 muestra que el nivel de los biomarcadores IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-15 y MCP-1 disminuyó rápidamente con el tiempo, es decir, con la recuperación de los pacientes. Por otra parte, la actividad de CD73 soluble (nmol/ml/h) se incrementó hasta el Día 9 es decir, dos días después de la última dosis, seguido de una disminución hacia los valores de la línea de base. El nivel de los biomarcadores Eotaxina y MIP-1a también se incrementó con el tiempo, es decir, con la recuperación de los pacientes.

Ejemplo 2

Se midió la actividad de CD73 soluble de muestras de uno de los pacientes tratados en el estudio mencionado anteriormente en los puntos de tiempo indicados (véase la figura 5) usando la técnica basada en cromatografía en capa fina publicada anteriormente. Este paciente mostró inducción muy fuerte de la actividad de CD73 soluble. La concentración de CD73 soluble se midió mediante un ensayo ELISA basado en el uso de un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección en un ensayo de sándwich. La actividad y la concentración de la CD73 soluble se midieron a partir de alícuotas de las mismas muestras. La Figura 5 muestra que la actividad de CD73 soluble y la concentración se comportan similarmente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para monitorizar el desarrollo de ARDS en un paciente, en el que se han determinado 3-8 de los biomarcadores relacionados con ARDS en muestras de suero extraídas de un paciente en diferentes puntos de tiempo, y en el que por lo menos dos de los biomarcadores son proteína CD73 e IL-6 y se seleccionan otros biomarcadores del grupo que consiste en IL-8, IL-15, Eotaxina, MPC-1, MIP-1a e IL-1ra, estando basado dicho método en comparar los niveles o actividades de los biomarcadores obtenidos en una muestra de suero extraída en un punto de tiempo posterior con los niveles o actividades de los mismos biomarcadores en una muestra de suero extraída en un punto de tiempo anterior, en el que un cambio favorable en el nivel o actividad de un determinado biomarcador representa una regresión de la enfermedad, y en el que un cambio adverso en el nivel o actividad de un determinado biomarcador representa un empeoramiento de la enfermedad.
2. El método según la reivindicación 1, en el que los biomarcadores se determinan por un método que comprende
- i) cuantificar los niveles de los biomarcadores en dicha muestra sometiendo la muestra a aglutinantes que reconocen los biomarcadores, o
- ii) determinar las actividades de los biomarcadores en dicha muestra usando cromatografía en capa fina o someter dicha muestra a sustratos para los biomarcadores, y monitorizar el cambio de dichos sustratos.
3. El método según la reivindicación 2, en el que los biomarcadores se determinan por un método que es un ensayo de bioafinidad que comprende las etapas de
- a) poner en contacto un conjunto de aglutinantes de captura con una muestra que comprende varios biomarcadores a determinar, en el que cada aglutinante de captura es específico para un determinado biomarcador a determinar,
- b) incubar los biomarcadores en la muestra con los aglutinantes de captura, de modo que cada biomarcador se aglutina con el correspondiente aglutinante de captura,
- c) añadir a la matriz de la etapa b) un conjunto de componentes de bioafinidad marcados, en el que cada uno de tales componentes de bioafinidad marcados tiene una bioafinidad específica para un determinado biomarcador que está unido al aglutinante de captura, o en el que tal componente de bioafinidad marcado tiene una capacidad de competir por el sitio de unión en el aglutinante de captura con un determinado biomarcador a determinar,
- d) excitar el nivel para formar una señal detectable,
- e) comparar la señal con un control para indicar la presencia de un determinado biomarcador y/o para indicar el nivel de determinado biomarcador en la muestra.
4. El método según la reivindicación 3, en el que
- a) cada aglutinante de captura se inmoviliza en una posición predeterminada sobre la superficie de un soporte de modo que los aglutinantes de captura se disponen en la forma de una matriz sobre el soporte,
- b) la muestra se añade a la matriz y los biomarcadores en ella se incuban con los aglutinantes inmovilizados,
- c) un conjunto de componentes de bioafinidad marcados se añade a la matriz de la etapa b), en el que cada uno de tales componentes de bioafinidad marcado tiene una bioafinidad específica para un determinado biomarcador inmovilizado, o en el que cada uno de tales componentes de bioafinidad marcado tiene una capacidad de competir por el sitio de unión sobre el aglutinante de captura con un determinado biomarcador inmovilizado,
- d) el marcador se excita para formar una señal detectable,
- e) la señal se compara con un control para indicar la presencia de cierto biomarcador y/o para indicar el nivel de cierto biomarcador en la muestra.
5. El método según la reivindicación 3 o 4, en el que el método es un método inmunométrico, en el que los aglutinantes de captura son anticuerpos, aptámeros o aficuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales.
6. El método según la reivindicación 5, en el que el método es un inmunoensayo de sándwich, en el que los componentes de bioafinidad marcados son anticuerpos, aptámeros o aficuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, cada uno dirigido a otro epítipo sobre el biomarcador distinto del ocupado por el aglutinante de captura.
7. El método según la reivindicación 5, el método es un método competitivo, en el que los componentes de bioafinidad marcados son un conjunto de antígenos marcados, en el que cada antígeno marcado es capaz de

