

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 318 344**

⑤① Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **04785651 .3**
⑨⑥ Fecha de presentación : **02.06.2004**
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1629123**
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

⑤④ Título: **Procedimiento de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico.**

③⑩ Prioridad: **03.06.2003 FR 03 06660**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

⑦③ Titular/es: **BIOMERIEUX**
Chemin de l'Orme
69280 Marcy-L'Etoile, FR

⑦② Inventor/es: **Pachot, Alexandre**

⑦④ Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 318 344 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).

ES 2 318 344 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico o de pronóstico de un síndrome séptico. También se describe un kit de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico.

10 El síndrome séptico, respuesta sistémica a la infección, representa una de las primeras causas de mortalidad en los servicios de reanimación. Puede ser el resultado de una infección bacteriana, vírica, micótica o parasitaria. Entre este síndrome séptico, se distingue por orden de gravedad creciente sepsis, sepsis grave y choque séptico. De este modo, un grupo de expertos propuso en 1992 criterios de definición de estos tres síndromes clínicos (R. C. Bone *et al*, The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, Chest 101 (6): 1644-1655, 1992):

- 15 • de este modo la sepsis es una respuesta sistémica de inflamación vinculada a una infección,
- la sepsis grave es una sepsis acompañada por el mal funcionamiento de al menos un órgano,
- 20 • el choque séptico es una sepsis grave asociada a una hipertensión persistente y puede cualificarse mediante:
 - la presencia de un punto infeccioso identificado,
 - una respuesta inflamatoria generalizada que se manifiesta por al menos dos de los siguientes signos: a) temperatura superior a 38°C o inferior a 36°C; b) ritmo cardíaco superior a 90 latidos por minuto; c) ritmo respiratorio superior a 20 respiraciones por minuto; d) número de leucocitos superior a 12000/mm³ o inferior a 4000/mm³,
 - 25 ○ una hipotensión persistente a pesar de los adecuados restablecimientos de la masa sanguínea circulante y de los tratamientos vasopresores.
 - 30

35 De manera general, los signos de sepsis, de sepsis grave y de choque séptico están próximos y la diferencia entre estas 3 situaciones reside principalmente en la importancia de la perturbación de todas las funciones vitales. Durante un choque séptico, se observa principalmente una caída de la presión arterial, taquicardia, polipnea, moratones de la piel, hipo- o hipertermia y escalofríos. Estos signos están acompañados también por un mal funcionamiento de órganos “diana” con una alteración de la función de órganos alejados del foco infeccioso (riñones, pulmones, sistema nervioso central, aparato digestivo y sistema hematológico afectados generalmente) que se traduce en una oliguria (<0,5 ml/kg/h), insuficiencia renal, hipoxemia, trombopenia, agitación, confusión.

40 La evolución de un síndrome séptico desde la fase de sepsis hacia una fase de sepsis grave y después de choque séptico no es sistemática, ya que aproximadamente el 64% de los pacientes sépticos desarrollan una sepsis grave y el 23% de los pacientes con sepsis grave evolucionan a choque séptico. Antes de esta etapa última de choque séptico, deben prescribirse tratamientos al paciente para interrumpir e invertir el proceso fisiopatológico.

45 De este modo, es preciso restaurar un estado hemodinámico satisfactorio y asegurar una ventilación eficaz. También es preciso realizar simultáneamente el tratamiento sintomático del choque y un tratamiento antibiótico adaptado tan pronto como sea posible a los datos bacteriológicos.

50 De este modo, parece que aunque algunos pacientes que desarrollan un síndrome séptico y particularmente un choque séptico, pueden reanimarse mediante asistencia sanitaria convencional, tal como un tratamiento antibiótico de amplio espectro aplicado antes de los resultados de los análisis bacteriológicos que indican la fuente infecciosa, otros paciente, que desarrollan un síndrome séptico mucho más grave, necesitan el empleo de terapéuticos pesados, como la proteína C activada. Además del coste muy elevado, este tipo de terapéutico expone a los pacientes a riesgos de efectos indeseables muy importantes (trastornos de la coagulación, etc.). Por lo tanto, es muy importante dirigirse de manera eficaz a los pacientes que puedan beneficiarse de dicho tratamiento.

55 Debido a esto, el diagnóstico precoz de un síndrome séptico es esencial y permite proponer un tratamiento adaptado al paciente. Además, el pronóstico del síndrome séptico y particularmente de un choque séptico, es primordial para proponer a cada paciente un tratamiento adaptado y discriminar lo más pronto posible los pacientes que presentan un síndrome séptico con pronóstico malo y que necesitan una terapia pesada, de los pacientes con pronóstico bueno.

60 Actualmente, el diagnóstico y el pronóstico de un síndrome séptico y particularmente de un choque séptico se basan esencialmente en el número de fallos viscerales, la respuesta al tratamiento sintomático, la accesibilidad del terapéutico médico y/o quirúrgico al foco infeccioso inicial y a posibles focos metastáticos.

65 Esto presenta sin embargo el inconveniente de que solamente puede aplicarse a una fase avanzada del síndrome séptico y particularmente del choque séptico, reduciendo las posibilidades de supervivencia del paciente.

El diagnóstico y el pronóstico de un síndrome séptico también pueden basarse en la detección de algunas proteínas o factores solubles implicados en este síndrome, tales como citoquinas. Puede mencionarse particularmente la publicación de Thijs & Hack (Intensive Care Med, 1995, 21: S258-S263), que presenta una revisión de las concentraciones plasmáticas de algunas citoquinas tales como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, durante una sepsis. De este modo, la dosificación de citoquinas, implicadas durante el desarrollo de un síndrome séptico puede ser un medio de diagnóstico y de pronóstico de un síndrome séptico. Estos autores describieron de este modo una correlación positiva entre el contenido plasmático de IL-1 (Interleuquina-1) y un síndrome séptico de pronóstico malo (Thijs & Hack, Intensive Care Med 31: S258-263, 1995). Sin embargo, otros autores no encontraron ninguna correlación entre IL-1 y un pronóstico malo del síndrome séptico, que sugiere una gran variabilidad de este factor. Además, dosis elevadas de TNF (Factor de Necrosis Tumoral) se asociaron también a un pronóstico malo (Casey *et al.*, Ann Intern Med. 1993. 119: 771-778). El TNF- α y después IL-1 β son las dos primeras citoquinas pro-inflamatorias liberadas por los monocitos después del comienzo de un estado séptico.

Otros autores demostraron que el contenido de IL-10 (Interleuquina-10) plasmática es más alto en los pacientes que desarrollan una sepsis de pronóstico malo, mientras que decrece significativamente en los pacientes que presentan una sepsis de pronóstico bueno hasta no ser detectable en pacientes sanos (Van der Poll, J. Infect. Dis. 175: 118-122, 1997). La IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria muy importante y que, por su capacidad de inhibir la producción de TNF- α y de IL-1 β , participa en el establecimiento del estado de inmuno-parálisis. Sin embargo, al ser detectable este aumento del contenido de IL-10 solamente en el 80% de los pacientes con choque séptico, la detección única de este factor sigue siendo insuficiente para pronosticar la evolución del choque séptico.

También puede mencionarse la patente US-B-6.303.321 que describe un método de pronóstico de la gravedad de un síndrome séptico que comprende la medición de la concentración en suero de HMG1 (proteína del grupo de alta movilidad 1) mediante una técnica de inmunotransferencia. La HMG1, al contrario que TNF- α e IL-1 β , se describe como un mediador pro-inflamatorio tardío de los síndromes sépticos. Una alta concentración de HMG1 se correlaciona con un pronóstico malo, no detectándose la concentración en suero de HMG1 en pacientes sanos. Por el contrario, se ha descrito en ratón una regulación post-transcripcional del gen HMG1, que sugiere que la expresión de este gen solamente debe analizarse a nivel proteico (Wang *et al.*, Science, 1999, vol 285, p. 248-251).

El documento EP-A-1 310 567 (OLIGENE GMBH, 14-05-2003) describe un procedimiento de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico [0015], [0046]) de acuerdo con el cual se dispone de una muestra biológica del paciente (muestra de sangre; "Patientenmaterial (Blut oder Gewebe)" (*material del paciente (sangre o tejido)*) [0046]) y se extraen los ácidos nucleicos de la muestra ("cRNA [...] oder cDNA Sonden, die dem Patientenmaterial [...] entstammen" (*ARNc o sondas de ADNc, que proceden del material del paciente*), [0046]), se dispone de al menos cuatro reactivos específicos que comprenden reactivos específicos de los genes diana IL-1beta, IL-10, TGFbeta (sondas de hibridación ([0046]); Tabla 1), se determina la expresión de al menos cuatro genes diana entre los cuales IL-1 beta, IL-10 y TGFbeta (Tabla 1 [0046]).

