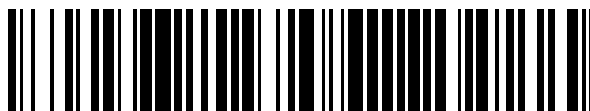


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 877**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2008 E 08801791 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **16.07.2014 EP 2185937**

54

Título: **Procedimiento para ensayar la septicemia en seres humanos**

30

Prioridad:

07.09.2007 EP 07017539

45

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

20.10.2014

73

Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)
PROTEKTORAT FORSCHUNG RÄMISTRASSE 71
8006 ZÜRICH, CH**

72

Inventor/es:

**GRAF, ROLF;
BIMMLER, DANIEL y
KEEL, MARIUS**

74

Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para ensayar la septicemia en seres humanos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de predicción y/o diagnóstico de una infección sistémica en un ser humano, en particular para la predicción del desarrollo de septicemia, basado en el nivel de litostatina/proteína regeneradora (*pancreatic stone protein / regenerating protein (PSP/reg)*) en fluidos corporales, y a un kit de ensayo.

10

Antecedentes de la invención

Las respuestas sistémicas ante traumatismos graves incluyen varios parámetros que afectan a la inmunidad innata, reacciones inflamatorias y actividades celulares. Las pacientes con traumatismos graves pueden tener una
 15 resolución benigna sin infección, mientras que otros padecen infecciones o septicemias. La septicemia está asociada con un fallo orgánico múltiple y una elevada mortalidad. Entre los marcadores usados más habitualmente para el diagnóstico de la septicemia están los recuentos leucocitarios, la proteína C reactiva y la procalcitonina. Las últimas son dos proteínas altamente inducidas tras un traumatismo, aún sin ninguna función conocida. Además, se emplean citocinas tales como IL-6, IL-8 e IL-18 para monitorizar pacientes. Sin embargo, ninguno de los marcadores
 20 mencionados anteriormente sirve como indicador predictivo de infecciones, incluyendo septicemia, por lo que el tratamiento puede rezagarse con respecto al comienzo de la septicemia.

En experimentos piloto con animales se ha demostrado que se induce una proteína pancreática debido al estrés de manipulación, incluso en ausencia de lesión en el tejido pancreático (R. Graf y col., J Surg Res 2002, 195: 136-144).
 25 Esta proteína, la litostatina/proteína regeneradora (PSP/reg), pertenece a una familia de proteínas de unión a lectina. En condiciones de pancreatitis aguda o crónica, está muy regulada por incremento y puede aparecer en suero. Dado que la regulación de esta proteína no está puramente restringida a la secreción inducida por la dieta como otros cimógenos, puede aparecer elevada en otras dolencias, por ejemplo, durante la pancreatitis. Hasta ahora, la proteína se ha estudiado predominantemente en el páncreas. También se sintetiza en las células de Paneth del
 30 intestino delgado y en las células fúndicas del estómago. La función de la PSP/reg aún es muy debatida, pero generalmente se asume que está implicada en promover la proliferación celular durante procesos regenerativos (Y. Kinoshita y col., J, Gastroenterol 2004, 39: 507-513).

Se han realizado numerosos esfuerzos para establecer la PSP/reg como un marcador de enfermedad. Hasta ahora,
 35 no ha sido posible establecer una correlación entre los valores séricos y una entidad patológica específica, dado que los niveles séricos están elevados en diversas enfermedades gastrointestinales (Y. Satomura y col., J Gastroenterol 1995, 30: 643-650).

Resumen de la invención

40

La presente invención se refiere a un procedimiento de predicción y/o diagnóstico de una infección sistémica en seres humanos, en particular para la predicción del desarrollo de septicemia, en el que se determina el nivel de litostatina/proteína regeneradora (PSP/reg) en una muestra de fluidos corporales, y un nivel alto es indicativo del desarrollo de septicemia en etapas tempranas la enfermedad. Además, la presente invención se refiere a un
 45 procedimiento de determinación de los niveles de PSP/reg en fluidos corporales, y a un kit de partes para dicho procedimiento.

Breve descripción de las Figuras

50 *Figura 1: determinación de los valores de la proteína C reactiva (C-reactive protein, CRP) en el suero de pacientes tras la admisión en el hospital con un traumatismo grave.*

Los pacientes se categorizaron retrospectivamente: sin infección (recuadros blancos, n = 14), pacientes con infección (recuadros rayados, n = 22), pacientes con septicemia (recuadros negros, n = 27). Los valores de la CRP (\log_{10} ng/mL) de los tres grupos están representados como diagramas en recuadros con la media y el intervalo de
 55 confianza al 95%. d = días después del traumatismo. El análisis estadístico se realizó usando un análisis multivariado; p = significación, * = valores de p para septicemia frente a ninguna infección.

