

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 918 777**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2015** **PCT/CA2015/000160**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015** **WO15135071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2015** **E 15761149 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2022** **EP 3117030**

54 Título: **Diagnóstico para la sepsis**

30 Prioridad:

14.03.2014 US 201461953458 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2022

73 Titular/es:

HANCOCK, ROBERT, E.W. (100.0%)
4470 Maple Crescent
Vancouver, British Columbia V6J 4B3, CA

72 Inventor/es:

BOYD, JOHN;
HANCOCK, DAVID G.;
PENA SERRATO, OLGA M. y
HANCOCK, ROBERT E. W.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 918 777 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico para la sepsis

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las herramientas diagnósticas y, en particular, a un grupo único de secuencias de ADN que en combinación permiten el diagnóstico precoz de sepsis grave y la predicción de sepsis grave y/o el fallo orgánico inducido por la sepsis grave.

10

Antecedentes de la invención

15

La sepsis continúa siendo la causa asociada a infección más importante a escala global, ya que se estima que lleva a 8,5 % de las muertes (5 millones) al año [Angus D. et al., Critical Care Medicine 2001; 29(7): 1303-10; Kumar G, Kumar N, Taneja A, et al. Chest 2011; 140:1223-31]. A pesar de los avances de la medicina moderna, entre ellos los nuevos antibióticos y vacunas, la identificación precoz y los tratamientos basados en las mejores prácticas, y el buen equipamiento y eficiencia de las unidades de cuidados intensivos [Angus D et al.], se ha mantenido una elevada tasa de mortalidad, ~30 %, con pocos cambios durante décadas [Daniels R. J. Antimicrobial Chemotherapy 2011; 66(supl. 2): ii11-ii23].

20

25

Las endotoxinas bacterianas (entre ellas, LPS) son inductores potentes de inflamación y se ha propuesto que son inductores de sepsis, la causa de una tormenta de citoquinas potencialmente letal temprana y de choque séptico [Oapl SM. Contributions to Nephrology 2010; 167: 14-24; Salomao R, et al. Shock 2012; 38:227-42]. En contraste, LPS también puede generar el efecto contrario, conocido como tolerancia a endotoxinas, definida como una capacidad gravemente reducida de las células de responder a LPS y otros productos bacterianos durante una segunda exposición al estímulo [Otto G.P. et al., Critical Care 2011; 15:R183]. Es importante señalar que la tolerancia a endotoxinas, también denominada reprogramación celular, ya que puede ser inducida por otras moléculas microbianas, no es un estado antiinflamatorio de las células, sino una reprogramación de las células de manera que ya no son capaces de responder a múltiples firmas microbianas, incluyendo las endotoxinas.

30

35

Se ha propuesto que la tolerancia a endotoxinas podría estar asociada al estado inmunosupresor que se ha observado principalmente durante la sepsis grave de estadio tardío [Otto G.P. et al., 2011; Cavaillon J, et al. J. Endotoxin Res. 2005; 11(5): 311-20; Cavaillon J, Adib-Conquy M. Critical Care Medicine 2006; 10:233]. Sin embargo, dicha relación todavía no ha sido bien caracterizada, en parte debido a las limitaciones de los ensayos ex vivo de citoquinas utilizados actualmente. A pesar de estas observaciones, el dogma clínico es identificar y tratar la sepsis, especialmente en sus estadios tempranos, como una respuesta inflamatoria excesiva. Sin embargo, el estado inmunosupresor único que es característico de la sepsis está inherentemente asociado al pronóstico de esta enfermedad. En efecto, la comprensión del equilibrio relativo entre inflamación excesiva e inmunosupresión, y especialmente en qué momento se desarrolla cada uno durante el curso clínico de la enfermedad, es un paso importante hacia la mejora de los resultados clínicos de la sepsis.

40

45

Se han propuesto biomarcadores para el diagnóstico de la sepsis en la patente US nº 7.767.395; solicitud publicada de patente US nº 2011/0312521; solicitud publicada de patente US nº 2011/0076685; solicitud publicada de patente internacional nº WO 2014/209238 y solicitud publicada de patente internacional nº WO 2013/152047. Se da a conocer un método para determinar el riesgo de desarrollar síndrome de disfunción multiorgánica en un sujeto mediante la utilización de biomarcadores en la patente nº EP 2520662.

50

Dicha información de antecedentes se proporciona con el fin de divulgar información que el solicitante considera que es posiblemente relevante para la presente invención. No se pretende necesariamente ninguna admisión, ni debe interpretarse, de que parte alguna de la información anterior constituye técnica anterior frente a la presente invención.

Descripción resumida de la invención

55

60

La presente invención se refiere de manera general a una herramienta diagnóstica para la sepsis grave temprana. De acuerdo con lo anterior, se da a conocer en la presente memoria un método para diagnosticar la sepsis en un sujeto, en el que el método comprende determinar en una muestra biológica obtenida del sujeto un nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de genes de firma de tolerancia a endotoxinas a fin de proporcionar una firma génica de la muestra, y comparar la firma génica de la muestra con una firma génica de referencia, en la que la firma génica de referencia representa un nivel de expresión estándar de cada uno de la pluralidad de genes, en la que una diferencia entre la firma génica de la muestra y la firma génica de referencia indica que el sujeto presenta sepsis.

65

En la presente memoria se da a conocer, además, un método para identificar un sujeto en riesgo de desarrollar sepsis grave, que comprende determinar en una muestra biológica obtenida del sujeto un nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de genes de firma de tolerancia a endotoxinas a fin de proporcionar una firma génica de la muestra, y comparar la firma génica de la muestra con una firma génica de referencia, en la que la firma génica de referencia representa un nivel de expresión estándar de cada uno de la pluralidad de genes, en la que una diferencia entre la

firma génica de la muestra y la firma génica de referencia indica que el sujeto está en riesgo de desarrollar sepsis grave.

Además, en la presente memoria se da a conocer un método para identificar un sujeto en riesgo de desarrollar insuficiencia orgánica, que comprende determinar en una muestra biológica obtenida del sujeto un nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de genes de firma de tolerancia a endotoxinas a fin de proporcionar una firma génica de la muestra, y comparar la firma génica de la muestra con una firma génica de referencia, en la que la firma génica de referencia representa un nivel de expresión estándar de cada uno de la pluralidad de genes, en la que una diferencia entre la firma génica de la muestra y la firma génica de referencia indica que el sujeto está en riesgo de desarrollar insuficiencia orgánica.

De esta manera, en un aspecto, la invención se refiere a un método para diagnosticar (i) sepsis grave, o (ii) riesgo de desarrollar sepsis grave, o (iii) riesgo de insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave, en un sujeto, en el que el método comprende determinar en una muestra biológica obtenida del sujeto, un nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de por lo menos seis genes de firma de tolerancia a endotoxinas (FTE) para proporcionar una firma génica de la muestra, y comparar la firma génica de la muestra con una firma génica de referencia, en la que la firma génica de referencia representa un nivel de expresión estándar de cada uno de la pluralidad de genes, en la que una diferencia entre la firma génica de la muestra y la firma génica de referencia indica que el sujeto presenta sepsis grave o está en riesgo de desarrollar sepsis grave o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave, en la que la pluralidad de genes se selecciona de entre ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes se selecciona de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes se selecciona de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes consiste en C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En la presente memoria se da a conocer un método para diagnosticar la tolerancia a endotoxinas en un sujeto, en el que el método comprende: a) determinar en una muestra biológica obtenida del sujeto el nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de genes seleccionados de entre ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN, proporcionando una firma génica de la muestra, y b) comparar la muestra génica de la muestra con una firma génica de referencia, en la que la firma génica de referencia representa un nivel de expresión estándar de cada uno de la pluralidad de genes, en la que una diferencia entre la firma génica de la muestra y la firma génica de referencia indica que el sujeto presenta tolerancia a endotoxinas.