Sin embargo, es importante observar que, actualmente, ninguna citoquina es reconocida de manera consensuada como herramienta de diagnóstico o de pronóstico de un síndrome séptico. Además, la dosificación plasmática de citoquinas se basa en una reacción antígeno-anticuerpo que puede falsearse mediante la presencia de reacción cruzada con otros antígenos no específicos de las citoquinas o mediante la presencia de citoquinas complejadas en el plasma con un receptor soluble. La presente invención se propone resolver los inconvenientes del estado de la técnica presentando una nueva herramienta fiable de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico, tal como particularmente un choque séptico.

De manera sorprendente, los inventores demostraron que el diagnóstico y/o el pronóstico de un síndrome séptico puede determinarse mediante el estudio de un panel de genes seleccionados entre IL-10, TGF β , HMG1, T-bet (Factor de transcripción de la caja T específico de células T, T bet), IL-1 β , GATA-3 (GATA - proteína de unión 3) y TNF- α . Además, el análisis en una sola etapa de la expresión de varios de estos genes permite obtener una herramienta muy eficaz para el pronóstico y/o diagnóstico de un síndrome séptico.

Antes de continuar, se proporcionan las siguientes definiciones para entender mejor la invención.

Se entiende por *síndrome séptico*, una respuesta sistémica a la infección. Este síndrome séptico puede estar en fase de sepsis, sepsis grave o choque séptico. Preferiblemente, el síndrome séptico es un choque séptico.

Se entiende por *muestra biológica*, cualquier material procedente del paciente, que puede contener un material biológico que permite detectar la expresión de un gen y puede ser particularmente una muestra de sangre, de suero, de saliva o de tejido o de células circulantes del paciente. Se dispone de esta muestra biológica mediante cualquier tipo de extracción conocido por el especialista en la técnica, tal como particularmente una toma de sangre.

Se entiende por *material biológico*, cualquier material que permite detectar la expresión de un gen, como particularmente un ácido nucleico o una proteína. El ácido nucleico puede ser particularmente un ARN (ácido ribonucleico) tal como un ARNm (ARN mensajero). De acuerdo con una realización preferida de la invención, el material biológico es un ácido nucleico y aún más preferiblemente un ARNm (ARN mensajero).

ES 2 318 344 T3

La *extracción del material biológico* de la muestra biológica durante la etapa a) puede realizarse mediante todos los protocolos de extracción de ácidos nucleicos o de proteínas conocidos por el especialista en la técnica.

A título indicativo, la extracción de ácidos nucleicos puede realizarse particularmente mediante:

- una etapa de Tisis de las células presentes en la muestra biológica, para liberar los ácidos nucleicos contenidos en las envueltas proteicas y/o lipídicas de los microorganismos (como restos celulares que perturban las posteriores reacciones). Como ejemplo, pueden utilizarse los métodos de tisis tales como los descritos en las solicitudes de patente de la Solicitante:
 - o WO-A00/05338 sobre la tisis mixta magnética y mecánica,
 - o WO-A-99/53304 sobre la Tisis eléctrica, y
 - o WO-A-99/15321 sobre la tisis mecánica.

El especialista en la técnica podrá utilizar otros métodos de Tisis bien conocidos, tales como choques térmicos u osmóticos o lisis químicas con agentes caotrópicos tales como sales de guanidinio (US-A-5.234.809).

- una etapa de purificación, que permite la separación entre los ácidos nucleicos y los demás constituyentes celulares liberados en la etapa de lisis. Esta etapa generalmente permite concentrar los ácidos nucleicos. Como ejemplo, pueden utilizarse partículas magnéticas opcionalmente revestidas de oligonucleótidos, mediante adsorción o covalencia (véase a este respecto las patentes US-A-4.672.040 y US-A-5.750.338) y de este modo purificar los ácidos nucleicos que se fijan a estas partículas magnéticas, mediante una etapa de lavado. Esta etapa de purificación de los ácidos nucleicos es particularmente interesante si se desea amplificar posteriormente dichos ácidos nucleicos. Una realización particularmente interesante de estas partículas magnéticas se describe en las solicitudes de patente depositadas por la Solicitante con las siguientes referencias: WO-A-97/45202 y WO-A-99/35500. Otro ejemplo interesante de método de purificación de ácidos nucleicos es la utilización de sílice en forma de columna o en forma de partículas inertes (Boom R. *et al.*, J. Clin. Microbiol., 1990, N° 28 (3), p. 495-503) o magnéticas (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSil™ Paramagnetic particles). Otros métodos muy extendidos se basan en las resinas de intercambio iónico en columna o en forma de partícula paramagnética (Whatman: DEAE-Magarose) (Levison PR *et al.*, J. Chromatography, 1998, p. 337-344). Otro método muy pertinente pero no exclusivo para la invención es el de la adsorción en soporte de óxido metálico (compañía Xtrana: matriz Xtra-Bind™).

Se entiende por *reactivo específico*, un reactivo que reacciona con el material biológico para demostrar, de manera directa o indirecta, la expresión de un gen diana, que puede determinarse mediante análisis de los ARNm procedentes de este gen o mediante el análisis de la proteína codificada por este gen.

A título indicativo, cuando se desea determinar la expresión de un gen diana mediante el análisis de la proteína codificada por este gen, este reactivo específico comprende al menos un anticuerpo específico de la proteína codificada por este gen diana. A título indicativo, cuando se desea determinar la expresión de un gen diana mediante el análisis de los ARNm transcritos a partir de este gen, este reactivo específico comprende al menos un cebador de amplificación específico del ADN complementario de este ARNm (se habla entonces de cebador de amplificación específico de un gen diana). El ADN complementario de un ARNm puede obtenerse de acuerdo con un protocolo bien conocido por el especialista en la técnica. A título indicativo, se extraen durante la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención los ARN totales (que comprenden ARN ribosómicos, ARN transferentes y ARNm) de la muestra biológica. A continuación se realiza una reacción de transcripción inversa con ayuda de una enzima transcriptasa inversa que permite obtener, a partir de un fragmento de ARN, un fragmento complementario de ADN. La realización de dicha etapa es bien conocida por el especialista en la técnica. Cuando se desea más particularmente obtener únicamente los ADN complementarios de los ARN mensajeros, se realiza esta etapa enzimática en presencia de fragmentos de nucleótidos que comprenden únicamente bases timina (poliT), que hibridan por complementariedad con la secuencia poliA de los diferentes ARNm para formar un complejo poliT-poliA que sirve entonces como punto de partida para la reacción de transcripción inversa realizada por la enzima transcriptasa inversa. Se obtienen entonces diferentes ADN complementarios de los diferentes ARN mensajeros inicialmente presentes en la muestra biológica. En lo sucesivo en la exposición, se entiende por ADNc, un ADN complementario de un ARN mensajero.

Por *cebador de amplificación*, se entiende un fragmento de nucleótidos que comprende de 5 a 100 motivos de nucleótidos, preferiblemente de 15 a 25 motivos de nucleótidos y que posee una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para el inicio de una polimerización enzimática, por ejemplo en una reacción de amplificación enzimática.

Por *reacción de amplificación enzimática*, se entiende un proceso que genera múltiples copias de un fragmento de nucleótidos diana con ayuda de cebadores de amplificación específicos mediante la acción de al menos una enzima. Dichas reacciones de amplificación las conoce bien el especialista en la técnica y pueden mencionarse particularmente las siguientes técnicas:

ES 2 318 344 T3

- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), tal como se describe en las patentes US-A-4.683.195, US-A-4.683.202 y US-A-4.800.159,
- 5 - LCR (Reacción en Cadena de la Ligasa), expuesta por ejemplo en la solicitud de patente EP-A-O 201 184,
- RCR (Reacción de Reparación en Cadena), descrita en la solicitud de patente WO-A-90/01069,
- 3SR (Replicación de Secuencia Auto Sostenida) con la solicitud de patente WO-A-91/06995,
- 10 - NASBA (Amplificación Basada en la Secuencia del Ácido Nucleico) con la solicitud de patente WO-A-91/02818, y
- TMA (Amplificación Mediada por Transcripción) con la patente US-A-5.399.491.

15 Se habla entonces de amplicones para designar los polinucleótidos generados mediante una técnica de amplificación enzimática. Preferiblemente, cuando la amplificación enzimática es una PCR, el reactivo específico comprende al menos 2 cebadores de amplificación específicos para amplificar una región particular del ADN complementario del ARNm procedente del gen diana. Cuando la amplificación enzimática es una PCR realizada después de una reacción de transcripción inversa, se habla de RT-PCR.

