

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 387**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2014 PCT/FR2014/052318**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015 WO15040328**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2014 E 14793211 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3047281**

54 Título: **Procedimiento de evaluación del riesgo de mortalidad en pacientes que presentan un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) o una sepsis**

30 Prioridad:

18.09.2013 FR 1358979

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

12.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MONNERET, GUILLAUME;
VENET, FABIENNE;
LEPAPE, ALAIN;
DEMARET, JULIE y
VILLARS-MECHIN, ASTRID**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 716 387 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de evaluación del riesgo de mortalidad en pacientes que presentan un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) o una sepsis.

5

La presente invención se refiere al campo médico en general, y en particular al campo de la reanimación.

Más precisamente, la invención se refiere a un procedimiento de evaluación del riesgo de mortalidad en un paciente que ha sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo, etc., que genera una respuesta inflamatoria sistémica o SIRS o en un paciente en estado séptico, es decir un paciente que presenta una SEPSIS, en particular una SEPSIS severa, también denominada SEPSIS grave, y preferentemente en un paciente en choque séptico.

10

La sepsis es un síndrome de respuesta sistémica inflamatoria en relación con una infección.

15

Una sepsis severa es una sepsis asociada a una hipotensión arterial y/o hipoperfusión y/o a la disfunción de por lo menos un órgano.

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

20

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

Los pacientes SIRS y que presentan unos síndromes sépticos, es decir los pacientes en estado séptico que va de SEPSIS, SEPSIS severa a choque séptico, representan una de las primeras causas de mortalidad en los servicios de reanimación.

25

Estimar el riesgo de mortalidad de un paciente SIRS, SEPSIS, SEPSIS severa y en particular de un paciente en estado de choque séptico, es por lo tanto esencial para poder proponer un tratamiento personalizado, y así intentar reducir el riesgo de fallecimiento.

30

La gravedad del estado de un paciente admitido en servicio de reanimación se estima generalmente con la ayuda de diferentes parámetros clínicos y fisiológicos. Estos permiten definir en particular unas puntuaciones predictivas en términos de supervivencia/mortalidad, entre las cuales se pueden citar las puntuaciones de gravedad SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment* o *Sepsis-related Organ Failure Assessment*) y SAPSII (*Simplified Acute Physiology Score II*)/IGS II (Índice de Gravedad Simplificado II). Estas puntuaciones compuestas, definidas sobre unas cohortes consecuentes de pacientes de reanimación, incluyen varios parámetros clínico-biológicos, tales como el número de plaquetas circulantes, la bilirrubinemia, la diuresis, la edad o la temperatura corporal. Estas puntuaciones permiten evaluar por el cálculo de un valor numérico el grado de padecimiento de la función de uno o de varios sistemas fisiológicos (por ejemplo: cardiovascular, renal, cerebral). Se calculan durante los primeros días de admisión en reanimación. En el caso de la puntuación SAPSII, sólo se tiene en cuenta el valor más deletéreo de los parámetros incluido en la puntuación, medido durante las 24 primeras horas de estancia en reanimación.

35

40

45

Estas puntuaciones son no obstante poco prácticas en rutina clínica ya que necesitan, por parte del médico, un enfoque activo de búsqueda de los parámetros clínicos en el informe del paciente.

Así, existe una necesidad real de disponer de otras herramientas y en particular de marcadores medibles, que permitan evaluar fácil y rápidamente el riesgo de mortalidad de un paciente admitido en el servicio de reanimación que está por definición en un estado grave, y en el que el pronóstico vital se puede eventualmente iniciar rápidamente. En efecto, poder identificar a los sujetos cuyo riesgo de mortalidad es elevado permitiría reservarles un tratamiento, un seguimiento, así como unas terapias más adecuadas.

50

El documento WO 2012/096245 A1 se refiere a un procedimiento de predicción del pronóstico de un choque séptico, en particular del riesgo de mortalidad en un paciente en estado de choque séptico, caracterizado por la medición del antígeno CD14 soluble (sCD14-ST). Este documento demuestra que sCD14-ST es un mejor marcador que la procalcitonina, conocida para la predicción del pronóstico de un paciente en estado de choque séptico.

55

60

Es en este contexto en el que la presente invención se propone proporcionar un nuevo "biomarcador" predictivo de un riesgo incrementado de mortalidad en un paciente que ha sufrido una agresión severa (cirugía, quemadura, traumatismo, etc.) que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) o en un paciente que presenta una SEPSIS, en particular SEPSIS severa, y preferentemente en un paciente en estado de choque séptico. El estudio del nivel de expresión de este "biomarcador" permite así evaluar, fácil y rápidamente, el riesgo de mortalidad del paciente y adoptar todas las disposiciones preventivas posibles.

65

Según un primer aspecto, la presente invención tiene por lo tanto por objeto un procedimiento de evaluación del riesgo de mortalidad en un paciente que ha sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo, etc., o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica o SIRS, que comprende, incluso que consiste en, las etapas siguientes:

- medir la expresión de sCD127 en una muestra biológica procedente de dicho paciente, también denominada muestra a ensayar,
- concluir que hay un riesgo incrementado de mortalidad después de la comparación de la expresión de sCD127 con respecto a un valor de referencia.

El procedimiento según la invención es un procedimiento de realización *in vitro* o *ex vivo*. Presenta la ventaja de poder evaluar fácilmente el riesgo de mortalidad, en particular de un paciente admitido en el servicio de reanimación o en urgencias, disponiendo de un marcador directamente medible, contrariamente a las puntuaciones de gravedad SOFA y SAPSII por ejemplo, y cuya medición se puede llevar a cabo en un laboratorio cercano o en la cama del paciente. La medición del marcador es totalmente adecuada para ser realizada por unos autómatas de análisis o por unas pruebas denominadas rápidas.

El sCD127 es la forma soluble o plasmática del CD127, receptor de la IL-7. El CD127 o cadena alfa del receptor de la IL-7 es una glicoproteína de 75 kDa miembro de la superfamilia de los receptores de los factores de crecimiento hematopoyéticos. Está expresado a nivel membranario en asociación con el CD132 (cadena γ_c común) para formar el receptor de la IL-7. Este receptor tiene un papel importante en la diferenciación, la supervivencia y la proliferación linfocitaria. El CD127 está constituido por una parte extracelular de 219 aminoácidos (aa), por una parte transmembranaria de 25 aa y por una parte intracitoplásmica de 195 aa. La existencia de una forma soluble/plasmática, denominada sCD127, generada por corte y empalme alternativo del ARNm que codifica el CD127 ha sido descrita en 1990 por Goodwin RG *et al.*, Cell, 1990, 23, 941-951, pero su función sigue siendo poco conocida en la actualidad.

En el marco de la invención, se entiende por "sCD127" la forma soluble o forma circulante (también denominada forma plasmática o sérica) del receptor de la IL-7, también denominada cadena alfa del receptor de la IL-7 o IL7R o IL7R-ALPHA o IL7RA o CDW127, y en particular tal como la descrita por Goodwin *et al.*, Cell, 1990, 23, 941-951 y dosificada por Crawley *et al.*, Journal of Immunology, 2010, 184, 4679-4687.

En particular, las secuencias nucleicas de referencia para CD127 y por lo tanto para sCD127 según la invención son, preferentemente, las siguientes: Conjunto: ENSG00000168685, HPRD-ID: 00893 y secuencia nucleotídica: NM_002185.2, Vega genes: OTTHUMG00000090791.

Por otra parte, las secuencias proteicas de referencia para CD127 y por lo tanto para sCD127 según la invención son preferentemente las siguientes: NP_002176 XP_942460; versión: NP_002176.2 GI:28610151.