La pluralidad de genes puede seleccionarse de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

La pluralidad de genes puede comprender C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

La pluralidad de genes puede consistir en C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En otro aspecto, la invención se refiere a un antibiótico para la utilización en el tratamiento de un sujeto que se ha diagnosticado que presenta sepsis grave mediante el método de la invención descrito anteriormente.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a un antibiótico para la utilización en la reducción del riesgo de insuficiencia orgánica en un sujeto que se ha diagnosticado que presenta sepsis grave o que está en riesgo de desarrollar sepsis grave mediante el método de la invención descrito anteriormente.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas para la utilización en el tratamiento de un sujeto que se ha diagnosticado que presenta sepsis grave o que está en riesgo de desarrollar sepsis grave mediante el método de la invención descrito anteriormente, en el que el agente comprende células inmunitarias, o el agente es interferón gamma, un oligonucleótido (ODN) CpG, una combinación de un ODN CpG con IL-1, un anticuerpo anti-CD40, un inhibidor de STAT3, un inhibidor de STAT6, un inhibidor de p50, un inhibidor de NFκB, un inhibidor de IKKβ, una imidazoquinolona o ácido zoledrónico.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas para la utilización en la reducción del riesgo de insuficiencia orgánica en un sujeto que se ha diagnosticado que presenta sepsis grave o que está en riesgo de desarrollar sepsis grave mediante el método de la invención descrito anteriormente, en el que el agente comprende células inmunitarias, o el agente es interferón gamma, un oligonucleótido (ODN) CpG, una combinación de un ODN CpG con IL-1, un anticuerpo anti-CD40, un inhibidor de STAT3, un inhibidor de STAT6, un inhibidor de p50, un inhibidor de NFκB, un inhibidor de IKKβ, una imidazoquinolona o ácido zoledrónico.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para identificar un agente candidato para el tratamiento de (i) sepsis grave o (ii) insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave, en el que el método comprende: a) poner en contacto una célula tolerante a endotoxinas con un agente de ensayo, b) determinar el nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de por lo menos seis genes de firma de tolerancia a endotoxinas en la célula tolerante a endotoxinas para proporcionar una firma de expresión, en la que la pluralidad de genes se selecciona de entre ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN, c) comparar la firma de expresión con una firma de expresión de referencia, en la que la Firma de referencia representa los niveles de expresión de la pluralidad de genes en una célula normal, y d) seleccionar el agente de ensayo como agente candidato para el tratamiento de la sepsis grave o la insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave en el caso de que la firma de expresión se corresponda sustancialmente con la firma de referencia.

40 En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes se selecciona de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

45 En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes comprende C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

50 En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes consiste en C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

55 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para determinar el nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de genes seleccionados de entre ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN en una muestra, en el que el kit consiste esencialmente en sondas específicas génicas para 6 a 99 genes, en el que cada una de las sondas específicas génicas es capaz de detectar un producto de expresión de un gen respectivo de la pluralidad de genes o complemento del mismo.

65 En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes se selecciona de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF,

CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes consiste esencialmente en C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes consiste en C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En otro aspecto, la invención se refiere a una micromatriz para detectar la expresión de una pluralidad de genes de Firma de tolerancia a endotoxinas en una muestra, en el que la micromatriz consiste esencialmente en una pluralidad de 6 a 99 sondas polinucleótidas unidas a un soporte sólido, en el que cada una de las sondas polinucleótidas es capaz de hibridarse específicamente con un producto de expresión de un gen respectivo de la pluralidad de genes o complemento del mismo, en el que la pluralidad de genes se selecciona de entre ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes se selecciona de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes consiste esencialmente en C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de genes consiste en C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

Breve descripción de las figuras

Estas características y otras de la invención resultarán más evidentes en la descripción detallada siguiente, en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos.

La FIGURA 1 muestra una representación esquemática del método utilizado para definir la Firma de tolerancia a endotoxinas y la Firma inflamatoria. La Firma de tolerancia a endotoxinas se ha definido como 99 genes que se expresan diferencialmente de manera exclusiva en las PBMC tolerantes a endotoxinas, pero no en las PBMC inflamatorias, en comparación con controles (factor de cambio >2, valor de $p < 0,05$). La Firma inflamatoria se ha definido como una firma de 93 genes mediante la selección de los genes que se expresan diferencialmente de modo consistente en un conjunto de datos de endotoxemias *in vivo*.

La FIGURA 2 demuestra que el reanálisis de la expresión génica diferencial en pacientes de sepsis procedente de datos publicados muestra una fuerte asociación con la Firma de tolerancia a endotoxinas. Se utilizó un enfoque de ensayo de grupos de genes, ROAST, para caracterizar el enriquecimiento de "Tolerancia a endotoxinas" en pacientes de sepsis frente a controles en 9 conjuntos de datos anteriormente publicadas. Todos los conjuntos de datos contenían pacientes de sepsis reclutados el día 1 o 3 después de la admisión en la UCI y se habían comparado con controles "sanos". El análisis del grupo de genes ROAST se realizó con 99999 rotaciones de manera que el valor de p más significativo que resultó de este análisis fue 0,00001. Se representaron gráficamente los valores de p del análisis de grupo de genes ROAST como $\log(1 / \text{valor de } p)$, aunque se muestran los valores de p no transformados para facilitar la visualización.

La FIGURA 3 muestra que los pacientes de sepsis de los conjuntos de datos publicados generalmente mostraron una asociación menos significativa con la Firma inflamatoria. Se utilizó un enfoque de ensayo de grupos de genes, ROAST, para caracterizar el enriquecimiento de la firma inflamatoria (blanco) respecto a la Firma de tolerancia a endotoxinas (gris) en pacientes de sepsis frente a controles en 9 conjuntos de datos anteriormente publicadas. Todos los conjuntos de datos contenían pacientes de sepsis reclutados el día 1 y/o 3 después de la admisión en la UCI y se habían comparado con controles "sanos". El análisis del grupo de genes ROAST se realizó con 99999 rotaciones de manera que el valor de p más significativo que resultó de este análisis fue 0,00001. Se representaron

gráficamente los valores de p del análisis de grupo de genes ROAST como $\log(1 / \text{valor de } p)$, aunque se muestran los valores de p no transformados para facilitar la visualización.

La FIGURA 4 revela que la asociación entre tolerancia a endotoxinas y sepsis es independiente del método específico utilizado para definir la Firma de tolerancia a endotoxinas. Se identificaron diferentes firmas relacionadas con tolerancia a endotoxinas basándose en genes expresados diferencialmente de manera exclusiva en PBMC tolerantes a endotoxinas, pero no en PBMC inflamatorias, en comparación con controles en diversos valores de corte de factor de cambio (FC) y de valor de P. Los conjuntos de datos fueron los indicados en la leyenda de la fig. 3, excepto el conjunto de datos de sec. de ARN del Día 0, que se describe en la presente memoria. La Firma de tolerancia a endotoxinas final se definió en los valores de corte de factor de cambio (FC) y de valor de P de 2 y 0,05, respectivamente.

La FIGURA 5 muestra que la Firma de tolerancia a endotoxinas está fuertemente asociada a los pacientes de sepsis en la primera presentación clínica. Se utilizó un enfoque de análisis de conjunto de genes para caracterizar el enriquecimiento, vs. controles, de las firmas de Tolerancia a endotoxinas e Inflamatoria en pacientes de sepsis prospectivos procedentes de una única cohorte del estudio de los presentes inventores a la primera sospecha clínica de sepsis (es decir, generalmente en sala de urgencias antes de la admisión a la UCI). Seguidamente se definieron los grupos de pacientes basándose en características clínicas retrospectivas tales como 'Sepsis' o 'No sepsis' consistentes con los criterios actuales de sepsis (Tabla 3). Se llevaron a cabo análisis mediante comparación del grupo de 'sepsis' y 'no sepsis' vs. controles (a) y del grupo de 'sepsis' vs. el grupo de 'no sepsis' (b). Además, también se analizó el enriquecimiento de la firma basándose en resultados de cultivos microbianos en el grupo 'Sepsis' (c) y en el grupo 'No sepsis' (d).