Figura 2: determinación de los valores de IL-6 en el suero de pacientes tras la admisión en el hospital con un traumatismo grave.

Categorización de pacientes y presentación de los valores de IL-6 (\log_{10} pg/mL) en un diagrama de recuadros como para los valores de CRP de la Figura 1.

Figura 3: determinación de procalcitonina (PCT) en el suero de pacientes tras la admisión en el hospital con un traumatismo grave.

Categorización de pacientes y presentación de los valores de PCT (\log_{10} ng/mL) en un diagrama en recuadros como para los valores de CRP de la Figura 1.

Figura 4: determinación de litostatina/proteína regeneradora (PSP)

10 Perfil temporal de PSP/reg tras un traumatismo en el día 0. Todos los valores se combinaron para cada punto temporal. C (= control) indica el valor para sujetos sanos. d = días después del traumatismo.

Figura 5: determinación de los valores de PSP/reg en el suero de pacientes tras la admisión en el hospital con un traumatismo grave.

15 Figura 5A: categorización de pacientes y media de los recuadros blancos, rayados y negros como para los valores de CRP de la Figura 1. Los valores de PSP/reg (ng/mL) de los tres grupos están representados como la media \pm SEM. d = días después del traumatismo

Figura 5B: categorización de pacientes y presentación de los valores de PSP/reg (ng/mL) en un diagrama en recuadros como para los valores de CRP de la Figura 1. p = significación, * = valores de p para septicemia frente a ninguna infección.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de predicción y/o diagnóstico de una infección sistémica en seres humanos, en particular para la predicción del desarrollo de septicemia, en el que se determina el nivel de litostatina/proteína regeneradora (PSP/reg) en una muestra de fluidos corporales, por ejemplo, suero, y un nivel alto es indicativo del desarrollo de septicemia en etapas tempranas la enfermedad.

20 Otros fluidos corporales distintos al suero, útiles para la determinación de los niveles de PSP/reg son, por ejemplo, sangre completa, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, fluido lagrimal, sudor, leche o extractos de tejidos sólidos o de materia fecal.

El nivel de PSP/reg indicativo del desarrollo de septicemia postraumática depende del fluido corporal elegido para la determinación. Para el suero sanguíneo, este nivel es de 60 a 80 ng/ml en los días 3, 4 ó 5. Por lo tanto, más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento de predicción y/o diagnóstico del desarrollo de septicemia, en el que se determina el nivel de litostatina/proteína regeneradora (PSP/reg) en suero, y un nivel de 60 ng/ml o más, en particular un nivel de 80 ng/ml o más, en los días 3, 4 ó 5 es indicativo del desarrollo de septicemia.

Puede usarse cualquier procedimiento conocido para la determinación del nivel de PSP/reg en fluidos corporales. Algunos procedimientos considerados son, por ejemplo, ELISA, RIA, EIA, espectrometría de masas o análisis por micromatriz. Dichos procedimientos, cuando se usan para el diagnóstico de una infección sistémica, por ejemplo, septicemia, son un objeto adicional de la invención.

Un procedimiento preferido para la determinación de PSP/reg en fluidos corporales humanos, por ejemplo, suero, es un ELISA. En una forma de realización de la invención, el ELISA de PSP/reg consiste en una matriz en *sándwich*: se recubre una placa de microtitulación convencional con un tipo de anticuerpo ("primer" anticuerpo), por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cobaya, dirigido contra la PSP/reg. Entonces las placas se bloquean y se carga la muestra o el estándar. Después de la incubación se aplica un tipo diferente de anticuerpo ("segundo" anticuerpo) contra la PSP/reg, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de conejo. Entonces se añade un tercer anticuerpo que detecta el tipo particular del "segundo" anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-conejo, conjugado con un marcador adecuado, por ejemplo, una enzima para su detección cromogénica. Finalmente la placa se desarrolla con un sustrato para el marcador, con objeto de detectar y cuantificar el marcador, siendo una medida de la presencia y la cantidad de PSP/reg. Si el marcador es una enzima para su detección cromogénica, el sustrato es un sustrato generador de color de la enzima conjugada. Entonces se detecta el color de la reacción en un lector de microplacas y se compara con los estándares.