competir por el sitio de unión sobre el aglutinante de captura con el correspondiente biomarcador inmovilizado derivado de la muestra.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 3-7, en el que el marcador es una enzima o un marcador fluorescente.

5 9. El método según la reivindicación 8, en el que el marcador es una enzima y se añade un sustrato para dicha enzima, en el que la reacción subsecuente entre la enzima y su sustrato produce una señal detectable.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 2-9, en el que dicho método se repite en otra muestra extraída del paciente después de cierto tiempo, y que las señales atribuidas a cada biomarcador se comparan con las correspondientes señales del ensayo anterior y que las diferencias se registran.

10

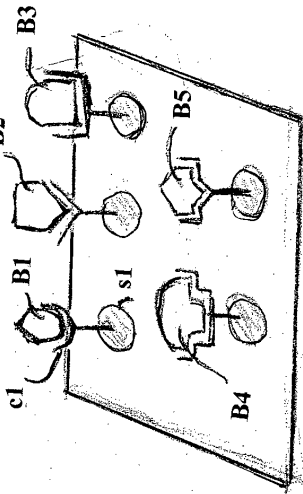


FIG. 1A

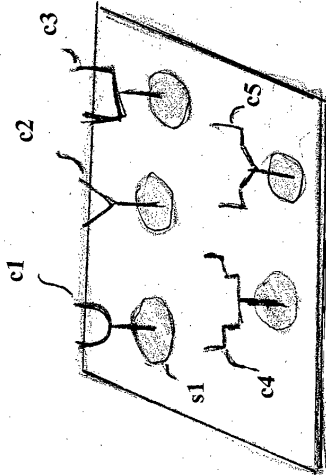


FIG. 1B

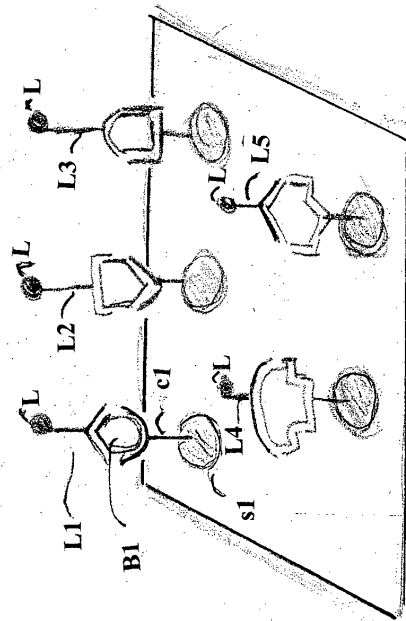


FIG. 1C

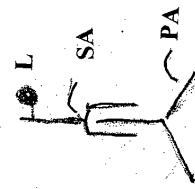


FIG. 2

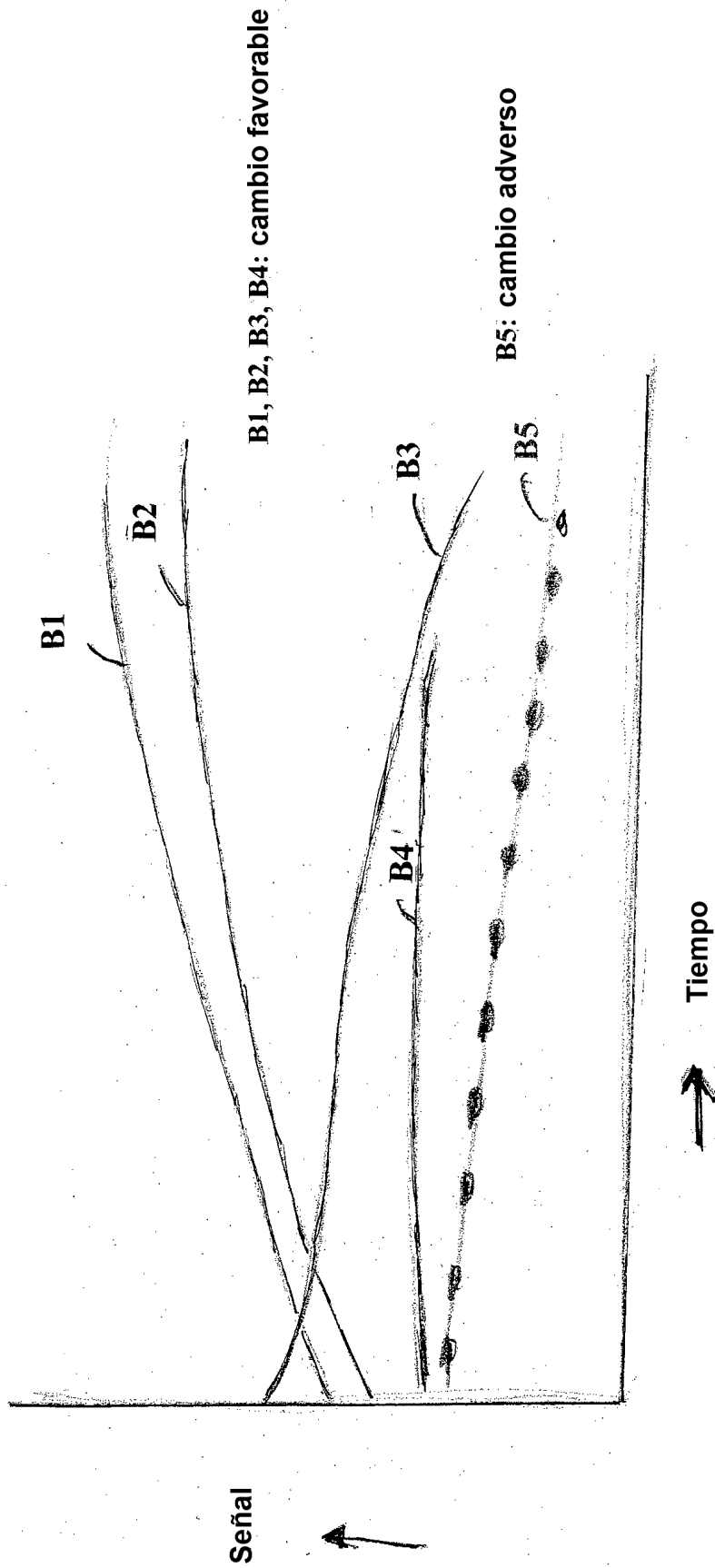


FIG. 3

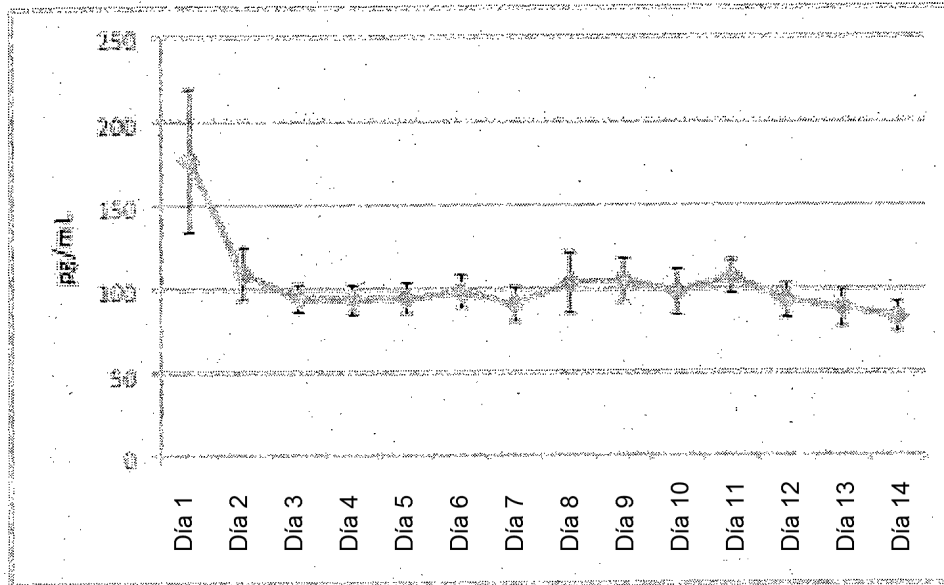


FIG. 4a (IL-1ra)

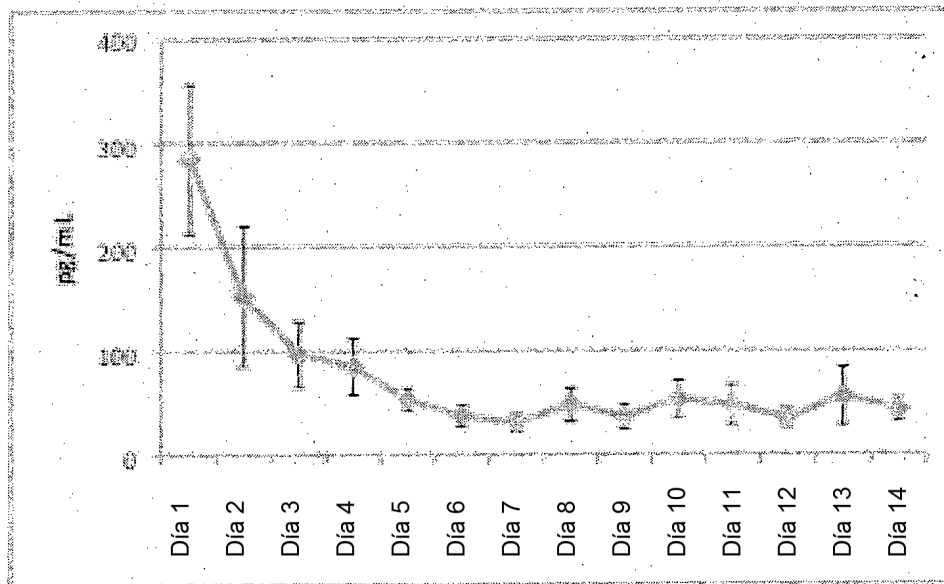


FIG. 4b (IL-6)