La FIGURA 6 muestra que la Firma de tolerancia a endotoxinas está fuertemente asociada a los pacientes de sepsis en la primera presentación clínica y que está asociada a la gravedad de la enfermedad y a la insuficiencia orgánica. Se utilizó un enfoque de análisis de grupos de genes para caracterizar el enriquecimiento, frente a controles quirúrgicos, de las firmas de Tolerancia a endotoxinas e Inflamatoria en pacientes de sepsis prospectivos tal como se indica para la figura 5. (a) Los pacientes se agruparon en grupos individual-, combinado- (3+), tipo individual de insuficiencia orgánica y ausencia de insuficiencia orgánica. (b) Los pacientes se agruparon en aquellos que requerían y aquellos que no requerían transferencia a la UCI.

La FIGURA 7 muestra un grupo nuclear de genes de tolerancia a endotoxinas característico de los pacientes de sepsis. Se identificó un grupo nuclear de 31 de entre los 99 genes de la Firma de tolerancia a endotoxinas, basándose en los genes expresados diferencialmente de forma más frecuente, observados en todos los estudios de pacientes de sepsis (de la literatura y de conjuntos de datos de los presentes inventores). Para una mejor comparación visual de los diferentes estudios, cada conjunto de datos individual se transformó adicionalmente mediante la división de los valores de expresión génica en seis conjuntos iguales. Los datos se presentan como un mapa térmico en el que el sombreado más claro y el más oscuro representan cambios relativamente grandes y relativamente pequeños de expresión, respectivamente. La diferenciación resultó más evidente en el mapa térmico de colores.

La FIGURA 8 muestra una subred de genes de la Firma de tolerancia a endotoxinas identificada mediante la utilización del complemento j-Activemodules de Cytoscape. En primer lugar, se creó una red mediante la inclusión de los interactores de primer nivel de los genes indicados en la Tabla 1 y después se sometió a análisis mediante la utilización de j-Activemodules, que identifica las subredes particularmente densas (es decir, altamente interconectadas). Los nodos (genes) oscuros están altamente desregulados, y los nodos claros son interactores directos de los genes desregulados; las líneas representan "bordes" e indican las interacciones demostradas experimentalmente. El hecho de que 60 de los 99 genes en la firma están estrechamente interconectados en la célula humana implica una relación biológicamente significativa entre estos genes; es decir, estos genes están corregulados o participan en un destino común en la célula. Resultan evidentes dentro de la red las proteínas de nodo central ('hub') (proteínas altamente interconectadas centrales que participan en la señalización y tráfico celular), incluyendo la serpin A1, los factores de transcripción CEBP α , β , EGR2, HNF4A, CXCL10 y FCER2, así como los factores de transcripción de inmunidad innata principales NF κ B1, IRF1, STAT6, JUN y FOS, y el receptor TLR4 (no desregulados), que sugieren su potencial participación en la tolerancia a endotoxinas.

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se ha identificado una firma génica única que es característica de la tolerancia a endotoxinas (una "Firma de tolerancia a endotoxinas") que podría utilizarse en el diagnóstico de la sepsis. La Firma de tolerancia a endotoxinas es capaz de diferenciar entre los pacientes de sepsis sospechados que progresaron o no progresaron al desarrollo de sepsis, y también para predecir la insuficiencia orgánica.

De esta manera, se dan a conocer en la presente memoria métodos de diagnóstico de la tolerancia a endotoxinas en un sujeto, por ejemplo, un paciente que es conocido o que se sospecha que presenta sepsis, utilizando la Firma de tolerancia a endotoxinas descrita en la presente memoria. La presencia de tolerancia a endotoxinas se ha mostrado que es una indicación de que un paciente presenta sepsis, y es además una indicación de que el paciente está en riesgo de desarrollar sepsis grave y/o insuficiencia orgánica. Determinadas realizaciones de la invención se refieren a métodos de diagnóstico de la sepsis grave en un sujeto mediante la utilización de la Firma de tolerancia a endotoxinas descrita en la presente memoria. Algunas realizaciones se refieren a métodos para predecir si un sujeto está en riesgo de desarrollar sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave mediante la utilización de la Firma de tolerancia a endotoxinas descrita en la presente memoria.

Tal como se indica en la presente memoria, la disfunción inmunitaria mediada por la tolerancia a endotoxinas se ha determinado que está presente de una manera predominante con la primera presentación y durante todo el curso clínico de la enfermedad. Los datos proporcionados en la presente memoria redefinen la sepsis como una enfermedad

caracterizada por la disfunción inmunitaria mediada por tolerancia a endotoxinas en todos los estadios de la enfermedad clínica y, de esta manera, identifica la tolerancia a endotoxinas como una diana terapéutica potencial en la sepsis temprana y tardía.

De esta manera, en la presente memoria se dan a conocer métodos de tratamiento de los pacientes en que se ha identificado la presencia de tolerancia a endotoxinas, por ejemplo, mediante la utilización de los métodos diagnósticos descritos en la presente memoria, con el fin de reducir el riesgo de que desarrollen sepsis, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica. Determinadas realizaciones se refieren a un agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas para la utilización en el tratamiento de pacientes que presentan sepsis grave.

Definiciones

Determinadas realizaciones de la invención se refieren a métodos de identificación de agentes candidatos para el tratamiento de la sepsis grave o la insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave mediante la utilización de la Firma de tolerancia a endotoxinas descrita en la presente memoria.

Por conveniencia, se proporciona a continuación el significado de determinados términos y expresiones utilizados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. Las definiciones no pretenden ser de naturaleza limitativa y sirven únicamente para facilitar la comprensión de determinados aspectos de la invención. A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención.

El término "pluralidad" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a más de uno, por ejemplo, a dos o más, tres o más, cuatro o más y similares.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende secuencias codificantes necesarias para producir un polipéptido o precursor. Las secuencias de control que dirigen y/o controlan la expresión de las secuencias codificantes también pueden estar comprendidas en el término "gen" en algunos casos. El polipéptido o precursor puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por una parte de la secuencia codificante. Un gen puede contener una o más modificaciones en las regiones codificante o en las regiones no traducidas que podrían afectar a la actividad biológica o a la estructura química del polipéptido o precursor, a la tasa de expresión o al modo de control de la expresión. Entre dichas modificaciones se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, mutaciones, inserciones, deleciones y sustituciones de uno o más nucleótidos, incluyendo polimorfismos de nucleótido único que pueden ocurrir naturalmente en la población. El gen puede constituir una secuencia codificante no interrumpida o puede incluir una o más subsecuencias. El término "gen" tal como se utiliza en la presente memoria incluye variantes de los genes identificados en la Tabla 1.

Las expresiones "perfil de expresión génica" o "firma génica" se refieren a un grupo de genes expresados por una célula o tipo celular particular, en el que la expresión de los genes juntos, o la expresión diferencial de dichos genes, es indicativa y/o predictiva de una determinada condición, tal como la sepsis.

La expresión "ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula que comprende uno o más nucleótidos, por ejemplo, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o ambos. El término incluye monómeros y polímeros de nucleótidos, en el que los nucleótidos que se unen entre sí, en el caso de los polímeros, en secuencia, típicamente mediante enlaces 5' a 3', aunque también se encuentran contemplados enlaces alternativos en algunas realizaciones. Los polímeros de nucleótidos pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. Los nucleótidos pueden ser naturales o pueden ser análogos producidos sintéticamente que son capaces de formar relaciones de pares de bases con pares de bases naturales. Entre los ejemplos de bases no naturales que son capaces de formar relaciones de apareamiento de bases se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, análogos de pirimidina aza y deaza, análogos de purina aza y deaza, y otros análogos de base heterocíclica, en los que uno o más de los átomos de carbono y de nitrógeno de los anillos de pirimidina han sido sustituidos por heteroátomos, p. ej., oxígeno, azufre, selenio, fósforo y similares.

El término "correspondiente" y variaciones gramaticales del mismo tal como se utilizan en la presente memoria con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos indica que la secuencia de ácidos nucleicos es idéntica a la totalidad o a una parte de una secuencia de ácidos nucleicos de referencia. Por el contrario, el término "complementario" se utiliza en la presente memoria para indicar que la secuencia de ácidos nucleicos es idéntica a la totalidad o una parte de la cadena complementaria de la secuencia de ácidos nucleicos de referencia. A título ilustrativo, la secuencia de ácidos nucleicos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y su complementario a una secuencia de referencia "GTATA". Tal como se utiliza en la presente memoria, "complemento del mismo" se refiere a un ácido nucleico que es complementario en secuencia de nucleótidos a un ácido nucleico de referencia. El complemento de

un ARN puede ser una secuencia polinucleótida de ARN o una secuencia polinucleótida de ADN. El complemento de un polinucleótido de ADN puede ser un polinucleótido de ARN o un polinucleótido de ADN.