Los pares de anticuerpos adecuados ("primer" y "segundo" anticuerpo) son cualquier combinación de cobaya, rata, ratón, conejo, cabra, gallina, burro o caballo. Se prefieren los anticuerpos policlonales, pero también es posible usar anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos. Los marcadores adecuados son marcadores cromogénicos,

es decir, enzimas que pueden usarse para convertir un sustrato en un compuesto coloreado o fluorescente detectable, marcadores espectroscópicos, por ejemplo, marcadores fluorescentes o marcadores que presentan un color visible, marcadores de afinidad que pueden desarrollarse mediante un compuesto específico para el marcador y que permiten una fácil detección y cuantificación, o cualquier otro marcador usado en un ELISA estándar.

- 5 Otros procedimientos preferidos para la detección de la PSP/reg son radioinmunoensayo o inmunoensayo competitivo usando un único anticuerpo y una detección por quimioluminiscencia en robots analíticos automatizados comerciales. También puede usarse fluorescencia de micropartículas mejorada, metodologías de fluorescencia polarizada o espectrometría de masas. Los dispositivos de detección, por ejemplo, micromatrices, son componentes
10 útiles como sistemas de lectura para la PSP/reg.

Un kit de partes para la determinación de la PSP/reg para el diagnóstico/predicción de infecciones sistémicas comprende, por ejemplo, aparatos, reactivos y disoluciones estándar de PSP/reg. Los aparatos considerados son, por ejemplo, placas de microtitulación para ELISA, placas de ELISA prerrecubiertas y cubreplacas. Los reactivos son
15 aquellos reactivos particularmente desarrollados y diseñados para la detección de PSP/reg. Las disoluciones estándar de PSP/reg contienen preferiblemente PSP/reg sintetizada según las instrucciones dadas a continuación. El kit de partes puede contener adicionalmente elementos tales como pipetas, disoluciones tales como tampones, disoluciones de bloqueo y similares, filtros, tablas de colores e instrucciones de uso.

- 20 La PSP/reg es una proteína que se expresa en el páncreas y en el intestino. Puede clonarse a partir de ARNm pancreático y subclonarse en un vector de expresión de levadura. La proteína puede ser entonces expresada bajo el control de la ADH. Un medio de expresión adecuado puede comprender metanol para inducir y mantener la secreción de la PSP/reg. La PSP/reg se purifica preferiblemente usando SP-Sefarosa-celulosa mediante un gradiente salino y de pH. Dicha PSP/reg purificada se usa para preparar disoluciones estándar para su comparación
25 con los niveles de PSP/reg en fluidos corporales. Los anticuerpos policlonales contra la proteína pueden obtenerse a partir de ratones, ratas, conejos, cabras, gallinas, burros, caballos y cobayas u otros animales adecuados usando procedimientos estándar.

La razón del incremento de la PSP/reg en el suero sanguíneo durante las etapas tempranas del desarrollo de septicemia no es totalmente clara. En experimentos piloto con ratas, se observó un incremento en la síntesis de PSP/reg en ausencia de lesiones pancreáticas, y había pruebas de que lesiones traumáticas significativas en otros
30 órganos dan lugar a un incremento en los niveles sanguíneos de PSP/reg. Para estudios adicionales se eligió un conjunto de pacientes humanos con traumatismos graves pero una aparente ausencia de lesiones pancreáticas (véanse los Ejemplos). La aparición de PSP/reg en suero sanguíneo implicaría una vía alterada, desviando la proteína desde el líquido pancreático hacia la sangre. También se ha demostrado que miembros de la familia de unión a lectina (por ejemplo, la proteína asociada a pancreatitis) son inducibles mediante citocinas. Hay una acción fuerte y conjunta de las citocinas tras un traumatismo. La complejidad de la respuesta de la citocina, cuando se libera en muchas direcciones diferentes, no se comprende. Por lo tanto, es probable que la PSP/reg reaccione ante
35 las citocinas que se han liberado en condiciones de estrés sistémico o traumatismo. Por el contrario, otras enzimas pancreáticas, por ejemplo, amilasa y lipasa, no parecen estar reguladas por las citocinas, siendo su aparición en sangre únicamente el resultado de un desvío. Ahora se ha demostrado que el nivel de PSP/reg en suero sanguíneo es un indicador fiable de septicemia. El incremento de la PSP/reg en la sangre podría implicar una respuesta específica al estrés.