La muestra a ensayar en el marco del procedimiento de la invención es una muestra biológica que procede del paciente del que se desea evaluar el riesgo de mortalidad. En particular, esta muestra biológica se selecciona de entre las susceptibles de contener el marcador sCD127.

En el sentido de la invención, se entiende por "respuesta inflamatoria sistémica" o "SIRS" una respuesta que asocia por lo menos dos de los criterios siguientes: temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$, frecuencia cardiaca $> 90/\text{minuto}$, frecuencia respiratoria $> 20/\text{minuto}$ o $\text{pCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$, leucocitos $> 12.000/\text{mm}^3$ o $< 4000/\text{mm}^3$ Bone *et al.*, Chest, 1992, 1644-1655.

La presente invención presenta una aplicación preferida en los pacientes que presentan una SEPSIS, en particular una SEPSIS severa. De manera particularmente preferida, el procedimiento según la presente invención es muy particularmente ventajoso para evaluar el riesgo de mortalidad en un paciente que está en estado de choque séptico. En estos pacientes en estado séptico (SEPSIS, SEPSIS severa y choque séptico), que presentan una SIRS tras una infección, la infección puede ser de diversos orígenes, y en particular una infección bacteriana, viral, fúngica.

Según un primer modo de realización preferido, el procedimiento de la invención permite concluir un alto riesgo de mortalidad en el paciente, cuando se pone en evidencia una sobreexpresión de sCD127 en la muestra a ensayar con respecto a un primer valor de referencia.

Por "sobreexpresión" se entiende un aumento significativo del nivel de expresión con respecto a un valor de referencia. El experto en la materia sabrá determinar el ensayo estadístico a utilizar para determinar el valor de referencia con el cual el nivel de expresión de sCD127 debe ser comparado en función de la comparación a efectuar, por ejemplo comparación de poblaciones o tipos de muestras diferentes, comparación de la evolución en el tiempo de una misma población o del mismo tipo de muestra, etc., y determinar un aumento significativo del

nivel de expresión de sCD127 en función del tipo de muestras ensayadas (por ejemplo plasma, suero o sangre), del tipo de análisis inmunológico realizado (por ejemplo Blot, ELISA), incluso del aparato de análisis utilizado, etc.

5 En este modo de realización, el primer valor de referencia puede corresponder al nivel de expresión de sCD127 medido en una muestra biológica procedente de un paciente que ha sufrido una agresión o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica del cual se sabe que ha sobrevivido, en particular de un paciente que presenta una SEPSIS del cual se sabe que ha sobrevivido, y preferentemente de un paciente en choque séptico del cual se sabe que ha sobrevivido.

10 En este caso, esta medición de la expresión de sCD127 que constituye el primer valor de referencia se efectúa preferentemente en paralelo, es decir al mismo tiempo que la medición de la expresión de sCD127 que se realiza en la muestra procedente del paciente en el que se desea evaluar el riesgo de mortalidad, a pesar de que la extracción de la muestra de referencia se haya efectuado anteriormente a la de la muestra a ensayar.

15 Este primer valor de referencia puede también corresponder a un valor medio del nivel de expresión de sCD127 que se mide en un grupo de muestras procedente de pacientes que han sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo, etc., o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de los cuales se sabe que han sobrevivido, en particular de pacientes que presentan una SEPSIS de los cuales se sabe que han sobrevivido, y preferentemente, de pacientes en estado de choque séptico de los cuales se sabe que han sobrevivido. En este caso, esta medición de la expresión de sCD127 que constituye el primer valor de referencia se efectúa de manera preferida previamente a la medición de la expresión de sCD127 que se realiza en la muestra procedente del paciente en el que se busca evaluar el riesgo de mortalidad, a pesar de que la extracción de las muestras de referencia destinadas a agruparse se haya efectuado anteriormente a la de la muestra a ensayar.

25 En este primer modo de realización preferido, y en particular para evaluar el riesgo de mortalidad de un paciente en estado de choque séptico, la medición de la expresión de sCD127 en la muestra a ensayar y, llegado el caso, en la muestra biológica utilizada para obtener el primer valor de referencia, se realiza en los 4 días o 4 días (D4) después del choque séptico, preferentemente en los 3 días o 3 días (D3) después del choque séptico, de manera aún más preferida en los 2 días o 2 días (D2) después del choque séptico, y de manera particularmente preferida en el día o a un 1 día (D1) después del choque séptico. Dicho de otra manera, este primer valor de referencia se realiza en los 4 días, en los 3 días, en los 2 días, al día siguiente del choque séptico o 4 días, 3 días, 2 días, 1 día después del choque séptico. Según una forma de realización particularmente ventajosa de este primer modo de realización de la invención, el primer valor de referencia se realiza en los 2 días o en el día, o también 2 días o 35 1 día después del choque séptico, lo cual permite determinar de manera muy precoz el riesgo de mortalidad del paciente ensayado.

Según un segundo modo de realización preferido, el procedimiento de la invención permite concluir que el paciente tiene un alto riesgo de mortalidad, cuando la expresión de sCD127 que se mide en la muestra a ensayar no disminuye significativamente con respecto a un segundo valor de referencia. Está al alcance del experto en la materia determinar el porcentaje de disminución significativo que dependerá del tipo de muestra a ensayar (por ejemplo plasma, suero o sangre), del tipo de análisis inmunológico (por ejemplo Blot, ELISA) incluso del aparato en el que se efectúa el análisis, etc. De manera general, se concluye que hay un riesgo incrementado de mortalidad si la expresión de sCD127 que se mide en la muestra a ensayar no disminuye en más del 30% con respecto a este segundo valor de referencia, preferentemente si no disminuye en más del 25%, y en particular si no disminuye en más del 20%, o incluso si no disminuye en más del 15% o del 10% con respecto a este segundo valor de referencia.

50 Este segundo valor de referencia corresponde al nivel de expresión de sCD127 medido en una muestra biológica procedente del mismo paciente durante una extracción anterior, es decir en una muestra biológica procedente del paciente en el que se desea evaluar el riesgo de mortalidad y obtenido anteriormente con respecto a la muestra a ensayar. Por "anterior" o "anteriormente" se entiende manera más precoz en el tiempo. Preferentemente, el segundo valor de referencia corresponde al nivel de expresión de sCD127 medido en una muestra biológica que es directamente anterior con respecto a la muestra a ensayar, es decir la que precede a la muestra a ensayar en el orden de las extracciones efectuadas en el paciente.

60 En este segundo modo de realización preferido, y en particular para evaluar el riesgo de mortalidad de un paciente en estado de choque séptico, la medición de la expresión de sCD127 en la muestra a ensayar se realiza aproximadamente o 7 días (D7) después del choque séptico, más preferentemente aproximadamente o 4 días (D4) después del choque séptico, en particular aproximadamente 3 días o 3 días después del choque séptico, y de manera más preferida aún aproximadamente 2 días o 2 días (D2) después del choque séptico.

65 La extracción anterior se puede efectuar, por ejemplo, dentro de 48 h, o a las 48 h, después del choque séptico y por lo menos 24 h antes de la de la muestra a ensayar, y preferentemente la extracción anterior se efectúa dentro de 48 h, o a las 48 h, después del choque séptico y la de la muestra a ensayar se efectúa dentro de las 48 h después de la extracción anterior o 48 h después de la extracción anterior.

Así, en todos los casos, antes de la medición de la expresión de sCD127 propiamente dicha en la muestra a ensayar, el procedimiento de la invención puede comprender la obtención previa del valor de referencia, ya sea el primer valor de referencia o el segundo valor de referencia, con el cual se podrá comparar el nivel de expresión que se detectará en la muestra a ensayar con el fin de concluir que hay un riesgo incrementado o no de mortalidad en el paciente del cual procede la muestra a ensayar.