La expresión "expresión diferencial" se refiere a diferencias cuantitativas y/o cualitativas en la expresión de un gen o de una proteína en tejido o células enfermas respecto a tejido o células normales. Por ejemplo, un gen expresado diferencialmente puede tener su expresión activada o completamente inactivada en condiciones normales frente a condiciones de enfermedad, o puede estar regulado positivamente (sobreexpresado) o regulado negativamente (infraexpresado) en una condición de enfermedad frente a una condición normal. En otras palabras, un gen o proteína se expresa diferencialmente en el caso de que la expresión del gen o proteína se produzca a un nivel más alto o más bajo en los tejidos o células enfermas de un paciente respecto al nivel de su expresión en los tejidos o células normales (libres de enfermedad) del paciente y/o en tejidos o células de control.

La expresión "muestra biológica" se refiere a una muestra obtenida de un organismo (p. ej., un paciente humano) o de componentes (p. ej., células) de un organismo. La muestra puede ser cualquier tejido o líquido biológico relevante. La muestra puede ser una "muestra clínica" que sea una muestra derivada de un paciente. Entre dichas muestras se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, esputo, sangre, células sanguíneas (p. ej., leucocitos), líquido amniótico, plasma, semen, médula ósea, y muestras de biopsia de tejido o de aguja fina, orina, líquido peritoneal y líquido pleural, o células de los mismos. Entre las muestras biológicas pueden incluirse además secciones de tejidos, tales como secciones congeladas obtenidas con fines histológicos. Una muestra biológica también puede denominarse "muestra de un paciente".

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "que comprende", "que presenta", "que incluye" y "que contiene" y variaciones gramaticales de las mismas son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos y/o etapas de método adicionales, no indicadas. La expresión "que consiste esencialmente en" en el caso de que se utilice en la presente memoria en relación a una composición, utilización o método, denota que pueden encontrarse presentes elementos y/o etapas de método adicionales, aunque dichas adiciones no afectan materialmente a la manera en que funciona la composición, método o uso indicado. La expresión "que consiste en" en su utilización en la presente memoria en relación a una composición, utilización o método, excluye la presencia de elementos y/o etapas de método adicionales. Una composición, utilización o método descrito en la presente memoria que comprende determinados elementos y/o etapas puede consistir esencialmente, además, en determinadas realizaciones, aquellos elementos y/o etapas, y en otras realizaciones consiste en aquellos elementos y/o etapas, se haga referencia específica o no a dichas realizaciones.

Se encuentra contemplado que cualquier realización comentada en la presente memoria pueda implementarse con respecto a cualquiera de los métodos, utilizaciones o composiciones dadas a conocer de la invención, y viceversa.

Sepsis

La "sepsis" se refiere generalmente a una respuesta clínica a una infección sospechada o documentada. La sepsis puede definirse, por ejemplo, como incluyendo dos o más de los síntomas siguientes: taquipnea o taquicardia; leucocitosis o leucopenia, e hipertermia o hipotermia, y puede manifestarse como un trastorno infeccioso e inmunitario. Muchos otros síntomas pueden producirse o no producirse y han sido definidos en reuniones de consenso de médicos Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Chest 2009; 136(5 suppl):e28; sin embargo, ninguno de dichos síntomas son específicos de la sepsis. La sepsis puede verse complicada por insuficiencia orgánica y puede requerir la administración en una unidad de cuidados intensivos, en cuyo caso se denomina "sepsis grave". En el caso de que un paciente, con frecuencia en la sala de urgencia, muestre algunos de los síntomas tempranos asociados a la sepsis, con frecuencia se le considera un paciente con sospecha de sepsis, que activa un protocolo hospitalario especial para el tratamiento. sin embargo, solo retrospectivamente, tras 24 a 48 horas, una vez se ha confirmado la infección mediante pruebas microbiológicas o el paciente muestre síntomas graves, incluyendo la insuficiencia de uno o más órganos, se confirma que han sido pacientes de "sepsis en estadio temprano" (ver revisión en Lyle NH, et al., Annals of the New York Academy of Sciences 2014, 1323:101-14).

Firma de tolerancia a endotoxinas

En la presente memoria se da a conocer una pluralidad de genes regulados durante la sepsis, el perfil de expresión de los cuales sirve para definir la tolerancia a endotoxinas en el sujeto. Las diferencias de expresión de dichos genes, sea la regulación positiva o negativa según el gen en cuestión, en comparación con un control define una firma génica que es indicativa de tolerancia a endotoxinas (una "Firma de tolerancia a endotoxinas"). Los genes de la firma de tolerancia a endotoxinas (GFTE) que pueden estar comprendidos en una Firma de tolerancia a endotoxinas de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención se proporcionan en la Tabla 1.

Las secuencias de dichos genes pueden ser fácilmente obtenidas por el experto en la materia a partir de bases de datos disponibles públicamente, tales como la base de datos GenBank mantenida por el National Center for Biotechnology (NCBI), por ejemplo, mediante la búsqueda con los símbolos génicos proporcionados. Dichos símbolos génicos son universalmente reconocidos por todas las bases de datos, incluyendo HGNC, Entrez Gene,

UniProtKB/Swiss-Prot, OMIM, GeneLoc y Ensembl; todos los alias están definidos en la base de datos Gene Cards. Las secuencias génicas representativas disponibles de GenBank se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1: genes representativos de Firma de tolerancia a endotoxinas (GFTE)

Símbolo génico	Descripción	GenBank RefSeq nº	Regulación positiva (+) o negativa (-)
ADAM15	Dominio 15 de metalopeptidasa ADAM	NP_001248393.1	-
ADAMDEC1	Proteína similar a ADM, decisina 1	NP_001138743.1	+
ALCAM	Molécula de adhesión celular de leucocitos activada	NP_001230209.1	-
ALDH1A1	Miembro 1 de la familia de la aldehído deshidrogenasa 1	NP_000680.2	-
ANKRD1	Dominio 1 de repetición de anquirina (músculo cardíaco)	NP_055206.2	+
C19orf59	Marco de lectura abierta 59 del cromosoma 19	NP_777578.2	+
CA12	Anhidrasa carbónica XII	NP_001209.1	+
CAMP	Péptido antimicrobiano catelicidina	NP_004336.3	-
CCL1	Ligando 1 de quimioquina (motivo C-C); SCYA1	NP_002972.1	+
CCL19	Ligando 19 de quimioquina (motivo C-C); MIP3β	NP_006265.1	+
CCL22	Ligando 22 de quimioquina (motivo C-C); MDC	NP_002981.2	+
CCL24	Ligando 24 de quimioquina (motivo C-C); Eotaxina-2	NP_002982.2	+
CCL7	Ligando 7 de quimioquina (motivo C-C)	NP_006264.2	+
CD14	Molécula CD14	NP_000582.1	+
CD300LF	Miembro F de la familia de moléculas similares a CD300	NP_001276011.1	+
CD93	Molécula CD93	NP_036204.2	+
CDK5RAP2	Proteína 2 asociada a la subunidad reguladora de CDK5	NP_001011649.1	+
CPVL	Carboxipeptidasa, tipo vitelogénico	NP_061902.2	-
CST3	Cistatina C	NP_000090.1	-
CST6	Cistatina E/M	NP_001314.1	-
CTSK	Catepsina K	NP_000387.1	-
CXCL10	Ligando 10 de quimioquina (motivo C-X-C)	NP_001556.2	-
CYP1B1	Polipéptido 1, subfamilia B, familia 1, citocromo P450	NP_000095.2	+
CYP27B1	Polipéptido 1, subfamilia B, familia 27, citocromo P450	NP_000776.1	+
DDIT4	Transcrito 4 inducible por daño en el ADN	NP_061931.1	+
DHRS9	Miembro 9 de deshidrogenasa/reductasa (familia SDR)	NP_001135742.1	
DPYSL3	Molécula 3 similar a dihidropirimidinasa	NP_001184223.1	+
EGR2	Proteína 2 de respuesta de crecimiento temprano	NP_000390.2	+
EMR1	Proteína 1 similar a receptor hormonal, de tipo mucina, que contiene un módulo similar a EGF	NP_001243181.1	+
EMR3	Proteína 3 similar a receptor hormonal, de tipo mucina, que contiene un módulo similar a EGF	NP_001276087.1	+
FBP1	Fructosa-1,6-bisfosfatasa 1	NP_000498.2	+
FCER1G	Receptor fragmento Fc de Ig _γ , de alta afinidad I; polipéptido gamma	NP_004097.1	+
FCER2	Receptor fragmento Fc de IgE; de baja afinidad II (CD23)	NP_001193948.2	+
FPR1	Receptor 1 de péptido formilo	NP_001180235.1	+
FPR2	Receptor 2 de péptido formilo	NP_001005738.1	+
GK	Glicerol quinasa	NP_000158.1	+
GNPMB	Glucoproteína (transmembranal) NMB	NP_001005340.1	-
GPR137B	Receptor 137B acoplado con proteína G	NP_003263.1	+
HBEGF	Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina	NP_001936.1	+
HIST1H1C	Agregado de histonas 1, H1C	NP_005310.1	+
HIS T2H2AA3	Agregado de histonas 2, H2AA3	NP_001035807.1	+
HIS T2H2AC	Agregado de histonas 2, H2AC	NP_003508.1	+
HK2	Hexoquinasa 2	NP_000180.2	+
HK3	Hexoquinasa 3 (leucocito)	NP_002106.2	+
HPSE	Heparanasa	NP_001092010.1	+
HSD11B1	Hidroxiesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1	NP_001193670.1	+
HTRA1	HTRA serina peptidasa 1	NP_002766.1	-
IL18BP	Proteína de unión a interleuquina 18	NP_001034748.1	-
IL3RA	Receptor de interleuquina 3, alfa (baja afinidad)	NP_001254642.1	+
ITGB8	Integrina, beta 8	NP_002205.1	+