20 Por *sonda de hibridación*, se entiende un fragmento de nucleótidos que comprende de 5 a 100 motivos de nucleótidos, particularmente de 5 a 35 motivos de nucleótidos, que posee una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para formar un complejo de hibridación con un fragmento de nucleótidos diana. En la presente invención, el fragmento de nucleótidos diana puede ser una secuencia de nucleótidos comprendida en un ARN mensajero o una secuencia de nucleótidos comprendida en un ADN complementario obtenido mediante transcripción inversa de dicho ARN mensajero.

30 Por *hibridación*, se entiende el proceso durante el cual, en condiciones apropiadas, dos fragmentos de nucleótidos, tales como por ejemplo una sonda de hibridación y un fragmento de nucleótidos diana, que tienen secuencias suficientemente complementarias, pueden formar una doble cadena con puentes de hidrógeno estables y específicos.

35 Un fragmento de nucleótidos "capaz de hibridar" con un polinucleótido es un fragmento que puede hibridar con dicho polinucleótido en condiciones de hibridación, que pueden determinarse en cada caso de forma conocida. Las condiciones de hibridación se determinan mediante la rigurosidad, es decir el rigor de las condiciones operatorias. La hibridación es tanto más específica cuanto a mayor rigurosidad se realiza. La rigurosidad se define particularmente en función de la composición de bases de un duplo sonda/diana, así como por el grado de apareamiento erróneo entre dos ácidos nucleicos. La rigurosidad también puede estar en función de los parámetros de la reacción, tales como la concentración y el tipo de especies iónicas presentes en la solución de hibridación, la naturaleza y la concentración de agentes desnaturalizantes y/o la temperatura de hibridación. La rigurosidad de las condiciones en las que debe realizarse una reacción de hibridación dependerá principalmente de las sondas de hibridación utilizadas. Todos estos datos los conoce bien y las condiciones apropiadas puede determinarlas el especialista en la técnica. En general, de acuerdo con la longitud de las sondas de hibridación utilizadas, la temperatura para la reacción de hibridación está comprendida entre aproximadamente 20 y 70°C, en particular entre 35 y 65°C en una solución salina a una concentración de aproximadamente 0,5 a 1 M. A continuación se realiza una etapa de detección de la reacción de hibridación.

45 Por *detección* se entiende una detección directa mediante un método físico o un método de detección con ayuda de un marcador. Existen muchos métodos de detección para la detección de ácidos nucleicos [véase por ejemplo el documento Kricka *et al.*, Clinical Chemistry, 1999, Na 45(4), p. 453-458 o Keller G.H. *et al.*, DNA Probes, 2ª ed., Stockton Press, 1993, secciones 5 y 6, p. 173-249]. Por *marcador*, se entiende un trazador capaz de generar una señal. Una lista no limitante de estos trazadores comprende las enzimas que producen una señal detectable por ejemplo mediante colorimetría, fluorescencia o luminiscencia, como peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, betagalactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes o colorantes; grupos con densidad electrónica detectables mediante microscopia electrónica o mediante sus propiedades eléctricas como la conductividad, mediante métodos de amperimetría o voltimetría o mediante mediciones de impedancia; grupos detectables mediante métodos ópticos como difracción, resonancia de plasmón superficial, variación del ángulo de contacto o mediante métodos físicos como espectroscopia de fuerza atómica, efecto túnel, etc.; moléculas radiactivas como ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I. De este modo, el polinucleótido puede marcarse durante la etapa de amplificación enzimática, por ejemplo utilizando un nucleótido trifosfato marcado para la reacción de amplificación. El nucleótido marcado será un desoxirribonucleótido en los sistemas de amplificación que generan un ADN, como PCR, o un ribonucleótido en las técnicas de amplificación que generan un ARN, como las técnicas TMA o NASBA. El polinucleótido también puede marcarse después de la etapa de amplificación, por ejemplo hibridándolo con una sonda marcada de acuerdo con la técnica de hibridación en sándwich descrita en el documento WO-A-91/19812.

65 Otro modo particular preferente de marcado de ácidos nucleicos se describe en la solicitud FR-A-2 780 059 de la Solicitante. Otro modo preferente de detección utiliza la actividad exonucleasa 5'-3' de una polimerasa, tal como se describe por Holland P.M., PNAS (1991) p 7276-7280.

Pueden utilizarse sistemas de amplificación de la señal como se describe en el documento WO-A-95/08000 y, en este caso, la reacción preliminar de amplificación enzimática puede no ser necesaria.

En la presente invención, la sonda de hibridación puede ser una *sonda llamada de captura*. En este caso, el fragmento de nucleótidos diana puede marcarse previamente por medio de un marcador. La sonda llamada de captura es inmovilizada o inmovilizable en un soporte sólido mediante cualquier medio apropiado, es decir directa o indirectamente, por ejemplo mediante covalencia o adsorción. Se realiza entonces una reacción de hibridación entre dicha sonda de detección y el fragmento de nucleótidos diana marcado.

La sonda de hibridación también puede ser una *sonda llamada de detección*. En este caso, la sonda de hibridación puede marcarse por medio de un marcador. Se realiza entonces una reacción de hibridación entre dicha sonda de captura y el fragmento de nucleótidos diana.

Ya se utilice una sonda llamada de captura o una sonda llamada de detección, la *reacción de hibridación* puede realizarse en un soporte sólido que incluye todos los materiales en los que puede inmovilizarse un ácido nucleico. Pueden utilizarse materiales de síntesis o materiales naturales, opcionalmente modificados químicamente, como soporte sólido, particularmente polisacáridos tales como materiales a base de celulosa, por ejemplo papel, derivados de celulosa tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa o dextrano, polímeros, copolímeros, particularmente a base de monómeros de tipo estireno, fibras naturales tales como algodón y fibras sintéticas tales como nylon; materiales minerales tales como sílice, cuarzo, vidrios, cerámicas; látex; partículas magnéticas; derivados metálicos, geles, etc. El soporte sólido puede estar en forma de una placa de microscopio, de una membrana como se describe en la solicitud WO-A-94/12670, de una partícula o de un biochip. Por *biochip*, se entiende un soporte sólido de dimensión reducida donde se fijan una multitud de sondas de captura en posiciones predeterminadas. El concepto de biochip, más exactamente de chip de ADN, data de principios de los años 90. Actualmente, este concepto se ha ampliado ya que empiezan a desarrollarse chips de proteínas. Este concepto se basa en una tecnología multidisciplinar que integra micro-electrónica, química de los ácidos nucleicos, análisis de imágenes e informática. El principio de funcionamiento se basa en un fundamento de biología molecular: el fenómeno de hibridación, es decir el apareamiento por complementariedad de las bases de dos secuencias de ADN y/o de ARN. El método de los biochips se basa en el empleo de sondas de captura fijadas en un soporte sólido sobre las que se hace actuar una muestra de fragmentos de nucleótidos diana marcados directa o indirectamente con fluoró cromos. Las sondas de captura se colocan de manera específica en el soporte o chip y cada hibridación da una información particular, en relación con el fragmento de nucleótidos diana. Las informaciones obtenidas son acumulativas y permiten por ejemplo cuantificar el nivel de expresión de un gen o de varios genes diana. Para analizar la expresión de un gen diana, puede realizarse entonces un biochip que tiene muchas sondas que corresponden a todo o parte del gen diana, que se transcribe a ARNm. Se hibridan entonces, por ejemplo, ADN complementarios de los ARNm procedentes del o de los genes diana que se desea analizar. Después de la hibridación, el soporte o chip se lava, se lee por ejemplo con un escáner y el análisis de fluorescencia se trata informáticamente. Pueden mencionarse a título indicativo, los chips de ADN desarrollados por la compañía Affymetrix ("Accessing Genetic Information with High-Density DNA arrays", M. Chee *et al.*, Science, 1996, 274, 610-614. "Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis" A. Caviani Pease *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU, 1994, 91, 5022-5026), para los diagnósticos moleculares. En esta tecnología, las sondas de captura son generalmente de tamaños reducidos, alrededor de veinte nucleótidos. Otros ejemplos de biochips se dan en las publicaciones de G. Ramsay, Nature Biotechnology, 1998, N° 16, p. 40-44; F. Ginot, Human Mutation, 1997, N° 10, p. 1-10; J. Cheng *et al.*, Molecular diagnosis, 1996, N° 1(3), p. 183-200; T. Livache *et al.*, Nucleic Acid Research, 1994, N° 22 (15), p. 2915-2921; J. Cheng *et al.*, Nature Biotechnology, 1998, N° 16, p. 541-546 o en las patentes US-A-4.981.783, US-A-5.700.637, US-A-5.445.934, US-A-5.744.305 y US-A-5.807.522. La característica principal del soporte sólido debe ser conservar las características de hibridación de las sondas de captura en los fragmentos de nucleótidos diana, generando un ruido de fondo mínimo para el método de detección.