Es por lo tanto con estos valores de referencia, ya sea el primer valor de referencia o el segundo valor de referencia, obtenidos previamente o al mismo tiempo, con los que se comparará el valor de la expresión de sCD127 que se mide en la muestra a ensayar.

La muestra sobre la cual se utiliza el procedimiento de la invención, también denominada en la presente memoria muestra a ensayar, puede ser de origen animal o humano, y preferentemente humano.

La muestra a ensayar puede ser un fluido biológico, por ejemplo seleccionado de entre la sangre, la sangre total en particular tal como se recoge de la vía venosa, es decir que contiene las células blancas y rojas, las plaquetas y el plasma, el suero, el plasma y el líquido de lavado bronco-alveolar.

Preferentemente, la muestra a ensayar procedente de dicho paciente es una muestra de plasma o de suero.

Las muestras a partir de las cuales se pueden determinar los valores de referencia, ya sea el primer valor de referencia o el segundo valor de referencia, también denominadas "muestras de referencia" pueden ser de diferentes naturalezas y en particular de naturaleza biológica tal como se ha mencionado anteriormente, que se refieren a la muestra a ensayar (fluidos biológicos). Ventajosamente, estas muestras biológicas son de la misma naturaleza que la de la muestra biológica a ensayar o como mínimo de una naturaleza compatible para constituir una referencia en cuanto a la detección y/o la cuantificación de la expresión de sCD127.

Para obtener el primer valor de referencia en particular, estas muestras proceden preferentemente de personas que tienen las mismas características o una mayoría de características comunes, en particular del mismo sexo y/o de una edad similar o idéntica y/o de igual origen étnico, con las del sujeto o paciente en el que se desea evaluar el riesgo de mortalidad. La muestra de referencia puede también en este caso estar constituida por cualquier muestra, biológica o no biológica, que ha sido calibrada previamente para contener un valor medio de sCD127 que corresponde al nivel que ha sido medido sobre un grupo de muestras biológicas procedentes de pacientes que han sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo, etc., o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de los cuales se sabe que han sobrevivido, en particular de pacientes que presentan una SEPSIS de los cuales se sabe que han sobrevivido, y preferentemente de pacientes en estado de choque séptico de los cuales se sabe que han sobrevivido. En este caso, y según una variante particularmente preferida, la muestra de referencia procede de uno o de pacientes en estado de choque séptico del cual (de los cuales) se sabe que ha(n) sobrevivido.

Para obtener el segundo valor de referencia en particular, la muestra de referencia es preferentemente una muestra biológica procedente del paciente en el que se desea evaluar el riesgo de mortalidad y del cual procede la muestra a ensayar, pero obtenida a partir de una extracción anterior en el tiempo con respecto a la de la muestra a ensayar. Preferentemente, el segundo valor de referencia se obtiene a partir de una muestra biológica que es directamente anterior con respecto a la muestra a ensayar, es decir la que precede a la muestra a ensayar en el orden de las extracciones efectuadas en el paciente.

Según un modo de realización particular, el procedimiento según la invención comprende la medición de la expresión de sCD127 combinada con la estimación de una por lo menos de las puntuaciones de gravedad SOFA y/o SAPSII para evaluar el riesgo de mortalidad del paciente que ha sufrido una agresión o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), y en particular de un paciente que está en estado de choque séptico. En este modo de realización, la puntuación SOFA se calcula preferentemente como describe J.L Vincent *et al.*, Intensive Care Med., 1996;22:707-710, y/o la puntuación SAPSII se calcula preferentemente como describe Le Gall J.R. *et al.*, JAMA, 1993;270:2957-63.

En el sentido de la presente invención, el término "medir la expresión" se entiende como una medición *in vitro* o *ex vivo*. Por otro lado, por este término se entiende designar la detección y la cuantificación de sCD127, preferentemente a nivel proteico.

Para este fin, cualquier método de detección y/o de cuantificación bien conocido por el experto en la materia se puede utilizar para la realización de la invención, ya sea con relación a la determinación de la presencia y/o la medición de la expresión de la proteína sCD127. A título de ejemplo de método de medición de la expresión de la proteína sCD127, se puede citar en particular el descrito por Crawley *et al.*, Journal of Immunology, 2010, 184, 4679-4687.

En particular, la medición del nivel de expresión de sCD127 se realiza con la ayuda de herramientas o de

reactivos que son específicos de sCD127 y que permiten, directa o indirectamente, determinar su presencia y/o cuantificar su nivel de expresión.

5 Entre las herramientas o reactivos capaces de detectar y/o cuantificar sCD127, se pueden citar en particular unos anticuerpos específicos, policlonales o monoclonales, preferentemente monoclonales, o unos fragmentos o derivados de estos, por ejemplo unos fragmentos Fab, F(ab)'2, Sv, scFv o unos análogos de anticuerpos, en particular unas proteínas de afinidad a las propiedades competitivas (nanofitines™).

10 Entre estas herramientas o reactivos, se prefieren en particular los que son específicos de la forma soluble del receptor de la IL-7, es decir que no reconocen CD127 que es la forma celular/membranaria no soluble de este receptor. Se pueden utilizar no obstante unas herramientas o reactivos que reconocen al mismo tiempo la forma soluble o sCD127 y la forma celular del receptor de la IL-7 o CD127, mientras que sea posible distinguir estas dos formas por otro medio como, por ejemplo, la naturaleza de la muestra analizada (por ejemplo, plasma o suero frente a muestra biológica que contiene unas células o sangre total).

15 Cuando se realiza la detección y/o la cuantificación de sCD127 a nivel proteico, se pueden utilizar las técnicas estándares tales como la transferencia western, ELISA, RIA, IRMA, FIA, CLIA, ECL, citometría de flujo o inmunocitología.

20 De manera particularmente ventajosa, la expresión de sCD127 se mide a nivel proteico, y preferentemente con la ayuda de una técnica ELISA.

25 Según la invención, y en particular en este modo de realización particular, el nivel de expresión de sCD127 se mide preferentemente con la ayuda de anticuerpos anti-sCD127, monoclonales o policlonales, y en particular de anticuerpos monoclonales anti-sCD127. A título de ejemplo, se pueden citar en particular los anticuerpos monoclonales anti-CD127 humano R34.34 comercializados por la compañía Beckman Coulter® o los anticuerpos policlonales anti-CD127 comercializados por la compañía R&D Systems®.

30 Todas las indicaciones y preferencias mencionadas anteriormente que tratan de la medición de la expresión de sCD127 se aplican indiferentemente para la medición de esta expresión en la muestra a ensayar y en la muestra de referencia.

35 Según un segundo aspecto, la presente invención tiene también por objeto la utilización de la medición, *in vitro* o *ex vivo*, de la expresión de sCD127 para evaluar el riesgo de mortalidad de un paciente que ha sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo, etc., o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica o SIRS, en particular de un paciente que presenta una SEPSIS, en particular una SEPSIS severa.

40 De manera preferida, esta utilización es particularmente ventajosa para evaluar el riesgo de mortalidad de un paciente que está en choque séptico.

45 Por otro lado, en el marco de la utilización según la invención, la expresión de sCD127 se mide preferentemente a nivel proteico, y en particular con la ayuda de una técnica ELISA.

En particular, se puede medir la expresión de sCD127 con la ayuda de anticuerpos anti-sCD127, monoclonales o policlonales, y preferentemente de anticuerpos monoclonales anti-sCD127. Los anticuerpos citados anteriormente pueden también ser utilizados para este segundo aspecto de la invención.