(continuación)

Símbolo génico	Descripción	GenBank RefSeq nº	Regulación positiva (+) o negativa (-)
KIAA1199	KIAA1199	NP_001280227.1	+
LILRA3	Receptor de tipo inmunoglobulina leucocitario, subfamilia A (sin dominio TM), miembro 3	NP_001166125.1	+
LILRA5	Receptor de tipo inmunoglobulina leucocitario, subfamilia A (con dominio TM), miembro 5	NP_067073.1	+
LIPA	Lipasa A, ácido lisosómico, colesterol esterasa	NP_000226.2	-
LY86	Antígeno linfocitario 86	NP_004262.1	-
MARCO	Receptor de macrófago con estructura colagenosa	NP_006761.1	+
MGST1	Glutatión S-transferasa 1 microsómica	NP_001247440.1	+
MMP7	Metalopeptidasa matricial 7 (matrilisina, uterina)	NP_002414.1	+
MT1F	Metalotioneína IF	NP_001288201.1	+
MT1G	Metalotioneína 1G	NP_001288196.1	+
MT1H	Metalotioneína 1H	NP_005942.1	+
MT1M	Metalotioneína 1M	NP_789846.1	+
MT1X	Metalotioneína IX	NP_005943.1	+
MXD1	Proteína 1 de dimerización MAX	NP_001189442.1	+
MYADM	Marcador de diferenciación asociado a célula mieloide	NP_001018654.1	+
NEFH	Neurofilamento, polipéptido pesado	NP_066554.2	+
NQO1	NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 1	NP_000894.1	-
NRIP3	Proteína 3 de interacción con receptor nuclear	NP_065696.1	+
OLIG2	Factor de transcripción 2 del linaje de oligodendrocitos	NP_005797.1	+
PANX2	Panexina 2	NP_001153772.1	+
PAPLN	Papilina, glucoproteína sulfatada similar a proteoglicano	NP_775733.3	+
PDLIM7	PDZ y LIM dominio 7 (enigma)	NP_005442.2	+
PLAUR	Activador del plasminógeno, receptor de uroquinasa	NP_001005376.1	+
PLD3	Familia de la fosfolipasa D, miembro 3	NP_001026866.1	-
PPBP	Proteína básica proplaquetaria (ligando 7 de quimioquina (motivo C-X-C))	NP_002695.1	+
PROCR	Receptor de proteína C, endotelial	NP_006395.2	+
PSTPIP2	Proteína 2 de interacción con la prolina-serina-treonina fosfatasa	NP_077748.3	
PTGES	Prostaglandina-E sintasa	NP_004869.1	+
PTGR1	Prostaglandina reductasa 1	NP_001139580.1	+
RAB13	RAB13, miembro de la familia del oncogén RAS	NP_001258967.1	+
RARRES1	Respondedor de receptor del ácido retinoico (inducido por tazaroteno) 1	NP_002879.2	-
RETN	Resistina	NP_001180303.1	+
RHBDD2	Proteína 2 que contiene dominio romboide	NP_001035546.1	+
RNASE 1	Ribonucleasa, familia de la ARNasa A, 1 (pancreática)	NP_002924.1	-
S100A12	Proteína S100 de unión al calcio A12	NP_005612.1	+
S100A4	Proteína S100 de unión al calcio A4	NP_002952.1	-
S100A8	Proteína S100 de unión al calcio A8	NP_002955.2	+
S100A9	Proteína S100 de unión al calcio A9	NP_002956.1	+
SERPINA1	Inhibidor de serpina peptidasa, clado A (α -1 anti-proteinasa, antitripsina), miembro 1	NP_000286.3	+
SERPINB7	Inhibidor de serpina peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 7	NP_001035237.1	+
SLC16A10	Miembro 10 (transportador de aminoácidos aromáticos), familia de portadores de solutos 16	NP_061063.2	+
SLC7A11	Familia de portadores de solutos 7 (cadena ligera del transportador de aminoácidos aniónicos, sistema xc-), miembro 11	NP_055146.1	+
TGM2	Transglutaminasa 2	NP_004604.2	+
TLR7	Receptor 7 de tipo Toll	NP_057646.1	-
TMEM158	Proteína transmembranal 158 (gen/pseudogén)	NP_056259.2	+
TREM1	Receptor inductor expresado sobre células mieloides 1	NP_001229518.1	+
TSPAN4	Tetraspanina 4	NP_001020405.1	-

(continuación)

Símbolo génico	Descripción	GenBank RefSeq nº	Regulación positiva (+) o negativa (-)
UPP1	Uridina fosforilasa 1	NP_001274355.1	+
VCAN	Versicán	NP_001119808.1	+

Una Firma de tolerancia a endotoxinas puede comprender todos los genes de firma de tolerancia a endotoxinas (GFTE) mostrados en la Tabla 1 o puede comprender un subgrupo de por lo menos seis de estos genes. La Firma de tolerancia a endotoxinas puede comprender tan solo seis GFTE y hasta 99 de los GFTE mostrados en la Tabla 1. En algunas realizaciones, la Firma de tolerancia a endotoxinas comprende por lo menos siete, por lo menos ocho, por lo menos nueve, por lo menos diez, por lo menos once, por lo menos doce, por lo menos trece, por lo menos catorce o por lo menos quince de los GFTE de la Tabla 1. En algunas realizaciones, la Firma de tolerancia a endotoxinas comprende 15 o más GFTE, por ejemplo 20 o más, 25 o más o 30 o más GFTE. En algunas realizaciones, la Firma de tolerancia a endotoxinas comprende aproximadamente 31 GFTE de la Tabla 1. En algunas realizaciones, la Firma de tolerancia a endotoxinas comprende aproximadamente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 GFTE.

En determinadas realizaciones, la Firma de tolerancia a endotoxinas comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 de los GFTE en la Tabla 1.