- 45 Se ha demostrado que, al contrario que otros indicadores de la inflamación, el nivel de PSP/reg está muy aumentado en pacientes durante o antes de que sean apreciables los signos clínicos de septicemia. La detección y la cuantificación de la PSP/reg sérica se consigue mediante, por ejemplo, un ELISA en *sándwich* con un límite de detección de menos de 100 pg/ml. Los valores séricos normales están entre 5 y 15 ng/ml. Los pacientes con un traumatismo grave desarrollan septicemia entre el día 7 y 10 después del accidente causante del traumatismo. Los
50 valores séricos se correlacionan con la gravedad de la septicemia. Pueden superar los 200 ng/ml. Antes de que aparezcan los signos clínicos de septicemia, los valores PSP/reg comienzan a aumentar en el día 3 hasta el día 5, y alcanzan valores por encima de 60-80 ng/ml. Estos valores permiten predecir si un paciente desarrollará septicemia, y por lo tanto, la necesidad de un tratamiento intensivo, incluyendo un costoso tratamiento antibiótico y una estancia en la unidad de cuidados intensivos. En comparación con los ensayos diagnósticos disponibles comercialmente, el
55 ELISA de PSP/reg es significativamente mejor para monitorizar posibles pacientes sépticos.

Ejemplos

Aislamiento y subclonación de PSP/reg

Con objeto de obtener ADNc para la producción de los anticuerpos específicos de PSP/reg, se prepara dicho ADNc mediante transcripción inversa del ARNm pancreático usando procedimientos de laboratorio del estado de la técnica. Se realiza una reacción de PCR usando cebadores específicos para la secuencia codificante del ADNc de la PSP/reg. Entonces se repite la reacción de PCR con el cebador de alargamiento para añadir una secuencia
 5 específica para la inserción en el vector de transfección *Pichia pastoris*. El cebador está diseñado para fusionar la región codificante del péptido de señalización del factor de apareamiento alfa con un sitio KEX2 y la región codificante de la PSP/reg humana madura. La subclonación en el vector *Pichia pastoris* es un procedimiento en dos etapas. En primer lugar se liga el producto de la PCR en el vector pCR2.1 (Invitrogen, TAcloning) y se verifica la secuencia. Entonces se escinde el producto de la PCR mediante una digestión de restricción con XhoI/NotI y se liga
 10 en el vector de transferencia pPIC9 (Invitrogen). Se transforma la cepa de *Pichia pastoris* KM71 (Invitrogen), y se selecciona el clon más productivo para la expansión y producción de la proteína recombinante.

Cebadores usados para la amplificación y subclonación por PCR

- 15 PSP/reg1 alfa humana
 Cebadores directos
 5' GAAAAGACAAGAGGCCAGACAGAGTT 3' (ID. SEC. N°: 1)
 5' GTATCTCTCGAGAAAAGACAAGAGGCCAGAGA 3' (alargamiento) (ID. SEC. N°: 2)
 Inverso
 20 5' CTAGTTTTTGAAGTTCATAC 3' (ID. SEC. N°: 3)
 PSP/reg1 beta humana
 Cebadores directos
 5' GAAAAGACAGGAGTCCCAGACAGAGCTG 3' (ID. SEC. N°: 4)
 5' GTATCTCTCGAGAAAAGACAGGA6TCCASAC 3* (alargamiento) (ID. SEC. N°: 5)
 25 Cebador Inverso
 5' ATCTGCAGTCTAGAATTCTGCAGGACCAGTTCTAGAC 3' (ID. SEC. N°: 6)

Expresión de la proteína a gran escala

- 30 Usando una única colonia se inoculan 25 ml de BMG (glicerol mínimo tamponado (*buffered minimal glycerol*), fosfato potásico 100 mM a pH 6,0, 1,34% de base nitrogenada de levadura, 4×10^{-5} % de biotina, 1% de glicerol) en un matraz con placa deflectora de 250 ml y se hace crecer a 29°C en un estufa de incubación con agitación (300 rpm) hasta el día siguiente. Se usan 10 ml de este cultivo para inocular 1 litro de BMG en un matraz con placa deflectora de 3 litros y se hace crecer a 29°C (300 rpm) hasta el día siguiente. Las células se recogen mediante centrifugación
 35 a 1.500-3.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. La expresión se induce resuspendiendo las células en 1/5 de volumen (200 ml) de BMM (metanol mínimo tamponado (*buffered minimum methanol*), BMG en el que el glicerol es sustituido por un 0,5% de metanol) en el mismo matraz con placa deflectora. Se añade un 100% de metanol para conseguir la concentración del 0,5% (1 ml) cada 24 h hasta que se alcanza el tiempo de inducción óptimo. Las células se recogen mediante centrifugación a 1.500-3.000 x g a temperatura ambiente. El medio
 40 sobrenadante se recoge y se congela hasta la purificación del péptido.