En la presente invención, la *determinación de la expresión de genes diana* puede analizarse mediante la expresión de los ARNm que se transcriben en un momento dado. En este caso, el material biológico es un ácido nucleico y el reactivo específico puede ser indistintamente un cebador de amplificación o una sonda de hibridación tal como se han definido anteriormente. La expresión de un gen diana también puede analizarse mediante la expresión de las proteínas codificadas por el gen diana. En este caso, el material biológico es una proteína y el reactivo específico puede ser un anticuerpo específico de la proteína codificada por el gen diana.

A título indicativo, puede determinarse la expresión de un gen diana de la siguiente manera:

- 1) después de extraer los ARN totales de una muestra biológica tal como se ha definido en la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención tal como se ha presentado anteriormente, se realiza una etapa de transcripción inversa, tal como se ha descrito anteriormente para obtener los diferentes ADN complementarios de los diferentes ARN mensajeros inicialmente presentes en la muestra biológica (o ADNc)
- 2) se amplifican específicamente los ADNc. En este caso, el reactivo específico utilizado comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana, tal como se ha definido anteriormente. Esta etapa puede realizarse particularmente mediante una reacción de amplificación de tipo PCR o mediante cualquier otra técnica de amplificación tal como se ha definido anteriormente. También pueden amplificarse simultáneamente los ADNc de varios genes diana: se habla entonces de amplificación múltiple.

ES 2 318 344 T3

- 3) se determina la expresión del gen diana cuantificando los ADNc. Los ADNc pueden cuantificarse particularmente mediante la utilización de un intervalo de cuantificación obtenido mediante una reacción de amplificación realizada hasta saturación. Para tener en cuenta la variabilidad de eficacia enzimática que puede observarse durante las diferentes etapas (transcripción inversa, PCR, etc.), puede normalizarse la expresión del gen diana de los diferentes grupos de pacientes, mediante la determinación simultánea de la expresión de un gen llamado de mantenimiento, cuya expresión es similar en los diferentes grupos de pacientes. Realizando una relación entre la expresión del gen diana y la expresión del gen de familia, se corrige de este modo cualquier variabilidad entre los diferentes experimentos. El especialista en la técnica podrá remitirse particularmente a las siguientes publicaciones: Bustin SA Journal of molecular endocrinology, 2002, 29: 23-39; Giuliette A methods, 2001, 25: 386-401.

También puede determinarse la expresión de un gen diana de la siguiente manera:

- 1) después de extraer los ARN totales de una muestra biológica tal como se ha definido en la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención tal como se ha presentado anteriormente, se realiza una etapa de transcripción inversa, tal como se ha descrito anteriormente para obtener los diferentes ADN complementarios de los diferentes ARN mensajeros inicialmente presentes en la muestra biológica (o ADNc)
- 2) se inmovilizan los ADN en una membrana
- 3) se determina la expresión del gen diana hibridando los ADNc con sondas de hibridación específicas del gen diana marcadas previamente. Dichas técnicas de hibridación las conoce bien el especialista en la técnica y puede mencionarse particularmente la técnica de transferencia de Northern. Esta reacción de hibridación puede realizarse después de una etapa de amplificación específica de los ADN complementarios de los ARN mensajeros de un gen diana particularmente cuando el gen se expresa débilmente.

El análisis de la expresión de un gen diana permite entonces disponer de una herramienta para el diagnóstico y/o pronóstico de un síndrome séptico. Por ejemplo, puede analizarse la expresión de un gen diana en un paciente del que no se conoce el pronóstico de su síndrome séptico y, comparando con valores de expresión media conocidos del gen diana de pacientes con pronóstico bueno y valores de expresión media conocidos del gen diana de pacientes con pronóstico malo, determinar si el paciente tiene un pronóstico bueno o malo para proponerle un tratamiento adaptado. También puede estudiarse simultáneamente la expresión de varios genes diana, particularmente mediante la utilización de un biochip y se determina, en una sola etapa, es decir a partir de una misma extracción y mediante un solo análisis (con ayuda de dosificaciones repetidas o de medición en una sola etapa), la expresión de varios genes diana. A continuación, se analizan los genes de manera global para un paciente del que no se conoce el pronóstico de su síndrome séptico y, comparando con valores de expresión media conocidos de un mismo panel de genes diana de pacientes con pronóstico bueno y valores de expresión media conocidos de un mismo panel de genes diana de pacientes con pronóstico malo, puede determinarse por lo tanto si el paciente tiene un pronóstico bueno o malo para proponerle un tratamiento adaptado.

De este modo, se describe un procedimiento de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico, de acuerdo con el cual:

- a) se dispone de una muestra biológica del paciente y se extrae material biológico de la muestra biológica
- b) se dispone de al menos cuatro reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen diana IL-10, reactivo específico del gen diana TGF β , reactivo específico del gen diana HMG1, reactivo específico del gen diana T-bet, reactivo específico del gen diana IL-1 β , reactivo específico del gen diana TNF α y reactivo específico del gen diana GATA-3
- c) se determina la expresión de al menos cuatro genes diana seleccionados entre: IL-10, TGF β , HMG1, T-bet, IL-1 β , TNF α y GATA-3.

De acuerdo con una realización preferida, la muestra biológica es una muestra de sangre. De acuerdo con una realización preferida, el material biológico es un ácido nucleico.

De acuerdo con una realización preferida, se extraen los ARN totales de la muestra biológica.

De acuerdo con una realización preferida, el reactivo específico de IL-10 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana IL-10, el reactivo específico de TGF β comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana TGF β , el reactivo específico de HMG1 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana HMG1, el reactivo específico de T-bet comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana T-bet, el reactivo específico de IL-1 β comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana IL-1 β , el reactivo específico de TNF α comprende al menos un cebador de

ES 2 318 344 T3

amplificación específico del gen diana TNF α y/o el reactivo específico de GATA 3 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana GATA 3.

5 De acuerdo con otra realización, el reactivo específico comprende al menos una sonda de hibridación específica de un gen diana. Preferiblemente, el reactivo específico de IL-10 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana IL-10, el reactivo específico de TGF β comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana TGF β , el reactivo específico de HMG1 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana HMG1, el reactivo específico de T-bet comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana T-bet, el reactivo específico de IL-1 β comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana IL-1 β , el reactivo específico de TNF α comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana TNF α y/o el reactivo específico de GATA 3 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana GATA 3. Esta sonda puede ser una sonda de detección o una sonda de captura, tal como particularmente una sonda de captura inmovilizada en un biochip.

15 La invención se refiere preferiblemente a la determinación de la expresión de los genes diana mediante el análisis de la expresión de los ARNm.

20 De acuerdo con una realización preferida, se dispone durante la etapa b) del procedimiento, de al menos dos reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen TGF β y reactivo específico del gen HMG1 y se determina, durante la etapa c) del procedimiento de acuerdo con la invención, la expresión de al menos dos genes diana seleccionados entre TGF β y HMG1.

25 De acuerdo con una realización preferida, se dispone, durante la etapa b) del procedimiento, de al menos tres, preferiblemente de al menos cuatro y aún más preferiblemente de al menos cinco reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen IL-10, reactivo específico del gen TGF β , reactivo específico del gen HMG1, reactivo específico del gen T-bet, reactivo específico del gen IL-1 β , reactivo específico del gen TNF α y reactivo específico del gen GATA-3 y se determina, durante la etapa c) del procedimiento de acuerdo con la invención, la expresión de al menos 3, preferiblemente de al menos 4 y aún más preferiblemente de al menos 5 genes seleccionados entre IL-10, TGF β , HMG1, T-bet, IL-1 β , TNF α y GATA-3.

30 De acuerdo con una realización preferida, se dispone durante la etapa b) del procedimiento, de al menos tres reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen TGF β , reactivo específico del gen HMG1 y reactivo específico del gen IL-1 β y se determina, durante la etapa c) del procedimiento de acuerdo con la invención, la expresión de al menos tres genes diana seleccionados entre: TGF β , HMG1 e IL-1 β .

35 De acuerdo con otra realización preferida, se dispone durante la etapa b) del procedimiento, de al menos cuatro reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen TGF β , reactivo específico del gen HMG1, reactivo específico del gen IL-1 β y reactivo específico del gen IL-10 y se determina, durante la etapa c) del procedimiento de acuerdo con la invención, la expresión de al menos cuatro genes diana seleccionados entre: TGF β , HMG1, IL-1 β e IL-10.