50 Más ampliamente, todos los modos de realización preferidos que se han mencionado anteriormente en lo referente al procedimiento y sus combinaciones constituyen también unos modos de realización preferidos que se refieren a la utilización. Más particularmente, la utilización según la invención puede comprender en particular la medición de la expresión de sCD127 combinada con la estimación de una por lo menos de las puntuaciones de gravedad SODA y/o SAPSII para evaluar el riesgo de mortalidad del paciente que ha sufrido una agresión o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), y en particular de un paciente que está en estado de choque séptico.

55 Según un tercer aspecto, la presente invención tiene también por objeto un kit para la medición, *in vitro* o *ex vivo*, de la expresión de sCD127 en una muestra biológica, que comprende:

- 60 - unas herramientas o reactivos específicos que permiten medir la expresión de sCD127 en dicha muestra biológica, y
- una muestra control positivo que es una muestra calibrada para contener la cantidad de sCD127 que corresponde a la cantidad media medida en un grupo de muestras de pacientes de los cuales se sabe que han sobrevivido, y/o una muestra control negativo que es una muestra calibrada para contener la
- 65 cantidad de sCD127 que corresponde a la cantidad media medida en un grupo de muestras de pacientes de los cuales se sabe que no han sobrevivido.

Así, el kit según la invención comprende unas herramientas o reactivos específicos que permiten medir la expresión de sCD127 en dicha muestra biológica, y por lo menos una muestra control.

5 El kit según la invención permite en particular evaluar el riesgo de mortalidad en un paciente hospitalizado que ha sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo, etc., o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), y en particular en un paciente que está en estado de choque séptico.

10 Preferentemente, las herramientas o reactivos específicos que permiten medir la expresión de sCD127 en una muestra biológica que están presentes en el kit de la invención permiten detectar y/o cuantificar la expresión de sCD127, y preferentemente a nivel proteico.

15 Según un modo de realización particularmente preferido, el kit de la invención contiene unos anticuerpos anti-sCD127, monoclonales o policlonales, y en particular unos anticuerpos monoclonales, como herramientas o reactivos específicos que permiten medir la expresión de sCD127 en dicha muestra biológica.

20 Otra muestra control positivo puede ser también una muestra biológica procedente de por lo menos un paciente del cual se sabe que ha sobrevivido. Asimismo, otra muestra control negativo puede ser también una muestra biológica procedente de por lo menos un paciente del cual se sabe que no ha sobrevivido. Ya sea para un control positivo o negativo, este tipo de muestra control procede en particular de varios pacientes que han sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo, etc., o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), en particular de varios pacientes que presentan una SEPSIS, y preferentemente de varios pacientes en estado de choque séptico.

25 De manera preferida, el kit comprende al mismo tiempo una muestra control positivo y una muestra control negativo, y en particular seleccionadas cada una de entre las muestras calibradas tales como se han definido anteriormente.

30 La invención se refiere también a la utilización de un kit según la invención para realizar el procedimiento de la invención, y en particular para evaluar el riesgo de mortalidad de un paciente que ha sufrido una agresión, tal como cirugía, quemadura, traumatismo, etc., o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), en particular en un paciente que presenta una SEPSIS, en particular una SEPSIS severa. Preferentemente, la utilización del kit según la invención permite evaluar el riesgo de mortalidad en un paciente que está en estado de choque séptico.

35 Todos los modos de realización preferidos que han sido mencionados anteriormente referentes al procedimiento y a sus combinaciones constituyen también unos modos de realización preferidos que se refieren al kit según la invención y a su utilización.

40 Otras características diferentes se desprenden de la descripción realizada a continuación en referencia a las figuras adjuntas que muestran, a título de ejemplos no limitativos, unas formas de realización del objeto de la invención y en las que:

45 - la **figura 1** representa la curva ROC de la concentración de sCD127 plasmático medida el D1-2, de la puntuación SAPSII y de la puntuación SOFA en 70 pacientes después del choque séptico.

- las **figuras 2A, 2B y 2C** representan las curvas de supervivencia de sCD127 para 70 pacientes el D1-2 (**A**) y el D3-4 (**B**) y de la puntuación SAPSII (**C**) después del choque séptico.

50 - las **figuras 3A y 3B** representan las curvas de supervivencia de la combinación de sCD127 para 70 pacientes el D1-2 (**A**) y el D3-4 (**B**) después del choque séptico y de la puntuación SAPSII.

Métodos

55 *Muestras biológicas*

Se han extraído unas muestras de plasma sobre 70 pacientes en choque séptico en los días 1-2 (D1-2) y 3-4 (D3-4) después del choque séptico, y después se almacenaron (cohorte retrospectiva). Se han extraído también unas muestras plasmáticas en 41 sujetos sanos voluntarios.

60 28 días después de la admisión en reanimación por choque séptico, 14 pacientes no han sobrevivido ("NS"), es decir el 20%, mientras que 56 pacientes han sobrevivido ("S") de los 70 pacientes.

Dosificación de la forma soluble del receptor de la IL-7 (sCD127) por ELISA

“Coating”

5 Se ha preparado un tampón de “coating” para contener 0,8 Na₂CO₃, 1,4 g NaHCO₃, 0,1 g NaN₃ en 500 ml de agua (pH 9.6).

10 Se depositaron 100 µl de anticuerpos (Ac) de captura (anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD127 humano R34-34, Beckman Coulter®) diluidos en tampón de “coating” por pocillo en una placa ([Ac] = 8 µg/ml). La placa se recubrió a continuación para ser incubada a 4°C durante una noche.

15 Se aspiró a continuación el contenido de los pocillos y los pocillos se lavaron 3 veces con por lo menos 300 µl de tampón de lavado PBS-Tween₂₀ 0,05%. Todo el líquido se ha retirado cuidadosamente en cada lavado. Después del último lavado, se le dio la vuelta a la placa sobre papel absorbente con el fin de eliminar cualquier traza de tampón.

“Blocking”

20 La fijación no específica se bloqueó con la ayuda de 150 µl de tampón de bloqueo por pocillo (10% de suero de bovino fetal (FBS)/PBS-Tween₂₀ 0,05%), y después se incubó la placa durante 1h a 37°C.

25 De nuevo, el contenido de los pocillos fue aspirado y se lavaron los pocillos 3 veces con por lo menos 300 µl de tampón de lavado PBS-Tween₂₀ 0,05%. Todo el líquido se retiró cuidadosamente en cada lavado. Después del último lavado, se le dio la vuelta a la placa sobre papel absorbente con el fin de eliminar cualquier traza de tampón.

Muestras y controles

30 Se realizó una gama patrón con recombinante humano IL-7R α /CD127 Fc quimera (R&D Systems - Catalog Number: 306-IR) diluido en tampón de dilución PBS 5% FCS, como se describe en la tabla 1 siguiente y de acuerdo con C. Janot-Sardet *et al.* Journal of Immunological Methods, 2010, 28, 115-123.

Tabla 1

	rh IL-7R α /CD127 Fc quimera							
[c] (ng/ml)	500	250	125	62.5	31.25	15.7	7.85	0
Diluyente (µl)	0	100	100	100	100	100	100	100
Solución a 500 ng/ml (µl)	100	100	Diluciones sucesivas					0

35 Se añadieron en cada pocillo 100 µl de muestra o de control (solución de CD127 Fc quimera reconstituida extemporáneamente y alicotada con unas concentraciones de 60 ng/ml y 10 ng/ml), y después se incubó la placa durante 1h a 37°C.

40 De nuevo, el contenido de los pocillos fue aspirado y los pocillos se lavaron 3 veces con por lo menos 300 µl de tampón de lavado PBS-Tween₂₀ 0,05%. Todo el líquido se retiró cuidadosamente después de cada lavado. Después del último lavado, se dio la vuelta a la placa sobre papel absorbente con el fin de eliminar cualquier traza de tampón.