El polipéptido se purifica a partir de los sobrenadantes del medio. Los sobrenadantes del medio se diluyen 1:3 con agua destilada. El pH se ajusta a pH 3,5 con HCl. Entonces el sobrenadante del medio se aplica a una columna de SP-Sefarosa y se eluye mediante un gradiente salino y de pH (LiCl 10 mM, MES 50 mM, tampón de inicio a pH 5,3,
 45 LiCl 2 M, MES 50 mM, tampón de finalización a pH 6,3). Las fracciones se recogen y se analizan mediante electroforesis SDS-gel. Se combinan las fracciones con el contenido mayor y más puro de proteína y se dializan frente a HEPES 10 mM a pH 7,5. La secuencia del polipéptido se verifica mediante secuenciación N-terminal y la concentración se calcula mediante el análisis de aminoácidos.

50 *ELISA de PSP/reg*

- Con objeto de determinar la PSP/reg total, puede usarse un ELISA en *sándwich* sobre la base de un antisuero de cobaya dirigido contra la PSP/reg humana recombinante y un antisuero de conejo contra la misma proteína. Para mejorar la especificidad y la sensibilidad del anticuerpo de conejo, se purifican IgGs mediante absorción en una columna de perlas de proteína A (HiTrap®, Pharmacia): se equilibra una columna HiTrap® con 200 mM
 55 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ a pH 7. Se ajusta el pH del antisuero de conejo con la misma disolución tampón (concentración final de 20 mM) y después se carga en la columna, que a continuación se lava consecutivamente con Tris/HCl 100 mM y 10 mM a pH 8. La fracción de IgG se eluye con ácido cítrico 0,1 M a pH 3. Las fracciones eluidas se neutralizan inmediatamente con Tris/HCl 1 M a pH 8,9.

- Se recubren placas del microtitulación de 96 pocillos (placas Costar EIA, de fondo redondo y alta unión) hasta el día siguiente a 4°C con la fracción de IgG de cobaya anti-PSP/reg de rata, diluida a 1:500 en TBS (100 µl/pocillo). Después de una etapa de lavado, la placa se bloquea con 150 µl de BSA al 1%/TBS durante una hora, que a continuación es sustituido por 100 µl de diferentes concentraciones de estándar PSP/reg humana recombinante (0, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,5, 3,5 ó 5,0 ng/ml) o muestras de 100 µl de muestra diluida. Las muestras y los estándares se cargan por duplicado y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente. Después de repetir el lavado, la placa se incuba durante 1 h con 100 µl de IgG de conejo anti-PSP/reg de rata diluida a 1:500. Sigue otra etapa de lavado antes de comenzar con una incubación de 30 min con 100 µl de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG de conejo disponible comercialmente (conjugado de fosfatasa alcalina de ratón anti-conejo, fracción IgG, diluida 1:1.000; adquirida en Sigma). Entonces la placa se lava de nuevo y se añade un sustrato de fosfatasa soluble, p-nitrofenil fosfato disódico (comprimidos Sigma 104®), añadido en tampón de fosfatasa alcalina (Tris/HCl 100 mM a pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 0,8 mM). Después de un periodo de incubación de aproximadamente 20 min se mide la densidad óptica (DO) a 405 nm con un lector de microplacas MRX (Dynatech Laboratories),
- 15 Todas las diluciones (excepto los anticuerpos de recubrimiento) se preparan en 1% de BSA/TBS. Todas las incubaciones a temperatura ambiente se llevan a cabo en un agitador rotacional de placas ELISA (Titramax 100, Heidolph, Bioblock Scientific). Todas las etapas de lavado se realizan con TBS/Tween 20 (0,05%, v/v), usando un lavador automático de placas de microtitulación (MRW, Dynatech Laboratories). Las tasas de recuperación de la PSP/reg recombinante en suero diluido a partir de un voluntario sano son como sigue: 71% a una dilución de 1:10; 118% a 1:20 y 95% a 1:40. La variación intraplaca e interplaca es menor del 5% y el 10%, respectivamente, para concentraciones en el intervalo del estándar (entre 0,1 y 3,5 ng/ml).