45 De acuerdo con otra realización preferida, se dispone durante la etapa b) del procedimiento, de al menos cinco reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen TGF β , reactivo específico del gen HMG1, reactivo específico del gen IL-1 β , reactivo específico del gen IL-10 y reactivo específico del gen T-bet y se determina, durante la etapa c) del procedimiento de acuerdo con la invención, la expresión de al menos cinco genes diana seleccionados entre: TGF β , HMG1, IL-1 β , IL-10 y T-bet.

También se describe un procedimiento de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico, tal como se ha definido anteriormente, de acuerdo con el cual:

- 50
- a) se dispone de una muestra biológica del paciente, tal como se ha definido anteriormente y se extrae material biológico, tal como se ha definido anteriormente, de la muestra biológica
 - b) se dispone de al menos un reactivo específico de un gen seleccionado entre los siguientes genes: IL-10, T-bet y GATA-3.
 - c) se determina la expresión, tal como se ha definido anteriormente, de al menos un gen diana seleccionado entre: IL-10, T-bet y GATA-3.
- 55

60 De acuerdo con una realización preferida, la muestra biológica es una muestra de sangre.

De acuerdo con una realización preferida, el material biológico es un ácido nucleico.

65 De acuerdo con una realización preferida, el reactivo específico es un cebador de amplificación, tal como se ha definido anteriormente, específico de un gen seleccionado entre IL-10, T-bet y GATA-3.

De acuerdo con otra realización preferida, el reactivo específico de IL-10, T-bet o de GATA 3 es una sonda de

ES 2 318 344 T3

hibridación tal como se ha definido anteriormente, específica respectivamente de los genes diana IL-10; T-bet y GATA 3.

También se presenta un procedimiento de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico, de acuerdo con el cual:

- a) se dispone de una muestra biológica del paciente y se extraen los ARN totales de la muestra biológica
- b) se dispone de al menos un reactivo específico del gen HMG1
- c) se determina la expresión de los ARNm del gen HMG1.

Es muy evidente que, en este procedimiento, no se desea detectar la expresión del gen HMG1 a nivel proteico sino solamente a nivel de los ARNm. Preferiblemente, el reactivo específico del gen HMG1 es un cebador de amplificación o una sonda de hibridación tal como se ha definido anteriormente.

También se presenta un kit de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico, que comprende al menos cuatro reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen IL-10, reactivo específico del gen TGF β , reactivo específico del gen HMG1, reactivo específico del gen T-bet; reactivo específico del gen IL-1 β , reactivo específico del gen TNF α y reactivo específico del gen GATA-3.

De acuerdo con una realización preferida, el reactivo específico de IL-10 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana IL-10, el reactivo específico de TGF β comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana TGF β , el reactivo específico de HMG1 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana HMG1, el reactivo específico de T-bet comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana T-bet, el reactivo específico de IL-1 β comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana IL-1 β , el reactivo específico de TNF α comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana TNF α y/o el reactivo específico de GATA 3 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana GATA 3.

De acuerdo con otra realización, el reactivo específico de IL-10 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana IL-10, el reactivo específico de TGF β comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana TGF β , el reactivo específico de HMG1 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana HMG1, el reactivo específico de T-bet comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana T-bet, el reactivo específico de IL-1 β comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana IL-1 β , el reactivo específico de TNF α comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana TNF α y/o el reactivo específico de GATA 3 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana GATA 3.

También se presenta un kit de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico que comprende al menos un reactivo específico seleccionado entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen IL-10, reactivo específico del gen T-bet y reactivo específico del gen GATA-3.

De acuerdo con una realización preferida, el reactivo específico de IL-10 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana IL-10, el reactivo específico de T-bet comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana T-bet y/o el reactivo específico de GATA 3 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana GATA 3.

De acuerdo con otra realización preferida, el reactivo específico de IL-10 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana IL-10, el reactivo específico de T-bet comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana T-bet y/o el reactivo específico de GATA 3 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana GATA 3.

También se presenta un procedimiento de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico, de acuerdo con el cual:

- a) se dispone de una muestra biológica del paciente y se extrae material biológico de la muestra biológica
- b) se dispone de al menos dos reactivos específicos de al menos dos genes diana seleccionados entre: IL-10, TGF β , HMG1, T-bet, IL-1 β , TNF α y GATA-3.
- c) se determina, en una sola etapa, la expresión de al menos dos genes diana seleccionados entre: IL-10, TGF β , HMG1, T-bet, IL-1 β , TNF α y GATA-3.

De acuerdo con una realización preferida, la muestra biológica es una muestra de sangre.

De acuerdo con una realización preferida, se extraen los ARN totales de la muestra biológica.

ES 2 318 344 T3

El gen diana se selecciona entre IL-10, TGF β , HMG1, T-bet, IL-1 β , TNF α y GATA-3.

De acuerdo con una realización preferida, el reactivo específico de IL-10 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana IL-10, el reactivo específico de TGF β comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana TGF β , el reactivo específico de HMG1 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana HMG1, el reactivo específico de T-bet comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana T-bet, el reactivo específico de IL-1 β comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana IL-1 β , el reactivo específico de TNF α comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana TNF α y/o el reactivo específico de GATA 3 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana GATA 3.

De acuerdo con otra realización, el reactivo específico comprende al menos una sonda de hibridación específica de un gen diana. Preferiblemente, el reactivo específico de IL-10 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana IL-10, el reactivo específico de TGF β comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana TGF β , el reactivo específico de HMG1 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana HMG1, el reactivo específico de T-bet comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana T-bet, el reactivo específico de IL-1 β comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana IL-1 β , el reactivo específico de TNF α comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana TNF α y/o el reactivo específico de GATA 3 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana GATA. 3. Esta sonda puede ser una sonda de detección o una sonda de captura, tal como particularmente una sonda de captura inmovilizada en un biochip.

Se presenta preferiblemente la determinación de la expresión de los genes diana mediante el análisis de la expresión de los ARNm. Durante la etapa c), se determina en una sola etapa, es decir a partir de una misma extracción y mediante un solo análisis (con ayuda de dosificaciones repetidas o de medición en una sola etapa), la expresión de al menos dos genes diana. A continuación, se analizan los genes de manera global para un paciente del que no se conoce el pronóstico de su síndrome séptico y, comparando con valores de expresión media conocidos de un mismo panel de genes diana de pacientes con pronóstico bueno y valores de expresión media conocidos de un mismo panel de genes diana de pacientes con pronóstico malo, puede determinarse por lo tanto si el paciente tiene un pronóstico bueno o malo para proponerle un tratamiento adaptado.

De acuerdo con una realización preferida, se dispone, durante la etapa b) del procedimiento, de al menos tres, preferiblemente de al menos cuatro y aún más preferiblemente de al menos cinco reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen IL-10, reactivo específico del gen TGF β , reactivo específico del gen HMG1, reactivo específico del gen T-bet; reactivo específico del gen IL-1 β , reactivo específico del gen TNF α y reactivo específico del gen GATA-3 y se determina, durante la etapa c) del procedimiento, la expresión de al menos 3 preferiblemente al menos 4 y aún más preferiblemente de al menos 5 genes seleccionados entre IL-10, TGF β , HMG1, T-bet, IL-1 β , TNF α y GATA-3.

De acuerdo con una realización preferida, se dispone durante la etapa b) del procedimiento, de al menos tres reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen TGF β , reactivo específico del gen HMG1 y reactivo específico del gen IL-1 β y se determina, durante la etapa c) del procedimiento, la expresión de al menos tres genes diana seleccionados entre: TGF β , HMG1 e IL-1 β .

De acuerdo con otra realización preferida, se dispone durante la etapa b) del procedimiento, de al menos cuatro reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen TGF β , reactivo específico del gen HMG1, reactivo específico del gen IL-1 β y reactivo específico del gen IL-10 y se determina, durante la etapa c) del procedimiento, la expresión de al menos cuatro genes diana seleccionados entre: TGF β , HMG1, IL-1 (3 e IL-10. De acuerdo con otra realización preferida, se dispone durante la etapa b) del procedimiento, de al menos cinco reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen TGF β , reactivo específico del gen HMG1, reactivo específico del gen IL-1 β , reactivo específico del gen IL-10 y reactivo específico del gen T-bet y se determina, durante la etapa c) del procedimiento, la expresión de al menos cinco genes diana seleccionados entre: TGF β , HMG1, IL-1 β , IL-10 y T-bet.