En determinadas realizaciones, la Firma de tolerancia a endotoxinas comprende por lo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 GFTE seleccionados de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En algunas realizaciones, la Firma de tolerancia a endotoxinas comprende por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25 o por lo menos 30 GFTE seleccionados de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, la Firma de tolerancia a endotoxinas comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 GFTE seleccionados de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR, y opcionalmente puede comprender uno o más GFTE de la Tabla 1.

En algunas realizaciones, la Firma de tolerancia a endotoxinas comprende los GFTE: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR, y opcionalmente puede comprender otro u otros GFTE de la Tabla 1.

El cambio de expresión de un GFTE puede definirse por una dirección de cambio de la expresión, que indica si el gen está regulado positiva o negativamente en un sujeto con tolerancia a endotoxinas en comparación con la expresión de los GFTE en una muestra de control (o de referencia). En referencia a los GFTE mostrados en la Tabla 1, por ejemplo, un sujeto con tolerancia a endotoxinas mostraría una regulación positiva de uno o más de entre ADAMDEC1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PPBP, PROCR, PTGES, PTGR1, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A12, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TMEM158, TREM1, UPP1 o VCAN, y una regulación negativa de uno o más de entre ADAM15, ALCAM, ALDH1A1, CAMP, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, DHRS9, GPNMB, HTRA1, IL18BP, LIPA, LY86, NQO1, PLD3, PSTPIP2, RARRES1, RNASE1, S100A4, TLR7 o TSPAN4.

El cambio de expresión de un GFTE opcionalmente puede definirse además por un factor de cambio mínimo del nivel de expresión respecto al control. En determinadas realizaciones, la regulación positiva o negativa de un GFTE dado puede definirse como un cambio de por lo menos 1,5 veces en el nivel de expresión del gen en comparación con un control. En algunas realizaciones, la regulación positiva o negativa de un GFTE dado puede definirse como un cambio de por lo menos 2 veces en el nivel de expresión del gen en comparación con un control. Un nivel de control (o estándar o de referencia) de la expresión puede ser, por ejemplo, el nivel de expresión del GFTE en una muestra procedente de un sujeto sano, o el nivel de expresión del GFTE en una célula no tolerante a endotoxinas.

MÉTODOS

Métodos diagnósticos

- 5 Determinadas realizaciones de la invención se refieren a métodos diagnósticos que utilizan la Firma de tolerancia a endotoxinas para determinar si un sujeto que presenta o que se sospecha que presenta sepsis grave presenta tolerancia a endotoxinas y está, por lo tanto, en riesgo de desarrollar sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave.
- 10 En determinadas realizaciones, se sospecha que el sujeto presenta sepsis y el método identifica que el paciente presenta sepsis grave. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto presenta sepsis y el método identifica que el sujeto está en riesgo de desarrollar sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave.
- 15 Generalmente, los métodos diagnósticos comprenden detectar la expresión de los genes comprendidos en la Firma de tolerancia a endotoxinas en una muestra biológica obtenida de un sujeto de ensayo. Se determinan las diferencias de expresión de dichos genes en comparación con un control. Una diferencia en la expresión de por lo menos seis de dichos genes en la dirección de cambio de expresión definida es indicativa de que el sujeto presenta, o está en riesgo de desarrollar, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave.
- 20 En determinadas realizaciones, una diferencia en la expresión de siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, o quince o más de los GFTE en la Firma de tolerancia a endotoxinas en comparación con una muestra de control es indicativa de que el sujeto presente, o está en riesgo de desarrollar, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave. En algunas realizaciones, una diferencia en la expresión de por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25 o por lo menos 30 de los GFTE en la Firma de tolerancia a endotoxinas en comparación con una muestra de control es indicativa de que el sujeto presente, o está en riesgo de desarrollar, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave. En algunas realizaciones, una diferencia en la expresión de aproximadamente 31 de los GFTE en la Firma de tolerancia a endotoxinas en comparación con una muestra de control es indicativa de que el sujeto presenta, o está en riesgo de desarrollar, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave.
- 25 En realizaciones alternativas, una diferencia en la expresión de por lo menos 20 % de los GFTE en la Firma de tolerancia a endotoxinas en comparación con una muestra de control es indicativa de que el sujeto presenta, o está en riesgo de desarrollar, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave. En algunas realizaciones, una diferencia en la expresión de 20 % o más, 30 % o más, 40 % o más, 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, o 90 % o más de los GFTE en la Firma de tolerancia a endotoxinas en comparación con una muestra de control es indicativa de que el sujeto presenta, o está en riesgo de desarrollar, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave. En algunas realizaciones, una diferencia en la expresión de por lo menos 35 % de los GFTE en la Firma de tolerancia a endotoxinas en comparación con una muestra de control es indicativa de que el sujeto presenta, o está en riesgo de desarrollar, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave.
- 30 En algunas realizaciones, una diferencia en la expresión de cada uno de los GFTE en una Firma de tolerancia a endotoxinas en comparación con una muestra de control es indicativa de que el sujeto presenta, o está en riesgo de desarrollar, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave, en la que la Firma de tolerancia a endotoxinas puede comprender entre seis y aproximadamente 99 GFTE, por ejemplo entre aproximadamente 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o 30 y aproximadamente 99 GFTE.
- 35 En determinadas realizaciones, una diferencia en la expresión de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 de los GFTE en la Tabla 1 en comparación con una muestra de control es indicativa de que el sujeto presenta, o está en riesgo de desarrollar, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave.
- 40 En determinadas realizaciones, una diferencia en la expresión de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o 31 de los GFTE siguientes en comparación con una muestra de control es indicativa de que el sujeto presenta, o está en riesgo de desarrollar, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCN.
- 45 La muestra biológica puede comprender, por ejemplo, sangre, plasma suero, tejido, líquido amniótico, saliva, orina, heces, líquido de lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo, o células (tales como células de piel) o extractos celulares.
- 50 La expresión de los GFTE comprendidos en la Firma de tolerancia a endotoxinas puede determinarse mediante la detección de un producto de expresión de cada gen. El producto de expresión puede ser, por ejemplo, ARN, ADNc

preparado a partir de ARN, o proteína. En el caso de que el producto de expresión sea ARN o ADNc, puede detectarse la secuencia completa del gen, o puede detectarse cualquier parte definitiva del gen, por ejemplo, una secuencia de 10 nucleótidos o más.

5 Los métodos de detección y cuantificación de la expresión de genes son bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1987 y actualizaciones; Ausubel et al. (ed.), Wiley & Sons, New York, NY) y entre ellos se incluyen la utilización de sondas polinucleótidas, anticuerpos, aptámeros y similares marcados detectablemente.

10 En determinadas realizaciones, para determinar la expresión de los GFTE puede utilizarse uno o más de entre reacción en cadena de polimerasa (PCR), PCR de transcriptasa inversa (RT), amplificación por replicasa Q-beta, reacción en cadena de ligasa, amplificación de secuencia de ácidos nucleicos, amplificación de señal (Ampliprobe), ciclado óptico, expresión diferencial, análisis Northern, hibridación, micromatrices, RNA-seq, secuenciación de ácidos nucleicos, análisis MassArray y espectrometría de masas MALDI-TOF.

15 En determinadas realizaciones, los métodos diagnósticos utilizan polinucleótidos detectablemente marcados para detectar la expresión de los GFTE. Los métodos pueden comprender además uno o más de entre el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de la muestra, la purificación de los ácidos nucleicos, la transcripción inversa del ARN y/o la amplificación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, las sondas polinucleótidas utilizadas para determinar la expresión de los GFTE pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido, por ejemplo, tal como una matriz o micromatriz que permite un procesamiento más rápido de la muestra. Los métodos para preparar matrices y micromatrices son bien conocidos de la técnica. Además, se encuentran disponibles comercialmente varias micromatrices estándares entre las que se incluyen sondas para detectar algunos de los genes identificados en la presente memoria como GFTE y, de esta manera, pueden resultar útiles para la utilización en los métodos diagnósticos dados a conocer. Por ejemplo, matrices Affymetrix U133 GeneChip™ (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA), micromatrices de ADNc genómico de Agilent Technologies (Santa Clara, CA) y matrices disponibles de Illumina, Inc. (San Diego, CA). Dichas matrices presentan juegos de sondas para todo el genoma humano inmovilizadas sobre un chip, y pueden utilizarse para determinar la regulación positiva y negativa de los genes en las muestras de ensayo. También se encuentran disponibles comercialmente de varias compañías matrices y micromatrices de fabricación personalizada para la detección de genes preseleccionados. Los instrumentos y reactivos para llevar a cabo el análisis de la expresión génica se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo, el sistema GeneChip™ de Affymetrix). Los datos de expresión obtenidos del análisis a continuación pueden introducirse en una base de datos apropiada para el análisis adicional, en caso necesario o si se desea.