La prueba se establece con PSP/reg 1 alfa humana recombinante. La PSP/reg1 beta recombinante, la segunda isoforma, se realizó usando la misma técnica. La PSP/reg 1 beta es reconocida igualmente bien por el ELISA. Por lo tanto, el ELISA es específico para la familia de proteínas PSP/reg conocida.

Pacientes de prueba para la prueba de concepto

La población del estudio incluía 63 pacientes lesionados que fueron admitidos en la División de Cirugía Traumatológica (centro traumatológico de nivel I), Hospital Universitario de Zúrich, en un periodo de tiempo desde enero de 2002 hasta septiembre de 2003. Los criterios de inclusión fueron una puntuación de gravedad de la lesión (*injury severity score*, ISS) > 16 puntos, edad del paciente > 16 años, menos de cuatro horas entre el accidente y la admisión en el hospital y vigilancia en la unidad de cuidados intensivos (UCI) con una supervivencia de más de cinco días. Se excluyeron los pacientes con una lesión pancreática. Todos los pacientes se trataron según las directrices del apoyo vital traumático avanzado (*advanced trauma life support*, ATLS) y un protocolo traumático estándar. En resumen, después de controlar las vías respiratorias, ventilación y monitorización de las funciones cardiovasculares, se llevaron a cabo procedimientos para salvar vidas que incluían descompresión de las cavidades corporales, control de hemorragias y contaminación. A continuación se realizó un desbridamiento radical de heridas, descompresión de compartimentos y estabilización primaria de las fracturas principales, principalmente a través de fijación externa ("cirugía del día uno"). A continuación los pacientes se transfirieron a la UCI para la recuperación de las funciones orgánicas. A destacar, todos los pacientes recibieron nutrición enteral en las 24 horas después del traumatismo para mantener normales la flora intestinal y la mucosa intestinal. Se usaron antibióticos cuando se verificaba un foco séptico mediante un cultivo bacteriano positivo. Además, en las fracturas abiertas se aplicaron antibióticos estándar durante cinco días y se administró una única dosis de cefalosporina como profilaxis para la osteosíntesis de fracturas.

La Tabla 1 resume los datos demográficos y las puntuaciones de lesiones en el día de admisión. La gravedad de la lesión y la distribución por géneros fueron muy similares.

Tabla 1. Datos demográficos de los pacientes incluidos

Parámetro	Sin infección	Infección	Septicemia
Numero	14	22	27
Edad (años)	38,6 ± 16,9	36,6 ± 15,5	37,3 ± 16,0
Masculinos	11 (78,6%)	15 (68,2%)	22 (81,5%)
ISS ^a (puntos)	34,6 ± 9,3	32,2 ± 13,9	38,7 ± 15,6
GCS ^b (puntos)	8,9 ± 5,2	9,2 ± 4,9	8,8 ± 5,1
APACHE II ^c (puntos)	15,0 ± 6,2	13,6 ± 6,6	17,0 ± 6,8
UCI ^d (días)	9,1 ± 5,9	16,3 ± 8,2	26,6 ± 9,9

Media \pm DT. Los valores entre paréntesis son porcentajes.

^aISS, puntuación de gravedad de la lesión

^bGCS, escala de coma de Glasgow (*Glasgow coma scale*)

^cAPACHE II, II evaluación de fisiología aguda y salud crónica

^dUCI, unidad de cuidados intensivos.

Estado sanguíneo de los pacientes traumatológicos

- 10 Los pacientes se asignan retrospectivamente a grupos dependiendo de su puntuación: a) sin infección, b) infección y c) septicemia (Tabla 2). Para demostrar la evolución de los diversos parámetros usados para determinar el grado de inflamación y lesión, se determinaron los recuentos leucocitarios sanguíneos y la proteína C reactiva. Todos los pacientes mostraron una importante reducción en los leucocitos sanguíneos en el día uno de hospitalización, independientemente del grupo de gravedad. Los leucocitos aumentaron gradualmente hasta la normalidad con la
- 15 excepción de los pacientes sépticos, que alcanzaron un recuento leucocitario significativamente mayor de $18 \times 10^6/L$ en el día 10. La determinación concomitante de la proteína C reactiva (CRP) indica un incremento gradual desde los bajos niveles de admisión hasta aproximadamente 150 ng/ml en el día tres en todos los grupos (Figura 1). Aunque el grupo no infectado tiene unos coherentes menores niveles que los otros grupos, no hay ningún patrón obvio que distinga a los tres grupos de pacientes. Por lo tanto, entre el día 5 y el día 7, y entre el día 14 y el 21, los pacientes
- 20 sépticos mostraron una mayor CRP que los pacientes no sépticos, siendo la diferencia menor de un factor de dos.