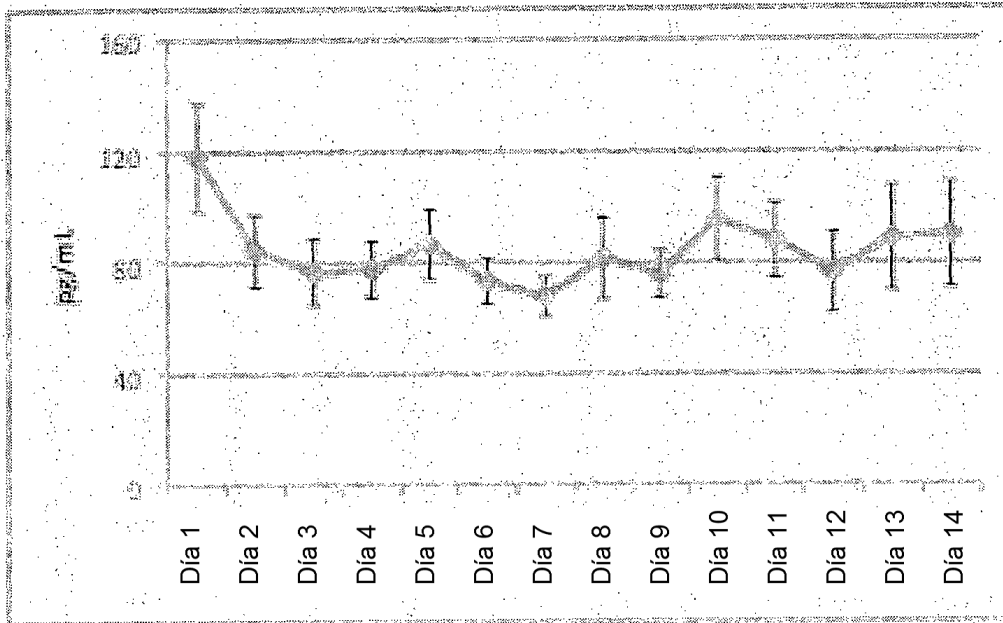


FIG. 4c (IL-8)

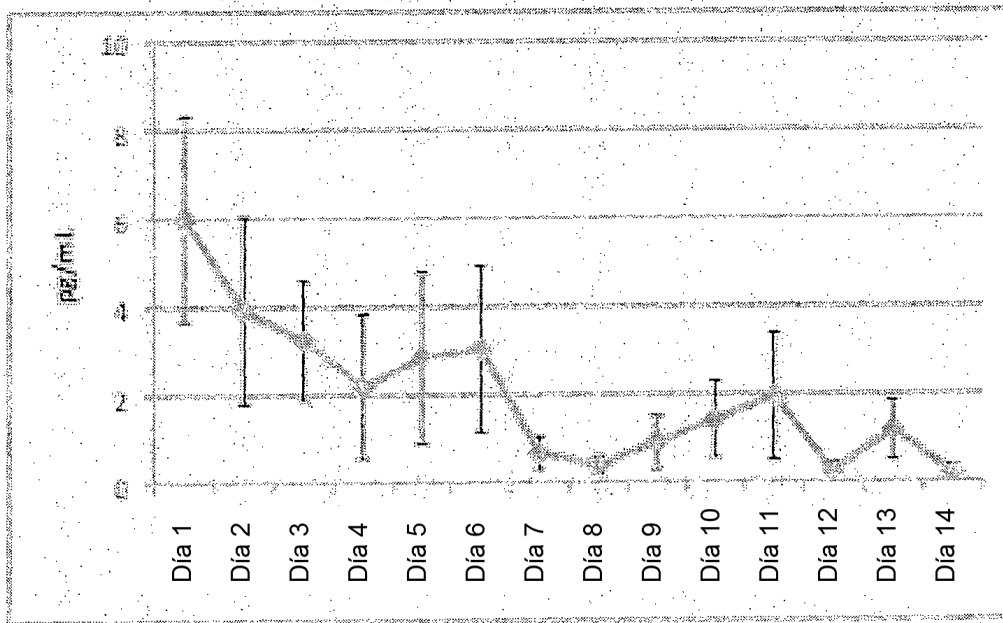