La figura adjunta se proporciona a modo de ejemplo explicativo y no tiene ningún carácter limitante. Esta figura permitirá entender mejor la invención.

La figura 1 presenta un dendograma obtenido a partir de 31 muestras obtenidas de pacientes de síndrome séptico con pronóstico bueno (SEP-BP) o con pronóstico malo (SEP-MP) y la utilización de un panel de sondas que permite el análisis de la expresión de 5 genes diana de acuerdo con la invención (IL-10, IL-1 β , GATA-3, TGF β y HMG1).

Los siguientes ejemplos se proporcionan a título ilustrativo y no tienen ningún carácter limitante. Estos ejemplos permitirán entender mejor la invención.

65

Ejemplo 1

Estudio de la expresión de los genes IL-10, TGFβ, HMG1, T-bet, IL-1β, TNFα y GATA-3 para el diagnóstico de un síndrome séptico

5

El estudio se realizó en 42 pacientes que habían desarrollado un síndrome séptico y admitidos en el servicio de reanimación quirúrgica o médica del centro hospitalario Lyon-Sud. También se utilizaron quince voluntarios sanos, para comparar la expresión de los genes IL-10, TGFβ, HMG1, T-bet, IL-1β, TNFα y GATA-3 en la sangre periférica de pacientes sanos y de pacientes con síndrome séptico. Se distinguía entonces un grupo de 15 pacientes sanos (S) y un grupo de 42 pacientes que desarrollan un síndrome séptico (SEP).

10

Extracción de los ARN y síntesis de los ADNc - Para cada paciente, la muestra biológica era una extracción de sangre, que se obtenía regularmente los 11 primeros días siguientes al comienzo del síndrome séptico desarrollado por los pacientes SEP. También se realizó una extracción de acuerdo con el mismo protocolo en los pacientes sanos (S). Estas extracciones se recogieron directamente en tubos PAXGene™ Blood RNA (PreAnalytix, Franklin Lakes, EEUU). Después de la etapa de extracción de sangre y para obtener una lisis total de las células, los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 4 h y después se conservaron a -20°C hasta la extracción del material biológico. Más exactamente, en este protocolo, los ARN totales se extrajeron con ayuda de los kits PAXGene Blood RNA® (PreAnalytix) respetando las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los tubos se centrifugaron (10 min., 3000 g) para obtener un resto de ácidos nucleicos. Este resto se lavó y se recogió en un tampón que contenía proteinasa K necesaria para la digestión de las proteínas (10 min. a 55°C). Se realizó un nuevo centrifugado (5 min. 19000 g) para eliminar los restos celulares y se añadió etanol para optimizar las condiciones de fijación de los ácido nucleicos. Los ARN totales se fijaron específicamente en las columnas PAXgene RNA spin column y, antes de la elución de estos, se realizó una digestión del ADN contaminante con ayuda del "RNAse free DNase set" (Qiagen, Ltd, Crawley, RU).

25

Para cada extracción, la calidad de los ARN totales se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa y un marcado con bromuro de etidio. Se realizó una reacción de transcripción inversa (RT) en un volumen final de 20 µl. El ARN total (1 µg) se mezcló con 1 µl de poliT a 50 µM y 1 µl de dNTP mix (ThermoScript™ RT-PCR system, Invitrogen) y después se incubó 5 min. a 65°C. Después de refrigerado en hielo, la solución se mezcló con 4 µl de 5x tampón "cDNA synthesis buffer" 1 µl de inhibidor de ribonucleasa "RNAse out" (40 U/µl), 1 µl de agua tratada con DEPC y 1 µl de ThermoScript RT (15 U/µl), obteniéndose todos estos productos del sistema ThermoScript™ RT-PCR system (Invitrogen). La transcripción inversa se realizó durante 1 h a 50°C y después se interrumpió mediante una incubación de 5 min. a 85°C. Para terminar, cada solución de ADNc se diluyó a 1/10 en agua con DEPC.

30

Preparación de los patrones para la generación de intervalos de cuantificación - El patrón HMG1 se preparó mediante una amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) realizada hasta saturación. Los amplicones obtenidos se purificaron (PCR purification kit, Qiagen Ltd) y la presencia de un amplicón único se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa marcado con bromuro de etidio.

35

Los patrones del gen de mantenimiento ciclofilina B y genes diana TGFβ, IL-1β, T-bet, GATA3 e IL-10 se obtuvieron de Search-LC (Heiiderberg, Alemania).

40

Análisis de la expresión de los ARNm mediante PCR en tiempo real - Los ARNm de los genes diana TGFβ, IL-1β, T-bet, GATA3, IL-10 y TNFα se cuantificaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el LightCycler™ (Roche). Las reacciones de PCR se realizaron con ayuda del kit Fast-Start™ DNA Master SYBR Green I real-time PCR kit (Roche Molecular Biochemicals). Cada PCR se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1 µl de LC-Fast Start Reaction Mix SYBR Green I, 1 µl de LC-Fast Start DNA Master SYBR Green I/Enzima (incluyendo Taq ADN polimerasa, el tampón de reacción y una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato), MgCl₂ (concentración final 3 mM), cebadores sentido y anti-sentido (concentración final 0,5 µM; obtenidos cada uno de Search-LC - Heidelberg Alemania) y 10 µl de solución de ADNc. Después de una etapa de desnaturalización de 10 min. a 95°C, se realizó la amplificación con ayuda de 40 ciclos de un protocolo de PCR "touchdown" (10 s a 95°C, 10 s de hibridación a 68-58°C, seguido de un periodo de extensión de 16 s a 72°C). Al final de cada ciclo, se midió la fluorescencia emitida por el SYBR Green.

45

Para confirmar la especificidad de la amplificación, los productos de PCR fueron objeto sistemáticamente de un análisis de curva de fusión (LightCycler™ - Roche). Para ello, los productos de PCR se trataron con una temperatura creciente de 58 a 98°C con un aumento de 0,1°C/s. Para cada producto de PCR, se obtuvo un solo pico durante el análisis de la curva, caracterizado por una temperatura de fusión específica.

50

La combinación de los cebadores para la cuantificación de HMG1 utilizada es la descrita por Sortiriou *et al* (Breast Cancer Res. 2002, 4: 1-8 que corresponde a los cebadores sentido: 5'-GCG GAC AAG GCC CGT TA-3' y anti-sentido: 5'-AGA GGA AGA AGG CCG AAG GA-3' (producto de PCR: 119 pb).

55

Las combinaciones de cebadores necesarias para la cuantificación del gen de mantenimiento ciclofilina B y de los genes diana TGFβ, IL-1β, T-bet, GATA3 e IL-10 se obtuvieron de Search-LC (Heidelberg, Alemania). De este modo, para el gen de mantenimiento ciclofilina B, el N° de entrada del Genbank era M60857 y se amplificaba la región 105-338. Para IL-1β, el N° de entrada del Genbank era M15330 y se amplificaba la región 438-642. Para TNFα, el N° de entrada del Genbank era X01394 y se amplificaba la región 373-783. Para T-bet, el N° de entrada del Genbank era

60

ES 2 318 344 T3

AF241243 y se amplificaba la región 461-669. Para GATA3, el N° de entrada del Genbank era X55037 y se amplificaba la región 1023-1294. Para TGF- β 1, el N° de entrada del Genbank era X02812 y se amplificaba la región 1540-1818. Para IL-10, el N° de entrada del Genbank era AY029171 y se amplificaba la región 126-413.

5 La cantidad de ARNm diana relativa a la cantidad de ARNm del gen de mantenimiento ciclofilina B se analizó mediante la técnica de cuantificación relativa con el LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals). Se utilizó el "Second Derivative Maximum Method" (*método del máximo de la segunda derivada*) del programa LightCycler™ (Roche) para determinar automáticamente el Crossing Point (punto de cruce) (Cp) para cada muestra. El valor del Cp se definió como el número de ciclos para el que la fluorescencia era significativamente
10 diferente del ruido de fondo.

Se realizaron cinco diluciones en serie a 1/10 por cuadruplicado con cada patrón para generar una curva patrón que expresa el Cp en función del logaritmo del número de copias. Las diluciones de patrón se optimizaron para que la curva patrón cubra el nivel de expresión esperado para el gen diana y el gen de mantenimiento. Las curvas patrón
15 relativas que describen la eficacia de PCR para el gen diana y el gen de mantenimiento se generaron y se utilizaron para realizar una cuantificación con el LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals).

Resultados obtenidos

20 Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1 a continuación.