Tabla 2. Patrón de lesiones y evolución postraumática de los pacientes incluidos

Parámetro	Sin infección (n = 14)	Infección (n = 22)	Septicemia (n = 27)
Cabeza (AIS ^a , puntos)	85,7% (3,4)	86,4% (3,7)	70,4% (4,1)
Tórax (AIS ^a , puntos)	78,6% (3,0)	36,4% (3,3)	63,0% (3,5)
Abdomen (AIS ^a , puntos)	50,0% (3,7)	36,4% (3,8)	44,4% (4,1)
Extremidades (AIS ^a , puntos)	57,1% (3,0)	68,2% (2,3)	63,0% (2,5)
Pelvis (AIS ^a , puntos)	21,4% (3,0)	22,7% (2,6)	18,5% (2,8)
Médula (AIS ^a , puntos)	42,9% (2,8)	36,4% (2,5)	25,9% (2,9)
Sin SIRS ^b	2 (14,3%)	-	-
SIRS 2 ^b	5 (35,7%)	2 (9,1%)	-
SIRS 3/4 ^b	7 (50,0%)	20 (90,9%)	-
Septicemia	-	-	27 (100%)
Mortalidad	2 (14,3%)	2 (9,1%)	5 (18,5%)

25 ^aAIS, escala de lesiones abreviada (*abbreviated injury scale*)

^bSIRS, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (*systemic inflammatory response syndrome*)

Determinación de indicadores de inflamación estándar en pacientes traumáticos

- Para determinar si los indicadores de inflamación usados habitualmente, por ejemplo, IL-6 (Figura 2) y procalcitonina (PCT, Figura 3), podían distinguir entre los tres grupos de gravedad, se midieron los niveles sanguíneos de estas proteínas a lo largo de toda la estancia en el hospital. La IL-6 aumentó inmediatamente postraumáticamente, alcanzando los niveles más altos en el día 1. Durante los dos primeros días, los tres grupos de gravedad son diferentes, siendo el grupo séptico (1.200 pg/ml) y el grupo infectado (600 pg/ml) mayores que el grupo no infectado. Las estadísticas no indican significación debido a la alta variabilidad de los datos, mientras que en el día 5-10 había
- 30 una diferencia. Aunque hay un ligero aumento durante el tiempo de septicemia (350 pg/ml), estos niveles son bajos en comparación con el primer día de hospitalización.
- 35

La PCT estaba claramente aumentada en 20 veces en el grupo de pacientes sépticos antes y durante la septicemia, mientras que los otros permanecían en unos niveles alrededor de 0,5-2 ng/ml (Figura 3). El aumento máximo en la

40 PCT era de 25 veces frente a los sujetos sanos. Las estadísticas no indican diferencias significativas debido a la alta variación en la muestra.

La PSP/reg se regula postraumáticamente por incremento

- La PSP/reg se sintetiza predominantemente en el páncreas y en el intestino. En respuesta a una lesión tisular local
- 45 está muy regulada por incremento. En ausencia de una lesión tisular pancreática, no se espera que la PSP/reg esté regulada por incremento. Sin embargo, un politraumatismo causa una liberación de citocinas que puede afectar a la

expresión y secreción de la PSP/reg. Por lo tanto, se comprobó si estas proteínas estaban aumentadas en pacientes con un traumatismo grave que no tenían lesión pancreática. Los datos combinados de todos los pacientes después de un politraumatismo indican un aumento en el día cero que se hace significativo en el día tres, en comparación con el día cero, así como en comparación con sujetos sanos (Figura 4).

5

Por lo tanto, la litostatina está levemente aumentada tras un politraumatismo. Los datos se analizaron entonces usando una estratificación asignada a pacientes sin infección, pacientes con infección y pacientes con septicemia. Los valores de PSP/reg en pacientes con infección están ligeramente aumentados, con un pico en el día 7-10 (Figuras 5A, 5B). En los pacientes con politraumatismo que muestran infección, hay un aumento adicional.