FIG. 4d (IL-15)

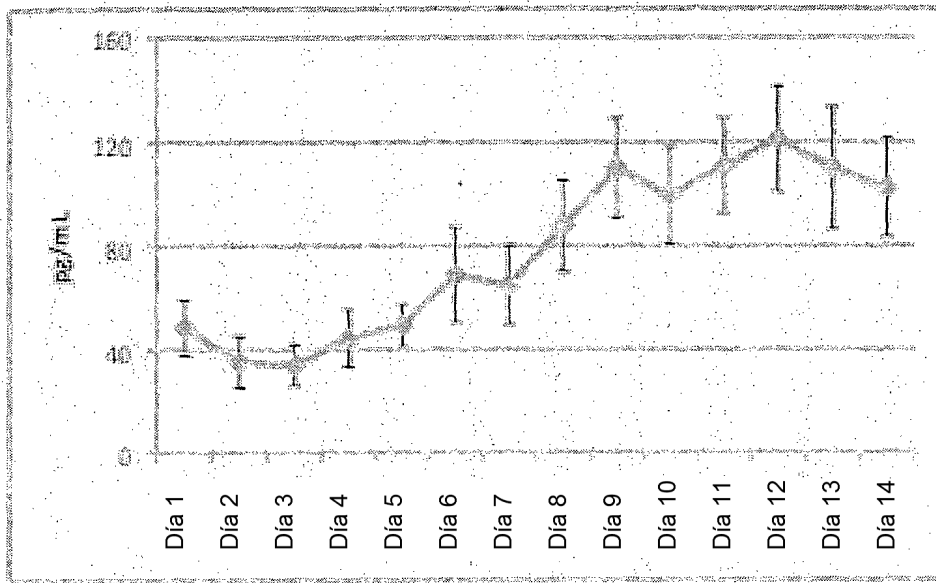


FIG. 4e (Eotaxina)