45 *Anticuerpos de detección*

50 Se añadieron en cada pocillo 100 µl de anticuerpos de detección (anticuerpo de cabra policlonal anti-CD127 biotinilado reconstituido con 1 ml de TBS-BSA 1%, R&D Systems®) diluidos en PBS/5 %FBS ([Ac] = 200 ng/ml), y después se incubó la placa durante 1h a 37°C.

De nuevo, el contenido de los pocillos fue aspirado y se lavaron los pocillos 3 veces con por lo menos 300 µl de tampón de lavado PBS-Tween₂₀ 0,05%. Todo el líquido se retiró cuidadosamente en cada lavado. Después del último lavado, se dio la vuelta a la placa sobre papel absorbente con el fin de eliminar cualquier traza de tampón.

55 *Revelación*

Se añadieron en cada pocillo 100 µl de estreptavidina-HRP ([Streptavidin-HRP] = 8 µl/ml). Se recubrió después la placa para ser incubada durante 30 min a temperatura ambiente.

60 De nuevo, el contenido de los pocillos fue aspirado y se lavaron los pocillos 3 veces con por lo menos 300 µl de tampón de lavado PBS-Tween₂₀ 0,05%. Todo el líquido se retiró cuidadosamente en cada lavado. Después del

último lavado, se dio la vuelta a la placa sobre papel absorbente con el fin de eliminar cualquier traza de tampón. En esta etapa de lavado, los pocillos fueron embebidos con el tampón de lavado 1 a 2 min antes de la aspiración.

5 Los dos frascos de la solución de sustrato calorimétrico TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, bioMérieux #XX7LF1UC) fueron mezclados volumen a volumen y se depositaron 100 µl de esta solución de sustrato en cada pocillo. La placa se recubrió a continuación para ser incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, se efectuó la lectura de la placa por medición de la absorbancia a 450 nm.

10 Análisis multivariado

Un moldeo de Cox ha permitido estimar el "Hazard Ratio" y su intervalo de confianza al 95% (95% CI) y su significatividad. Las puntuaciones SAPSII y SOFA fueron incluidas en el modelo en forma de variables continuas asumiendo una relación lineal entre sus valores y el riesgo de deceso (supervivientes frente a no supervivientes).
 15 Los análisis estadísticos se realizaron gracias a los programas SPSS (versión 17.0, SPSS, Chicago, IL) y GraphPad Prism (versión 5.03, GraphPad Software, La Jolla, CA). Se consideraron como significativos unos valores p inferiores a 0,05.

20 Análisis de comparación de supervivencia (Ensayo del "Log Rank")

Se generaron las curvas ROC (*Receiver Operating Curves*) con la ayuda del programa citado anteriormente y se definió la concentración óptima o umbral óptimo de sCD127 que permite obtener las mejores sensibilidades y especificidades, gracias al índice de Youden que combina los parámetros de sensibilidad y especificidad para unos valores incrementados del marcador considerado. Se determinó por lo tanto la concentración óptima del
 25 marcador que da el índice de Youden más elevado, es decir una sensibilidad y una especificidad óptimas. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se obtuvieron después de la estratificación de los pacientes en base a este valor óptimo. La diferencia de supervivencia entre los grupos se evaluó mediante el ensayo "Log Rank" y el "Hazard Ratio" (y su intervalo de confianza al 95%) calculado en base a las pendientes de estas curvas de supervivencia.

30 Resultados

Dosificación de la forma soluble del receptor de la IL-7 (sCD127)

35 La concentración de sCD127 plasmático se midió como se ha descrito anteriormente en las muestras de plasma de 70 pacientes en choque séptico y las puntuaciones de gravedad SOFA y SAPSII se evaluaron en estos pacientes en base a unos datos clínicos y fisiológicos disponibles durante las 24 primeras horas de hospitalización.

40 Las mismas mediciones se efectuaron también sobre las muestras procedentes de 41 sujetos sanos voluntarios (HV).

Los resultados se agrupan en las tablas **2 a 4** siguientes:

45 *Capacidad de sCD127 para predecir el deceso de los pacientes en choque séptico*

La capacidad predictiva de la medición de la concentración del sCD127 plasmático se estudió frente al evento a estudiar, a saber la mortalidad. Se estudió también la de dos puntuaciones de referencia SAPSII y SOFA con respecto a este mismo evento.

50 Los resultados se representan en la **Figura 1** en forma de una curva ROC (*Receiving Operating Curve*) del sCD127 medido el D1-2 y de las puntuaciones de gravedad SAPSII y SOFA en los 70 pacientes en choque séptico.

55 La evaluación de las áreas bajo la curva, recogidas en la **tabla 2** siguiente, permite comparar las prestaciones predictivas de las puntuaciones conocidas SOFA y SAPSII con la de la medición del sCD127 plasmático.

Tabla 2

	Área bajo la curva (AUC)	Valor de p
sCD127 medido el D1-2	0,846	P<0,001
sCD127 medido el D3-4	0,774	P=0,002
SOFA el D1	0,692	P=0,027
SAPSII el D1	0,770	P=0,002

60

Para los valores de sCD127 medidos el D1-2, el umbral óptimo ha sido definido a 44,45 ng/ml gracias al índice de Youden, lo cual lleva a una sensibilidad del 86%; una especificidad del 71%, un valor predictivo positivo (probabilidad de que el paciente fallezca si el ensayo está por encima del umbral) del 43% y un valor predictivo negativo (probabilidad que el paciente sobreviva cuando el ensayo está por debajo del umbral) del 95%.

Asimismo, para los valores de sCD127 medidos el D3-4, el umbral óptimo se ha definido a 48,10 ng/ml, lo cual lleva a una sensibilidad del 71%; una especificidad del 86%, un valor predictivo positivo del 56% y un valor predictivo negativo del 92%.

Por comparación, mediante la puntuación SOFA medida el D1, la sensibilidad es del 64,3% y la especificidad es del 66,1% con un valor predictivo positivo de 32,1% y un valor predictivo negativo del 88,1%.

Mediante la puntuación SAPSII medida el D1, la sensibilidad es del 71,4% y la especificidad es del 55,4% con un valor predictivo positivo de 28,6% y un valor predictivo negativo del 88,6%.

Estos resultados muestran por lo tanto que la medición el D1-2 de la concentración de sCD127 en el plasma de los pacientes presenta una capacidad de predicción del deceso pos-choque séptico mejor que las puntuaciones SOFA y SAPSII utilizadas clásicamente (en base a las áreas bajo las curvas ROC).

20 *Análisis multivariado*

Con el fin de evaluar la independencia de la relación entre la concentración plasmática del sCD127 y el riesgo de deceso con respecto a los factores de riesgos conocidos de los pacientes en choque séptico (gravedad inicial y número de fallos de órganos evaluados por las puntuaciones SAPSII y SOFA), se efectuaron unos análisis de regresión logística uni- y multi-variados como se ha descrito anteriormente.

Se ha llevado a cabo un análisis multivariado entre las puntuaciones SOFA, SAPSII y la medición de sCD127 obtenidos el D1-2 y D3-4. Los resultados, que se agrupan en las **tablas 3 y 4** siguientes, muestran que la medición de sCD127 es un marcador que es totalmente independiente de los dos factores de riesgo conocidos SOFA y SAPSII para la predicción de la mortalidad post-choque séptico.