30 En algunas realizaciones, los genes expresados diferencialmente pueden detectarse, tras la conversión en ADNc mediante la utilización de espectrometría de masas (MALDI-TOF) asistida por matriz con desorción/ionización láser - tiempo de vuelo utilizando, por ejemplo, el sistema Sequenom Mass ARRAY® (ver, por ejemplo, Kricka L.J. Clin. Chem. 1999; 45:453-458).

40 La expresión de determinados genes conocidos como "genes de referencia", "genes de control" o "genes de mantenimiento" también puede determinarse en la muestra como medio de garantizar la veracidad del perfil de expresión. Los genes de referencia son genes que se expresan consistentemente en muchos tipos de tejidos, incluyendo los tejidos cancerosos y normales y, de esta manera, resultan útiles para normalizar los perfiles de expresión génica. La determinación de la expresión de los genes de referencia en paralelo a los genes en la Firma de tolerancia a endotoxinas proporciona una garantía adicional de que las técnicas utilizadas para la determinación del perfil de expresión génica están funcionando correctamente. Los genes de referencia apropiados (también denominados en la presente memoria genes de control y genes de mantenimiento) podrán ser fácilmente seleccionados por el experto en la materia.

45 Los niveles de expresión determinados para los GFTE de la Firma de tolerancia a endotoxinas se comparan con una referencia o control adecuado, que puede ser, por ejemplo, los niveles de expresión de los GFTE en una muestra biológica de un individuo sano, o los niveles de expresión de los GFTE en una célula no tolerante a endotoxinas. La comparación puede incluir, por ejemplo, una inspección visual y/o una comparación aritmética o estadística de mediciones y puede considerar la expresión de cualesquiera genes de referencia. Los métodos adecuados de comparación para determinar las diferencias en los niveles de expresión de los genes son bien conocidos de la técnica.

50 En determinadas realizaciones, pueden utilizarse métodos diagnósticos como diagnósticos confirmatorios de los procedimientos diagnósticos estándares de sepsis. En algunas realizaciones, pueden utilizarse métodos diagnósticos como diagnósticos autónomos.

60 En determinadas realizaciones, los métodos diagnósticos pueden utilizarse para confirmar la sepsis grave en un sujeto que se sospecha que presenta sepsis. El sujeto puede haberse sometido ya a una o más evaluaciones para determinar si cumple los criterios diagnósticos estándares de sepsis, por ejemplo, el análisis de cultivo microbiano, la medición de la presión arterial, el recuento leucocitario, la medición de la temperatura, la medición de la tasa respiratoria y/o la medición de la frecuencia cardíaca. En determinadas realizaciones, los métodos diagnósticos pueden utilizarse para confirmar la sepsis grave en un sujeto que se ha diagnosticado que presenta sepsis mediante

criterios diagnósticos estándares. En determinadas realizaciones, el método diagnóstico puede utilizarse para diagnosticar que un paciente con sepsis presenta sepsis grave y/o que está en riesgo de insuficiencia cardíaca inducida por sepsis grave.

En determinadas realizaciones, determinar el nivel de expresión de los GFTE en una muestra biológica comprende detectar la presencia en la muestra biológica de una pluralidad de ARNm codificados por una pluralidad de GFTE. En algunas realizaciones, detectar la presencia en la muestra de ARNm codificados por los GFTE comprende realizar una reacción de transcripción inversa utilizando los ARNm obtenidos de la muestra biológica para generar productos de ADNc y poner en contacto los productos de ADNc con sondas de ácidos nucleicos que son capaces de hibridarse con ADNc que comprenden secuencias de nucleótidos complementarias a los ARNm codificados por los GFTE.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto productos de ADNc generados mediante una reacción de transcripción inversa utilizando los ARNm obtenidos de una muestra biológica con una micromatriz que comprende sondas de ácidos nucleicos capaces de hibridarse con ADNc que comprenden secuencias de nucleótidos complementarias a ARNm codificados por una pluralidad de GFTE.

Métodos de tratamiento

De esta manera, en la presente memoria se dan a conocer métodos de tratamiento de los pacientes en que se ha identificado la presencia de tolerancia a endotoxinas, por ejemplo, mediante la utilización de los métodos diagnósticos descritos en la presente memoria, con el fin de reducir el riesgo de que desarrollen sepsis, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave. La identificación precoz del estado inmunitario de los pacientes de sepsis mediante los métodos descritos en la presente memoria puede ayudar a guiar la selección de una terapia apropiada.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un antibiótico que está indicado para el tratamiento de la sepsis grave para la utilización en el tratamiento de un paciente que se ha identificado que presenta tolerancia a endotoxinas y que está en riesgo de desarrollar sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave.

Entre los ejemplos de antibióticos adecuados para tratar la sepsis grave se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, glucopéptidos (tales como vancomicina, oritavancina o telavancina), cefalosporinas (tales como ceftriaxona, cefotaxima o cefepima), inhibidores de beta-lactamos/beta-lactamasa (tales como piperacilina-tazobactamo, ticarcilina-cavulanato), carbapenems (tales como imipenem o meropenem), quinolonas y fluoroquinolonas (tales como ciprofloxacino, moxifloxacino o levofloxacino), aminoglucósidos (tales como gentamicina, tobramicina o amikacina), macrólidos (tales como azitromicina, claritromicina o eritromicina) y monobactams (tales como aztreonam) y diversas combinaciones de los mismos. Típicamente las combinaciones comprenden antibióticos de diferentes clases.

Tal como se demuestra en la presente memoria, la sepsis puede definirse como una enfermedad caracterizada por la disfunción inmunitaria mediada por la tolerancia a endotoxinas. De esta manera, contrarrestar la tolerancia a las endotoxinas en los pacientes de sepsis es un potencial enfoque terapéutico para evitar o reducir la probabilidad de que el paciente desarrolle sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, la invención se refiere a un agente que contrarresta la tolerancia a las endotoxinas para la utilización en el tratamiento de un paciente que se ha diagnosticado que presenta sepsis grave o que está en riesgo de desarrollar sepsis grave mediante el método de la invención. En algunas realizaciones, la invención se refiere a un agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas para la utilización en la reducción del riesgo de que un paciente desarrolle insuficiencia orgánica en un paciente que se ha diagnosticado que presenta sepsis grave o que está en riesgo de desarrollar sepsis grave mediante el método de la invención.

El agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas se selecciona de entre un agente que comprende células inmunitarias, interferón gamma, oligonucleótidos CpG solos o en combinación con IL-10, anticuerpos anti-CD40, inhibidores de STAT3, inhibidores de STAT6, inhibidores de p50, inhibidores de NFκB, inhibidores de IKKβ, imidazoquinolinas y ácido zoledrónico.

La tolerancia a endotoxinas puede resultar en que los macrófagos se encuentren "bloqueados" en un estado M2.

De esta manera, se dan a conocer en la presente memoria métodos de tratamiento de un paciente con sepsis que comprende administrar en el paciente un agente que altera el fenotipo de los macrófagos de M2 a M1. En la presente memoria se da a conocer además un método de prevención o reducción del riesgo de un paciente de desarrollar sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave que comprende administrar en el paciente un agente que altera el fenotipo de los macrófagos de M2 a M1. Los pacientes pueden identificarse como en riesgo de desarrollar sepsis, sepsis grave y/o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave mediante los métodos diagnósticos descritos en la presente memoria.