10 Finalmente, los pacientes politraumáticos con septicemia muestran un gran aumento en la PSP/reg sérica.

El aumento comienza varios días antes de que se cumplan los criterios clínicos de septicemia. La PSP/reg se correlaciona altamente con septicemia. En el día 3, cuando los pacientes todavía no están sépticos, el nivel medio de PSP en sangre aumenta significativamente por encima de 100 ng/ml y alcanza aproximadamente 20 veces

15 durante el tiempo de septicemia (Figuras 5A, 5B, día 5-10).

El temprano aumento de la PSP/reg en pacientes con septicemia puede usarse por lo tanto como un marcador sérico para predecir la septicemia. Por lo tanto, se resumen la especificidad, los valores predictivos positivos y los negativos para tres potenciales valores de corte, por ejemplo, 30, 60 y 80 ng/ml en el día 3 y 5. La especificidad es de alrededor del 80 por ciento para valores de corte de 60 y 80 ng/ml. Los anteriores valores predictivos positivos y negativos también están entre el 60 y el 80%, indicando que los pacientes pueden ser identificados tempranamente mediante este procedimiento.

20

Tabla 3. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos para tres puntos de corte de los niveles séricos de PSP para pacientes con septicemia en comparación con pacientes sin complicaciones infecciosas o infecciones locales. Se compararon los dos grupos sin infección con el grupo séptico. El grupo infeccioso no está incluido.

25

Día 3	30 ng/mL	60 ng/mL	80 ng/mL
Sensibilidad (%)	70,4	55,5	40,7
Especificidad (%)	72,2	83,3	83,3
Valor predictivo positivo (%)	65,5	71,4	64,7
Valor predictivo negativo (%)	76,5	71,4	65,2
Día 5	30 ng/mL	60 ng/mL	80 ng/mL
Sensibilidad (%)	74,1	63,0	51,9
Especificidad (%)	66,7	75,0	77,7
Valor predictivo positivo (%)	62,5	65,4	63,6
Valor predictivo negativo (%)	77,4	73,0	68,3

30 El análisis se basa en los valores séricos de PSP obtenidos en el día 3 o el día 5 después de un traumatismo.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zúrich

35 <120> Procedimiento para ensayar la septicemia en seres humanos

<130> PSP

<160> 6

40

<170> PatentIn Versión 3.3

<210> 1

<211> 27

45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

	<223> Cebador directo para PSP/reg 1 alfa	
	<400> 1	
5	gaaaagacaa gagggcccaga cagagtt	27
	<210> 2	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador de alargamiento para PSP/reg 1 alfa	
	<400> 2	
15	gtatctctcg agaaaagaca agaggcccag a	31
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para PSP/reg 1 alfa	
25	<400> 3	
	ctagtttttg aacttgcata c	21
	<210> 4	
	<211> 28	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo para PSP/reg 1 beta	
35	<400> 4	
	gaaaagacag gagtcccaga cagagctg	28
	<210> 5	
40	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador de alargamiento para PSP/reg 1 beta	
	<400> 5	
	gtatctctcg agaaaagaca ggagtcccag ac	32
	<210> 6	
50	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador inverso para PSP/reg 1 beta	
	<400> 6	
	gtatctctcg agaaaagaca ggagtcccag ac	32

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de predicción *in vitro* y/o diagnóstico de una infección sistémica en seres humanos, en el que se determina el nivel de litostatina/proteína regeneradora (PSP/reg) en una muestra de fluidos corporales, y un nivel alto es indicativo del desarrollo de una septicemia.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que se determina el nivel de PSP/reg en suero.
3. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que el alto nivel indicativo del desarrollo de una septicemia postraumática es 60 ng/ml.
4. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que el alto nivel indicativo del desarrollo de una septicemia es 80 ng/ml en los días 3, 4 ó 5 después del traumatismo.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el nivel de PSP/reg se determina mediante ELISA, RIA, EIA, espectrometría de masas o análisis por micromatriz.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el nivel de PSP/reg se determina mediante ELISA en *sándwich*, en el que las placas de microtitulación están recubiertas con un tipo de anticuerpo dirigido contra la PSP/reg, entonces las placas se bloquean y se carga la muestra o el estándar, se aplica un segundo tipo de anticuerpo contra la PSP/reg, entonces se añade un tercer tipo de anticuerpo que detecta el tipo particular del segundo anticuerpo conjugado con un marcador adecuado, y se usa el marcador para cuantificar la cantidad de PSP/reg.
7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que el marcador del ELISA en *sándwich* es una enzima para su detección cromogénica.