Tabla 3

	Valor de p	"Hazard Ratio"	Intervalo de confianza al 95%
sCD127 D1-2	0,004	8,153	1,927-34,503
SOFA	0,872	1,125	0,268-4,718
SAPSII	0,062	3,887	0,936-16,149

35 Tabla 4

	Valor de p	"Hazard Ratio"	Intervalo de confianza al 95%
sCD127 D3-4	0,011	6,748	1,55-29,374
SOFA	0,599	1,436	0,373-5,526
SAPSII	0,06	3,787	0,947-15,141

Curvas de supervivencia según Kaplan-Meier

40 Se establecieron unas curvas de supervivencia en base a los valores de umbral óptimo determinados con la ayuda de las curvas ROC y del índice de Youden de sCD127 el D1-2 y el D3-4. Se ha generado también la curva de supervivencia después de la estratificación de los pacientes en base a la puntuación SAPSII (umbral igual a 53). Los resultados se representan en las **figuras 2A, 2B y 2C**.

45 Ya sea el D1-2 (**fig. 2A**) o D3-4 (**fig. 2B**), estos resultados muestran una diferencia significativa entre las dos curvas de supervivencia trazadas en función del umbral óptimo de sCD127 (D1-2 (**fig. 2A**): "Hazard ratio" = 10,22; [95% CI]: 3,36-31,13; p<0,001, Ensayo del "Log Rank"; D3-4 (**fig. 2B**): "Hazard ratio" = 28,50; [95%CI]: 7,519-108,0); p<0,001, Ensayo de "Log rank".

50 En cambio, después de la estratificación en base a la puntuación SAPSII, no se ha puesto en evidencia ninguna diferencia significativa de mortalidad (**fig. 2C**: p = 0,082, Ensayo del "Log Rank", "Hazard ratio" = 2,55, [95%CI]: 0,887-7,309).

55 Finalmente, se ha evaluado la capacidad predictiva sobre el riesgo de deceso de la combinación entre un valor aumentado de sCD127 y una puntuación SAPSII aumentada como se ha descrito anteriormente, después de la estratificación de los pacientes en base a los valores de umbral óptimo determinados con la ayuda de las curvas ROC y del índice de Youden de sCD127 el D1-2 y el D3-4 y del umbral óptimo de SAPSII (umbral igual a 53). Se

generaron también las curvas de supervivencia correspondientes, y los resultados se representan en las **figuras 3A y 3B** respectivamente.

5 Ya sea el D1-2 o D3-4, estos resultados muestran que los pacientes que tienen las concentraciones de sCD127 más bajas y la puntuación SAPSII más baja tienen una posibilidad de sobrevivir mucho mejor, comparado con los que presentan las concentraciones de sCD127 más altas y la puntuación SAPSII más alta:

D1-2 (**fig. 3A**): $p < 0,001$, Ensayo de *Log Rank*, *Hazard ratio* = 12,98; [95%CI]: 3,453-48,83.

D3-4 (**fig. 3B**): $p < 0,001$, Ensayo de *Log Rank*, *Hazard ratio* = 50,94; [95%CI]: 9,352-277,4).

10

Estos resultados demuestran que la medición combinada de sCD127 y de una por lo menos de las puntuaciones SAPSII o SOFA permite aumentar la fuerza predictiva frente a la mortalidad en los pacientes hospitalizados en reanimación.

15

En consecuencia, el conjunto de estos resultados demuestra que la medición de la expresión de sCD127 en el plasma es un marcador inmunológico muy útil y fiable para evaluar el riesgo de mortalidad de un paciente admitido en un servicio de reanimación, y en particular de un paciente en estado de choque séptico. Además, se podría combinar este parámetro con las puntuaciones clínicas habituales para mejorar la capacidad predictiva del riesgo de deceso de estas puntuaciones.

20

La invención no está limitada a los ejemplos descritos y representados ya que se le pueden aportar diversas modificaciones sin apartarse de su marco.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de evaluación del riesgo de mortalidad en un paciente que ha sufrido una agresión o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica, que comprende las etapas siguientes:
- 5
- medir la expresión de sCD127 en una muestra biológica procedente de dicho paciente, también denominada muestra a ensayar,
 - concluir que hay un riesgo incrementado de mortalidad después de la comparación de la expresión de sCD127 con respecto a un valor de referencia.
- 10
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la muestra biológica procede de un paciente que presenta una SEPSIS, en particular una SEPSIS severa.
- 15
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que la muestra biológica procede de un paciente en estado de choque séptico.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se concluye que hay un riesgo incrementado de mortalidad en dicho paciente cuando se pone en evidencia una sobreexpresión de sCD127 en la muestra a ensayar con respecto a un primer valor de referencia que corresponde a un valor medio del nivel de expresión de sCD127 que se mide en un grupo de muestras procedente de pacientes que han sufrido una agresión o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica o SIRS de los cuales se sabe que han sobrevivido.
- 20
5. Procedimiento según las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado por que el primer valor de referencia corresponde a un valor medio del nivel de expresión de sCD127 que se mide sobre un grupo de muestras que procede de pacientes en estado de choque séptico de los cuales se sabe que han sobrevivido.
- 25
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que la medición de la expresión de sCD127 en la muestra a ensayar y, llegado el caso, en la muestra biológica utilizada para obtener el primer valor de referencia se realiza en los 2 días o en el día después del choque séptico, o también 2 días o 1 día después del choque séptico.
- 30
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se concluye que hay un riesgo incrementado de mortalidad en dicho paciente, cuando la expresión de sCD127 que se mide en la muestra a ensayar no disminuye significativamente con respecto a un segundo valor de referencia que corresponde al nivel de expresión de sCD127 medido en una muestra biológica procedente del mismo dicho paciente en una extracción anterior.
- 35
8. Procedimiento según la reivindicación 3, o según la reivindicación 7, caracterizado por que la medición de la expresión de sCD127 en la muestra a ensayar se realiza aproximadamente o 4 días (D4) después del choque séptico, en particular aproximadamente 3 días o 3 días (D3) después del choque séptico, y de manera aún más preferida aproximadamente 2 días o 2 días (D2) después del choque séptico.
- 40
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3, 7 y 8, caracterizado por que la extracción anterior se efectúa dentro de 48 h, o a las 48 h, después del choque séptico y por lo menos 24 h antes de la de la muestra a ensayar.
- 45
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la medición de la expresión de sCD127 se combina con la estimación de una por lo menos de las puntuaciones de gravedad SOFA y/o SAPSII para evaluar el riesgo de mortalidad para dicho paciente.
- 50
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la expresión de sCD127 se mide con la ayuda de anticuerpos anti-sCD127, y en particular de anticuerpos monoclonales anti-sCD127.
- 55
12. Utilización de la medición, *in vitro* o *ex vivo*, de la expresión de sCD127 para evaluar el riesgo de mortalidad de un paciente que ha sufrido una agresión o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica.
- 60
13. Utilización según la reivindicación 12, caracterizada por que dicho paciente es un paciente en estado de choque séptico.
- 65
14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que la expresión de sCD127 se mide con la ayuda de anticuerpos anti-sCD127, preferentemente de anticuerpos monoclonales anti-sCD127.
15. Kit para la medición, *in vitro* o *ex vivo*, de la expresión de sCD127 en una muestra biológica, que comprende:

- unas herramientas o reactivos específicos que permiten medir la expresión de sCD127 en dicha muestra biológica, y
- 5 - una muestra control positivo que es una muestra calibrada para contener la cantidad de sCD127 que corresponde a la cantidad media medida en un grupo de muestras de pacientes que han sufrido una agresión o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica, de los cuales se sabe que han sobrevivido, y/o una muestra control negativo que es una muestra calibrada para contener la cantidad de sCD127 que corresponde a la cantidad media medida en un grupo de muestras de pacientes que ha
- 10 sufrido una agresión o una infección que genera una respuesta inflamatoria sistémica, de los cuales se sabe que no ha sobrevivido.