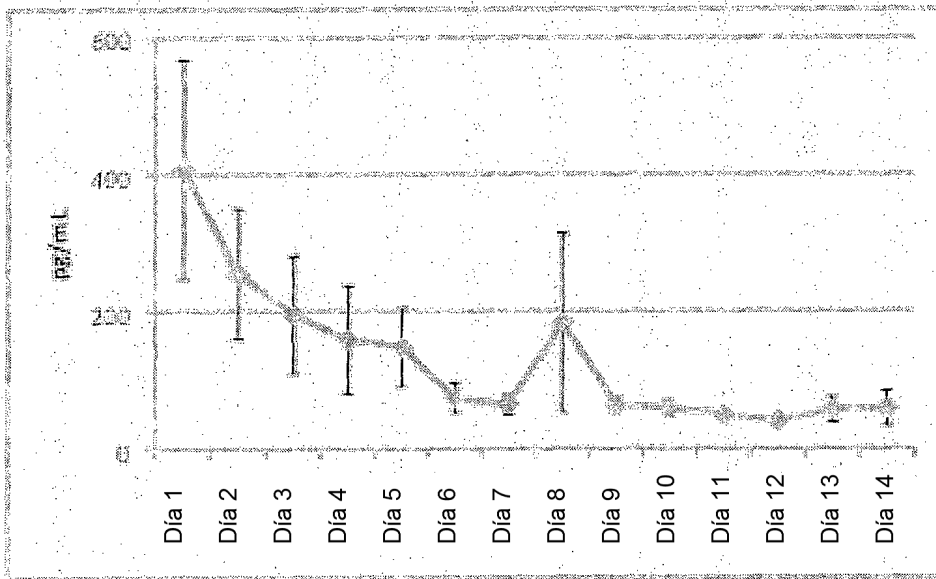


FIG. 4f (MCP-1)

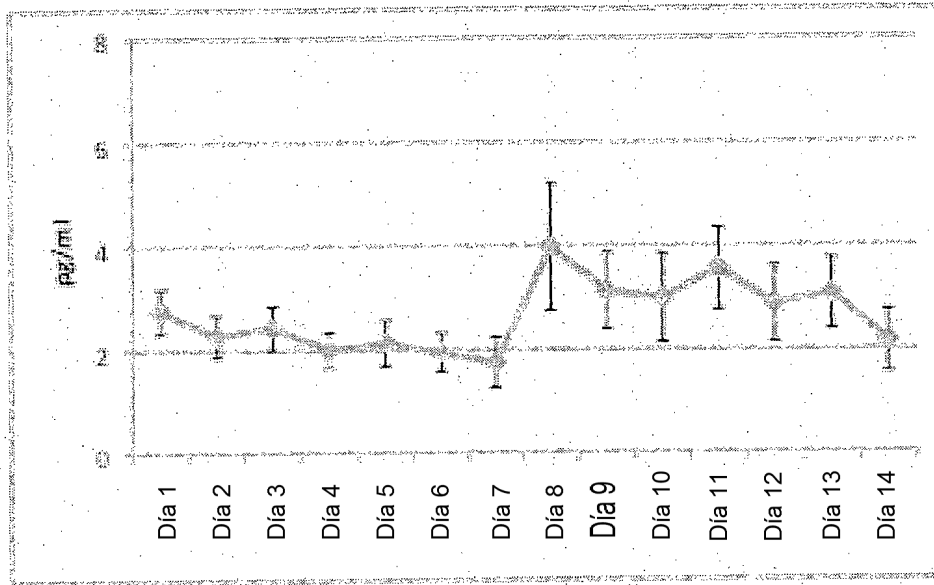


FIG. 4g (MIP-1a)