TABLA 1

	Pacientes S	Pacientes SEP	P
IL-10	0,0020 \pm 0,0002	0,0259 \pm 0,0048	<0,001
TNFα	0,0176 \pm 0,0025	0,0817 \pm 0,0150	<0,001
IL-1β	0,8121 \pm 0,0544	1,0114 \pm 0,2110	0,43
HMG1	0,9736 \pm 0,0656	1,4807 \pm 0,0815	<0,001
GATA3	0,0329 \pm 0,0026	0,0077 \pm 0,0010	<0,001
T-bet	0,0002 \pm 0,0001	0,0051 \pm 0,0010	<0,001
TGFβ	0,5835 \pm 0,0607	0,2759 \pm 0,0200	<0,001

Esta tabla 1 presenta el nivel de expresión de los ARNm IL-10, IL-1 β , TNF α , HMG1, GATA3, TGF β y T-bet en
15 15 pacientes sanos (S) y 42 pacientes que desarrollan en síndrome séptico (SEP), obtenidos a partir de extracciones de sangre total obtenidas durante los tres primeros días después del comienzo del síndrome séptico. La comparación
45 entre el grupo de los paciente S y SEP se realizó con ayuda del test U no paramétrico de Mann Whitney y se calculó el valor de probabilidad (p). Los resultados se expresan mediante la relación de cuantificación relativa entre los ARNm del gen diana y los ARNm del gen de mantenimiento ciclofilina B. Los resultados se expresan mediante la media de las relaciones obtenidas para cada grupo de pacientes. El SEM (error estándar de la media) también se calculó para cada grupo. Los valores presentados en la tabla 1 son las medias obtenidas \pm el SEM. Los valores se consideraban
50 estadísticamente diferentes cuando el valor de p obtenido era inferior a 0,05.

Los pacientes SEP presentaban un nivel de expresión de los ARNm IL-10 y TNF α significativamente mayor con respecto a los voluntarios sanos S (respectivamente +10% y +4%). De manera sorprendente, los inventores también mostraron una supresión de los ARNm de HMG1 en pacientes SEP (+50%). Además los inventores demostraron que
55 el nivel de expresión de los ARNm T-bet era significativamente mayor con respecto a los voluntarios sanos S (+24%). Por el contrario, la expresión de los ARNm GATA3 era significativamente menor en los pacientes SEP con respecto a los voluntarios sanos S (-70%).

Conclusión - El estudio de la expresión de los ARNm de los genes que codifican T-bet y GATA3, pero también
60 HMG1 a partir de extracciones de sangre total permite de este modo el diagnóstico de un paciente que desarrolla un síndrome séptico.

65

Ejemplo 2

Análisis mediante RT PCR de la expresión de los genes IL-10, TGF β , HMG1, T-bet, IL-1 β , TNF α y GATA-3 para el pronóstico de un síndrome séptico

5

En otro momento, los inventores buscaron una herramienta para el pronóstico de un síndrome séptico durante las primeras 72 h después del comienzo de un choque séptico.

Para ello, se realizó un estudio en 42 pacientes SEP que desarrollan un síndrome séptico y admitidos en el servicio de reanimación quirúrgica y médica del centro hospitalario Lyon-Sud. Más exactamente, estos pacientes con síndrome séptico se seleccionaron durante las primeras 72 h después del comienzo de un choque séptico de acuerdo con los criterios de inclusión del American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine tal como se han definido anteriormente. Cada paciente se sometió a seguimiento durante un periodo máximo de 28 días. Se distinguiría entonces un grupo de 26 pacientes que desarrollan un síndrome séptico con pronóstico bueno (SEP-BP) y un grupo de 16 pacientes que desarrollan un síndrome séptico con pronóstico malo (SEP-MP).

15

Extracción de los ARN y síntesis de los ADNc - Esta etapa se realizó de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en el ejemplo 1.

Preparación de los patrones para la generación de los intervalos de cuantificación - Esta etapa se realizó de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en el ejemplo 1.

Análisis de la expresión de los ARNm mediante PCR en tiempo real - Esta etapa se realizó de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en el ejemplo 1.

25

Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2 a continuación.

30

TABLA 2

	Pacientes SEP-MP	Pacientes SEP-BP	p
IL-10	0,042 \pm 0,010	0,016 \pm 0,003	0,1
TNFα	0,103 \pm 0,028	0,069 \pm 0,017	0,22
IL-1β	1,147 \pm 0,530	0,928 \pm 0,117	0,14
HMG1	1,809 \pm 0,142	1,278 \pm 0,077	0,01
GATA3	0,006 \pm 0,001	0,009 \pm 0,001	0,25
T-bet	0,003 \pm 0,001	0,006 \pm 0,001	0,18
TGFβ	0,244 \pm 0,022	0,296 \pm 0,033	0,28

35

40

45

Esta tabla presenta el nivel de expresión de los ARNm IL-10, IL-1 β , TNF α , HMG1, GATA3, TGF β y T-bet en pacientes con pronóstico bueno (SEP- BP) y con pronóstico malo (SEP-MP) obtenidos a partir de extracciones de sangre total obtenidas durante los tres primeros días después del comienzo del choque séptico. La comparación entre el grupo de los pacientes con pronóstico bueno y con pronóstico malo se realizó con ayuda del test U no paramétrico de Mann Whitney y se calculó el valor de probabilidad (p). Los resultados se expresan mediante la relación de cuantificación relativa entre los ARNm del gen diana y los ARNm del gen de mantenimiento ciclofilina B. Los resultados se expresan mediante la media de las relaciones obtenidas para cada grupo de pacientes. El SEM (error estándar de la media) también se calculó para cada grupo. Los valores presentados en la tabla 2 son las medias obtenidas \pm el SEM. Los valores se consideraban estadísticamente diferentes cuando el valor de p obtenido era inferior a 0,05.

50

55

Los pacientes con pronóstico malo presentaban un nivel de expresión de los ARNm IL-10, TNF α y HMG1 mayor con respecto a los pacientes con pronóstico bueno. La diferencia era estadísticamente significativa para IL-10 y HMG1. Al contrario que IL-10, TNF α y HMG1, los pacientes con pronóstico malo tendían a presentar niveles de expresión de los ARNm GATA3, T-bet, IL-1 β y TGF β menores que los pacientes con pronóstico bueno.

60

Los inventores demostraron que el estudio de un perfil de expresión de varios genes permite obtener una herramienta de pronóstico del síndrome séptico y particularmente del choque séptico.

65

A este respecto, la tabla a continuación presenta un análisis de agrupamiento jerárquico de 36 pacientes SEP-BP y SEP-MP utilizando la expresión de 2 a 5 genes medidas durante los tres primeros días después del comienzo del

choque séptico. La función de agrupamiento jerárquico del programa Spotfire se utilizó para realizar este análisis. Los resultados utilizados para el análisis se expresan mediante la relación de cuantificación relativa entre los ARNm del gen diana y los ARNm del gen de mantenimiento ciclofilina B. Para tener en cuenta las diferencias constitutivas de expresión entre los genes, se normalizaron los niveles de expresión de cada gen calculando una variable centrada reducida. Para cada uno de los análisis realizados, se obtuvieron 2 sub-grupos, uno que agrupaba esencialmente pacientes con pronóstico malo (SEP-MP) y el otro, pacientes con pronóstico bueno (SEP-BP). La tabla 3 representa, para cada uno de los 2 grupos, el porcentaje de pacientes agrupados juntos, es decir el porcentaje de pacientes clasificado como MP que eran efectivamente de pronóstico malo y el porcentaje de pacientes clasificado como BP que eran efectivamente de pronóstico bueno.

TABLA 3

Genes analizados	% de pacientes SEP-MP bien clasificados	% de pacientes SEP-BP bien clasificados
TGF β , HMG1	82	68
TGF β , IL-1 β , HMG1 ^o	82	72
IL-10, TGF β , IL-1 β , HMG1	82	80
IL-10, TGF β , IL-1 β , HMG1, T-bet	82	80

Estos resultados muestran que el estudio simultáneo de la expresión de 2 genes seleccionados entre IL-10, TGF β , IL-1 β , HMG1, T-bet, TNF α y GATA3 y particularmente TGF β y HMG1, permite clasificar correctamente más del 80% de los pacientes SEP-MP. Se obtenían resultados comparables durante el estudio simultáneo de la expresión de 3 genes seleccionados entre IL-10, TGF β , IL-1 β , HMG1, T-bet, TNF α y GATA3 y particularmente TGF β , IL-1 β y HMG1, el estudio simultáneo de la expresión de 4 genes seleccionados entre IL-10, TGF β , IL-1 β , HMG1, T-bet, TNF α y GATA3 y particularmente TGF β , IL-1 β , IL-10 y HMG1, el estudio simultáneo de la expresión de 5 genes seleccionados entre IL-10, TGF β , IL-1 β , HMG1, T-bet, TNF α y GATA3 y particularmente TGF β , IL-1 β , IL-10, T-bet y HMG1.