15 16. Kit según la reivindicación 15, caracterizado por que contiene unos anticuerpos anti-sCD127 como herramientas o reactivos específicos que permiten medir la expresión de sCD127 en dicha muestra biológica.

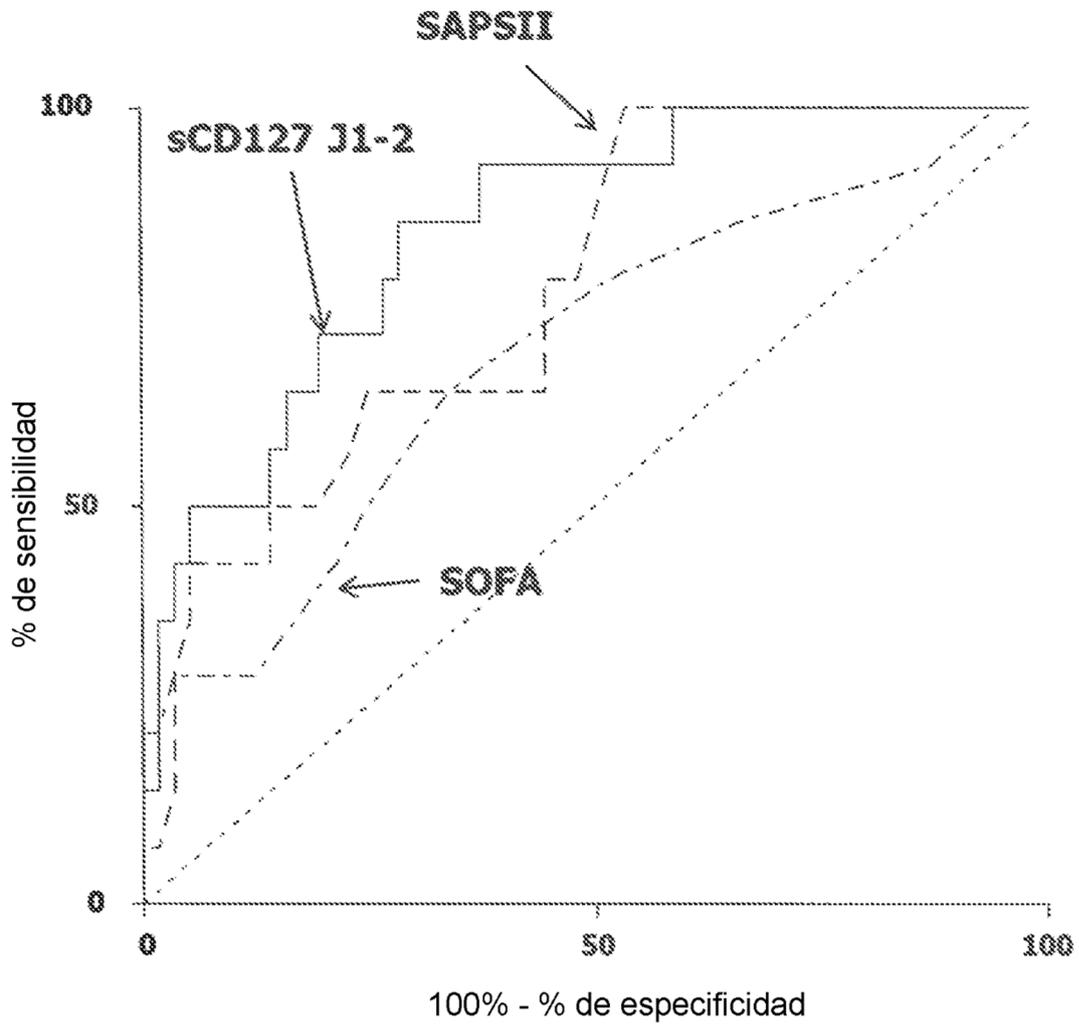


FIG. 1