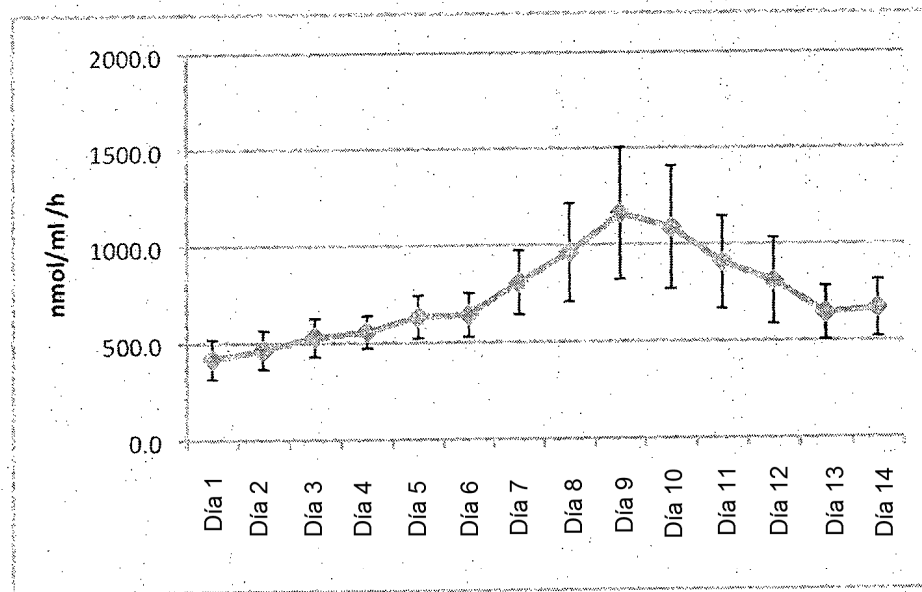


FIG. 4h (CD73)

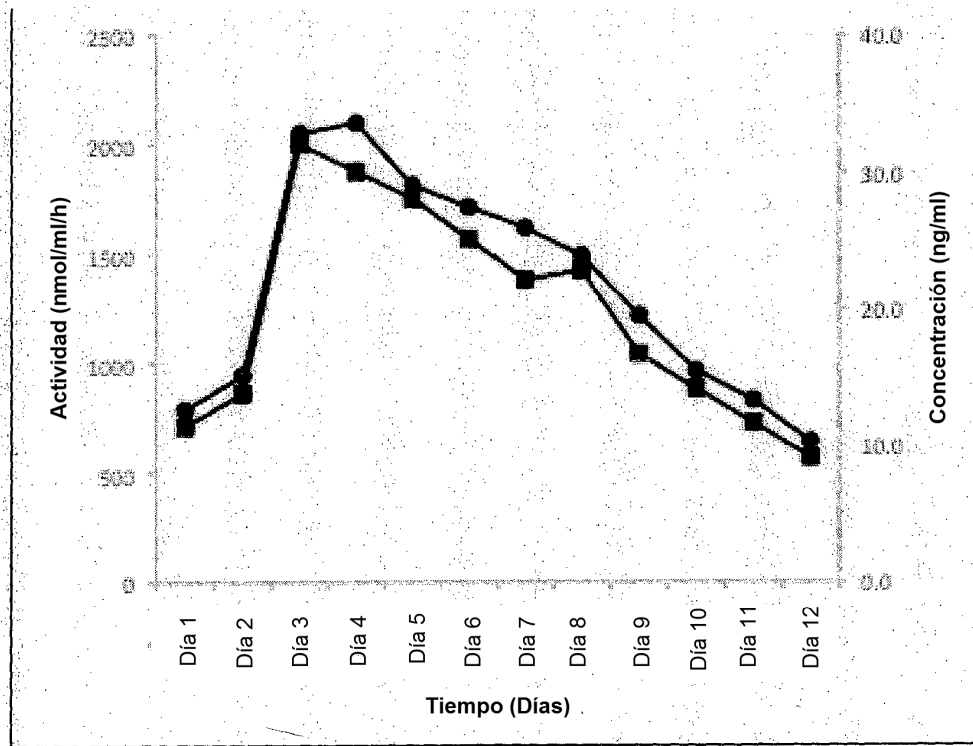


FIG. 5 (CD73)