Conclusión - El análisis del perfil de expresión de al menos dos genes seleccionados entre IL-10, TGF β , IL-1 β , HMG1, T-bet, TNF α y GATA3 a partir de extracciones de sangre total permite de este modo un pronóstico precoz de la supervivencia de los pacientes que presentan un síndrome séptico y que desarrollan particularmente un choque séptico. Más particularmente, el análisis de la expresión de un panel de genes que comprende al menos IL-10, IL-1 β , TGF- β y HMG1 permite discriminar muy eficazmente los pacientes con pronóstico bueno de los pacientes con pronóstico malo. Esto puede permitir al médico encargado de la reanimación identificar rápidamente a los pacientes con pronóstico malo y por lo tanto orientar la asistencia sanitaria de los pacientes hacia la utilización de tratamientos pesados y costosos.

Ejemplo 3

Análisis en chip de ADN de la expresión de los genes IL-10, TGF β , HMG1, T-bet, IL-1 β , TNF α y GATA-3 para el pronóstico de un síndrome séptico

Los resultados presentados en el ejemplo 2 se validaron mediante la utilización de otra técnica, aplicada en nuevas muestras de pacientes. Para ello, se realizó un estudio en 31 pacientes que desarrollan un síndrome séptico y admitidos en el servicio de reanimación quirúrgica y médica del centro hospitalario Lyon-Sud. Más exactamente, estos pacientes de síndrome séptico se seleccionaron entre el segundo y el cuarto día después del comienzo de un choque séptico de acuerdo con los criterios de inclusión del American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine tal como se han definido anteriormente. Cada paciente se sometió a seguimiento durante un periodo máximo de 28 días. Se distinguiría entonces un grupo de 21 pacientes que desarrollan un síndrome séptico con pronóstico bueno (SEP-BP) y un grupo de 10 pacientes que desarrollan un síndrome séptico con pronóstico malo (SEP-MP).

Extracción de los ARNm - Esta etapa se realizó de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en el ejemplo 1.

Análisis de la expresión de los ARNm en chip de ADN - se realizó una síntesis de ADNc y después ADN de doble cadena, a partir de los ARN extraídos. A continuación, se utilizaron los ADN de cadena doble como base para una transcripción in vitro durante la cual se realiza en marcado de los ARNc. A continuación, se hibridaron los ARNc en el chip. El escáner permitía la lectura de la fluorescencia.

Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 1. En el dendograma se encuentran 31 columnas que corresponden a las 31 muestras de pacientes y 5 líneas que corresponden a las 5 sondas utilizadas para el análisis de la expresión de los 5 genes diana. Las muestras, así como los genes que tienen un perfil de expresión comparable, demostrado mediante una correlación de tipo Pearson, se colocaron unos al lado de otros. Las muestras se clasificaron de acuerdo con el método de media no ponderada (Spotfire Decision Site for Functional Genomics V7.1, manual) mientras que los genes se clasificaron según el valor medio de expresión obtenido en el conjunto de las muestras. Después de la normalización de las señales de fluorescencia generadas por el programa Microarray Suite (MAS5.0, Affymetrix), el nivel de expresión se representa mediante diferentes niveles de color. De este modo, el color blanco corresponde a un nivel reducido de expresión, el color gris corresponde a un nivel de expresión intermedio, mientras que el color negro corresponde a un alto nivel de expresión. La longitud de las ramas del dendograma se correlaciona con el perfil de expresión y la línea de puntos que divide el dendograma permite distinguir dos grupos de pacientes: un primer grupo de pacientes con pronóstico malo "SEP-MP" y un segundo grupo de pacientes con pronóstico bueno "SEP-BP".

Estos resultados mostraban que el estudio simultáneo de la expresión de 5 genes seleccionados entre IL-10, TGF β , IL-1 β , HMG1, T-bet, TNF α y GATA3 y particularmente TGF β , IL-1 β , IL-10, T-bet y HMG1 permiten clasificar correctamente el 70% de los pacientes. Los inventores también demostraron que el estudio de un perfil de expresión de varios genes tal como se ha definido en el ejemplo 2 para pacientes durante las primeras 72 h después del comienzo de un choque séptico, también era aplicable para pacientes entre el segundo y el cuarto día después del comienzo de un choque séptico.

Conclusión - El análisis del perfil de expresión de al menos dos genes seleccionados entre IL-10, TGF β , IL-1 β , HMG1, T-bet, TNF α y GATA3 a partir de extracciones de sangre total permite de este modo un pronóstico de la supervivencia de los pacientes durante las primeras 72 h después del comienzo de un choque séptico, pero también entre el segundo y el cuarto día después del comienzo de un choque séptico. Más particularmente, el análisis de la expresión de un panel de genes que comprende al menos IL-10, IL-1 β , TGF- β y HMG1 permite discriminar muy eficazmente los pacientes con pronóstico bueno de los pacientes con pronóstico malo, al comienzo del choque séptico y varios días después. Esto puede permitir al médico encargado de la reanimación identificar rápidamente a los pacientes con pronóstico malo y por lo tanto orientar la asistencia sanitaria de los pacientes hacia la utilización de tratamientos pesados y costosos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico y/o de pronóstico de un síndrome séptico de acuerdo con el cual:

- 5 a) se dispone de una muestra biológica del paciente y se extraen los ácidos nucleicos de la muestra biológica
- b) se dispone de al menos cinco reactivos específicos seleccionados entre los siguientes reactivos específicos: reactivo específico del gen diana IL-10, reactivo específico del gen diana TGF β , reactivo específico del gen diana HMG1, reactivo específico del gen diana IL-1 β y reactivo específico del gen diana T-bet
- 10 c) se determina la expresión de al menos cinco genes diana seleccionados entre: IL-10, TGF β , HMG1, T-bet e IL-1 β .

15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre.

3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el reactivo específico de IL-10 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana IL-10, el reactivo específico de TGF β comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana TGF β , el reactivo específico de HMG1 comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana HMG1, el reactivo específico de IL-1 β comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana IL-1 β y/o el reactivo específico de T-bet comprende al menos un cebador de amplificación específico del gen diana T-bet.

20

4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el reactivo específico de IL-10 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana IL-10, el reactivo específico de TGF β comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana TGF β , el reactivo específico de HMG1 comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana HMG1, el reactivo específico de IL-1 β comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana IL-1 β y/o el reactivo específico de T-bet comprende al menos una sonda de hibridación específica del gen diana T-bet.

25

30

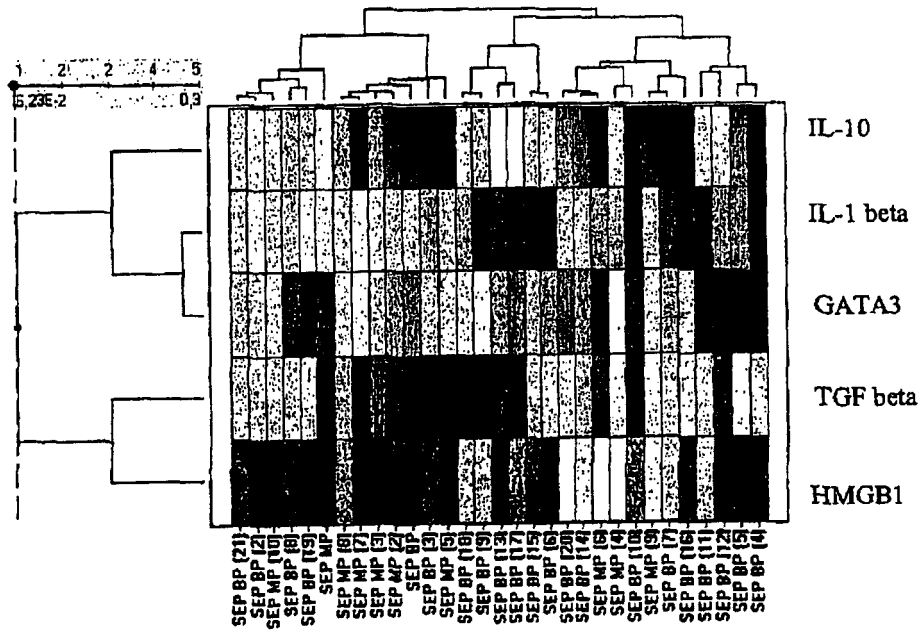


FIGURA 1