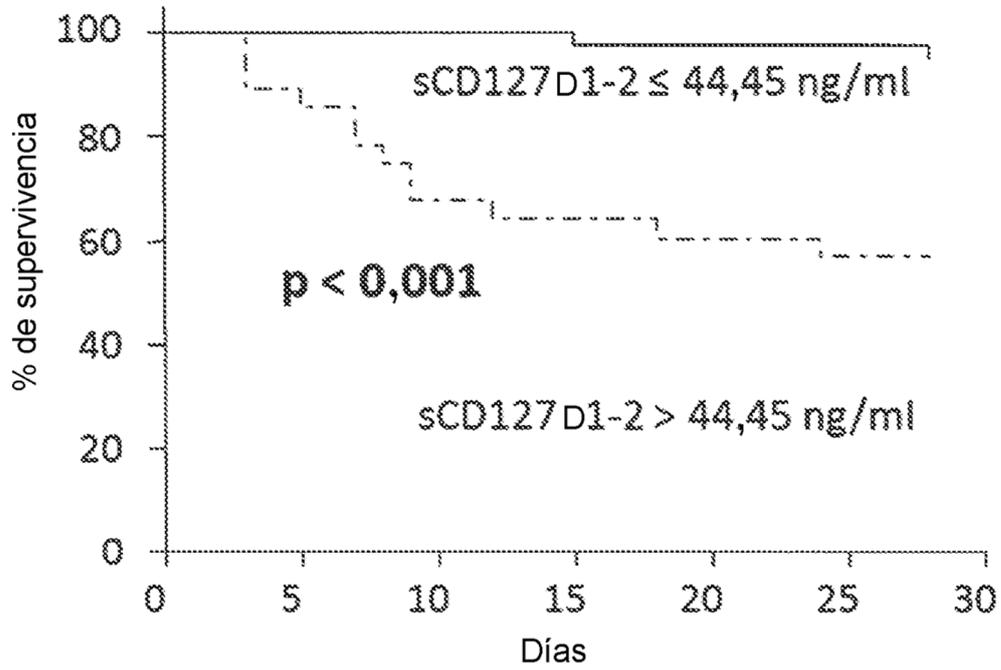


FIG. 2A

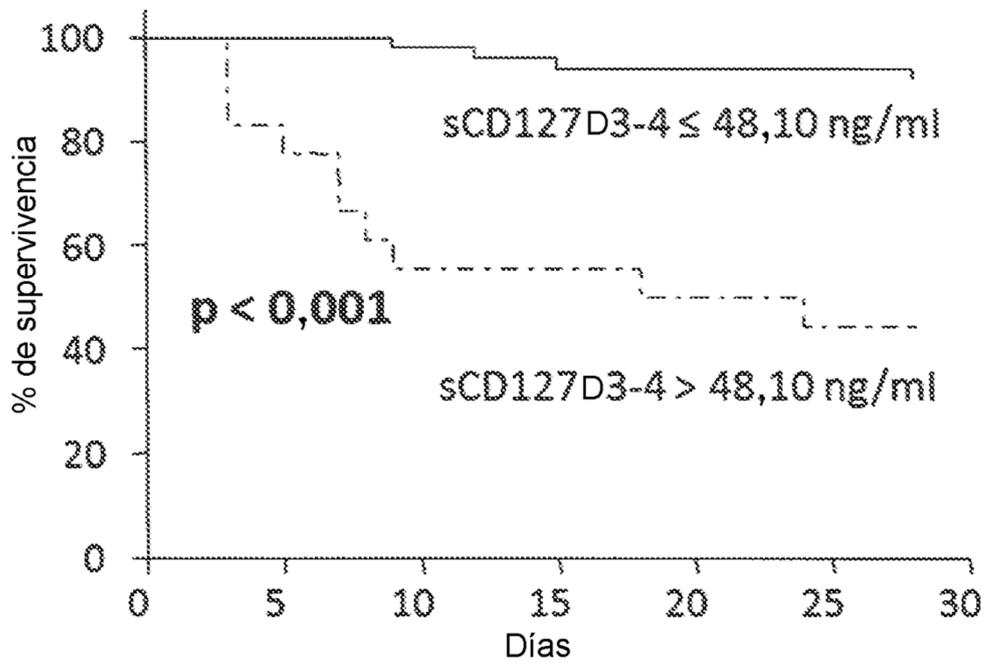


FIG. 2B

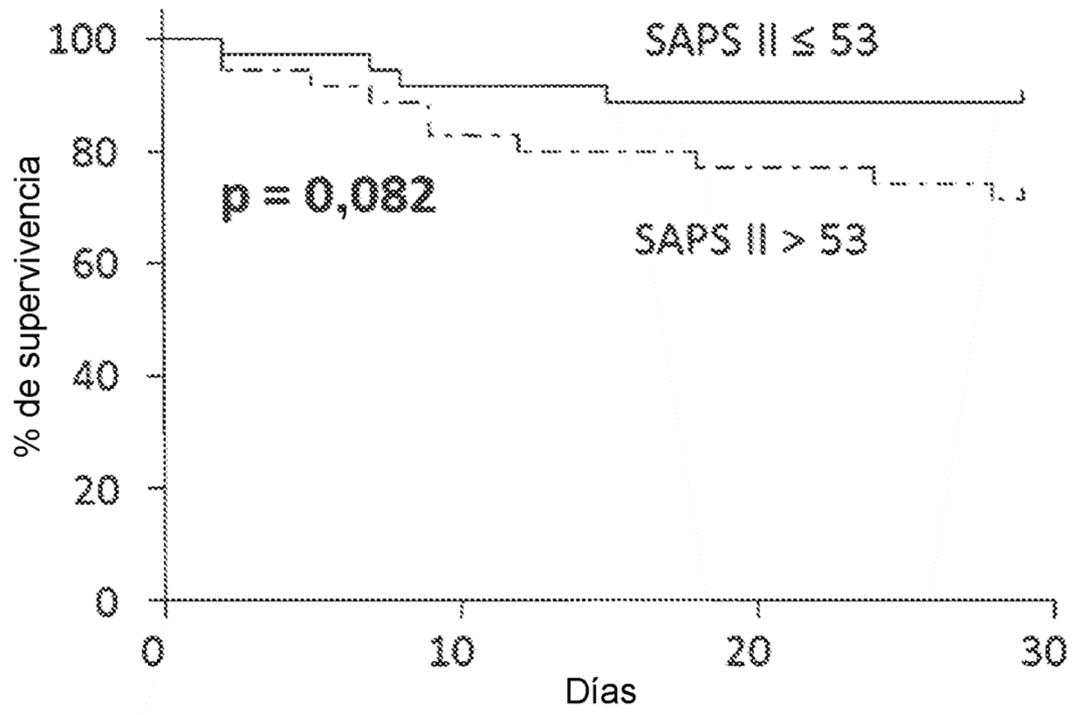


FIG. 2C

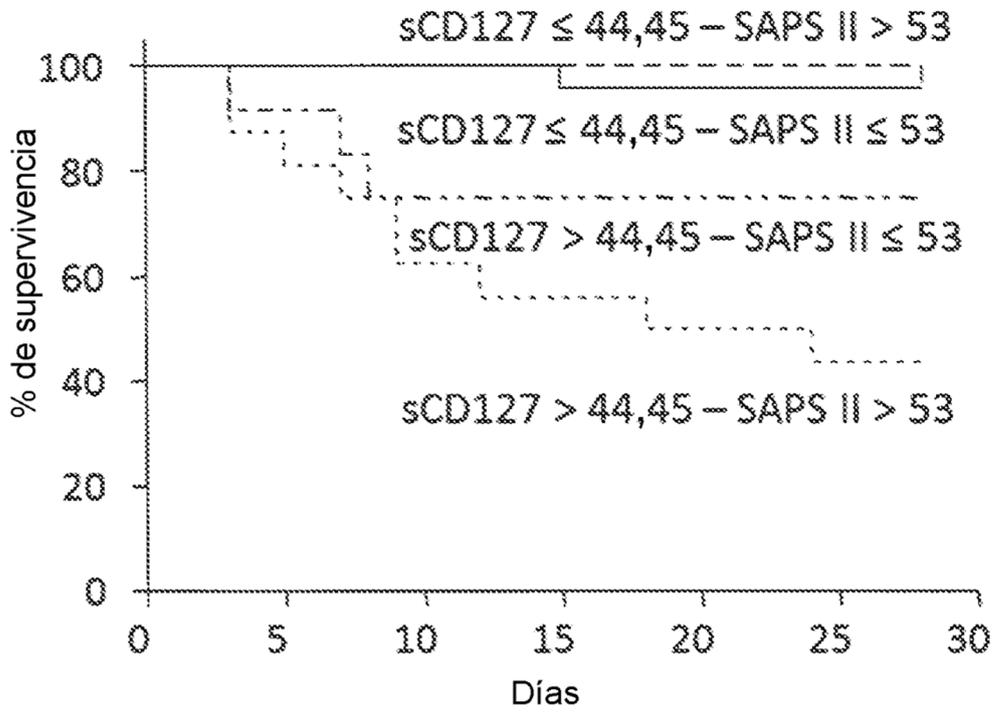


FIG. 3A

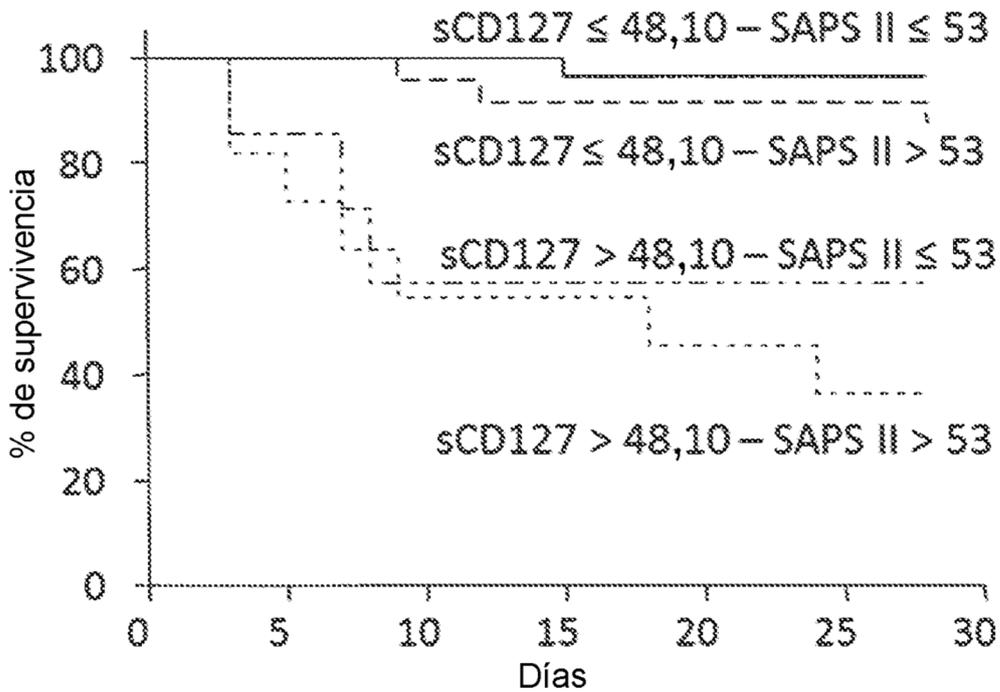


FIG. 3B