Un agente capaz de alterar el fenotipo de los macrófagos de M2 a M1 puede seleccionarse de entre una inmunoterapia, células inmunitarias, interferón gamma, oligonucleótidos CpG solos o en combinación con IL-10, anticuerpos anti-

CD40, inhibidores de STAT3, inhibidores de STAT6, inhibidores de p50, inhibidores de NFκB, inhibidores de IKKβ, imidazoquinolinas y ácido zoledrónico.

En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria comprende células inmunitarias. En una realización, las células inmunitarias son células inmunitarias singénicas, por ejemplo, las células pueden ser del sujeto en el que se están administrando las células inmunitarias. En otra realización, las células inmunitarias son células inmunitarias alogénicas, es decir, procedentes de un individuo diferente del sujeto en el que se están administrando las células inmunitarias.

En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es el interferón gamma. En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es un oligonucleótido (ODN) CpG. En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es una combinación de un ODN CpG e interleuquina-10 (IL-10). En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es un anticuerpo anti-CD40. En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es un inhibidor de STAT3. En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es un inhibidor de STAT6. En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es un inhibidor de p50. En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es un inhibidor de NFκB. En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es un inhibidor de IkKβ. En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es una imidazoquinolina. En una realización, el agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas y encuentra utilidad en los métodos dados a conocer en la presente memoria es ácido zoledrónico.

Métodos de cribado

Determinadas realizaciones de la invención se refieren a métodos para identificar un agente candidato para el tratamiento de la sepsis grave mediante la evaluación del efecto de un agente de ensayo sobre la expresión de los GFTE comprendidos en la Firma de tolerancia a endotoxinas. La capacidad de un compuesto de ensayo de afectar a la expresión de los GFTE puede evaluarse mediante, por ejemplo, la puesta en contacto de las células *in vitro* con el compuesto de ensayo, la determinación de la expresión de los GFTE en las células y la comparación de la expresión de los GFTE en las células con el nivel de expresión de los mismos GFTE en las células de control.

La expresión de los GFTE puede evaluarse mediante diversos métodos conocidos de la técnica, tal como se indica en la presente memoria y en otros sitios.

Las células de ensayo son células tolerantes a endotoxinas y las células de control son células no tolerantes a endotoxinas (normales). En el caso de que el patrón de expresión (o firma génica) de las células tratadas con el agente de ensayo se correspondan sustancialmente al patrón de expresión (o firma génica) de las células de control, ello indica que el agente de ensayo es un agente candidato para el tratamiento de la sepsis grave. La expresión "se corresponde sustancialmente" en el presente contexto se refiere a que la expresión de dichos GFTE que están regulados positivamente en las células tolerantes a exotoxinas está disminuida y la expresión de aquellas GFTE que están reguladas negativamente en las células tolerantes a exotoxinas está incrementada.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de por lo menos uno de los GFTE en las células tratadas se encuentra dentro de un margen predeterminado de nivel de expresión de los mismos GFTE en las células de control. Por ejemplo, dentro de aproximadamente $\pm 25\%$, dentro de aproximadamente $\pm 20\%$, dentro de aproximadamente $\pm 15\%$ o dentro de aproximadamente $\pm 10\%$ del nivel de expresión de los mismos GFTE en las células de control.

En algunas realizaciones, el método puede comprender además la puesta en contacto de las células con una endotoxina durante un tiempo suficiente para inducir la tolerancia a endotoxinas en las células antes de la puesta en contacto de las mismas con el agente de ensayo. La endotoxina puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido bacteriano (LPS) o ácido lipoteicoico, o una combinación de los mismos. El LPS o ácido lipoteicoico puede encontrarse en una forma aislada, o puede proporcionarse mediante la puesta en contacto de la célula con una bacteria que contiene naturalmente el LPS y/o ácido lipoteicoico. La cantidad de tiempo requerida para inducir tolerancia a endotoxinas puede ser fácilmente determinada por el experto en la materia. Puede resultar necesario más de un tratamiento con endotoxinas para inducir tolerancia a endotoxinas. En general, puede utilizarse un tiempo de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 24 horas, por ejemplo, de aproximadamente 14, aproximadamente 16, aproximadamente 18 o aproximadamente 20 horas, y entre uno y tres tratamientos con endotoxinas. En el caso de que se utilicen múltiples tratamientos, la endotoxina utilizada en cada tratamiento puede ser la misma o diferente.

En algunas realizaciones, el método de cribado puede incluir la evaluación de las células tolerantes a endotoxinas

para la restauración de la capacidad de reaccionar a endotoxinas, indicando de esta manera que el agente de ensayo es capaz de romper la tolerancia en las células. En algunas realizaciones, el método de cribado comprende además la puesta en contacto de una segunda célula con un agente que es conocido que contrarresta la tolerancia a endotoxinas, tal como interferón-gamma, un oligonucleótido CpG (con o sin IL-10), un anticuerpo anti-CD40, un inhibidor de STAT3, un inhibidor de STAT6, un inhibidor de p50, un inhibidor de NFκB, un inhibidor de IKKβ, una imidazoquinolina o ácido zoledrónico, y determinar la expresión de los mismos GFTE en la segunda célula.

En determinadas realizaciones, el método puede comprender además el someter a ensayo el agente de ensayo para la capacidad de alterar el fenotipo de los macrófagos de M2 a M1.

Kits y micromatrices

Los kits dados a conocer en la presente memoria resultan útiles para detectar los GFTE tal como se identifican en la presente memoria. De acuerdo con lo anterior, un kit dado a conocer en la presente memoria puede comprender uno o más reactivos para determinar la expresión de una pluralidad, por ejemplo, dos o más, GFTE. El kit puede comprender una colección de reactivos, por ejemplo, dos o más, que se utilizan juntos para llevar a cabo un método diagnóstico, o una o más etapas de un método diagnóstico, tal como se indica en la presente memoria, y que se proporcionan juntos, habitualmente dentro de un envase común.

El reactivo o reactivos para determinar la expresión de un GFTE puede comprender una sonda específica génica que es capaz de detectar un producto de expresión del GFTE (ácido nucleico o proteína) o el complemento de un producto de expresión de ácidos nucleicos. Los cebadores polinucleótidos para la transcripción inversa de ARNm codificados por los GFTE y/o para la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos a partir de los GFTE o a partir de ADNc preparado a partir del ARNm codificado por GFTE también pueden proporcionarse en el kit.

En un aspecto, la invención proporciona un kit para determinar un nivel de expresión de una pluralidad de GFTE seleccionados de la Tabla 1 en una muestra de un sujeto, en el que el kit consiste esencialmente en sondas específicas génicas de 6 a 99 genes, en el que cada una de las sondas específicas génicas capaces de detectar un producto de expresión respectivo de la pluralidad de genes o complementos de los mismos. En algunas realizaciones, la pluralidad de GFTE comprende C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, un kit comprende sondas específicas de genes para 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 de los GFTE en la Tabla 1.

En determinadas realizaciones, las sondas específicas de genes de un kit que son específicas para los GFTE consisten esencialmente en sondas para los GFTE seleccionados de la Tabla 1.

En determinadas realizaciones, las sondas específicas de genes de un kit que son específicas para los GFTE consisten en sondas para los GFTE seleccionados de la Tabla 1.

En determinadas realizaciones, las sondas específicas de genes de un kit que son específicas para los GFTE consisten en sondas para los GFTE en la Tabla 1.

En determinadas realizaciones, las sondas específicas de genes de un kit que son específicos para los GFTE comprenden sondas para GFTE seleccionados de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, las sondas específicas de genes de un kit que son específicos para los GFTE consisten en sondas para GFTE seleccionados de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, las sondas específicas de genes de un kit que son específicas para los GFTE consisten en sondas para cada uno de los siguientes: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En determinadas realizaciones, un kit comprende sondas específicas de genes para 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o 31 de los GFTE siguientes: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1,

PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

- 5 Un kit dado a conocer en la presente memoria comprende o consiste en una micromatriz que comprende una pluralidad de sondas polinucleótidas específicas de GFTE inmovilizadas sobre un soporte sólido. La micromatriz puede comprender además sondas polinucleótidas de control específicas para secuencias de control, tales como genes de mantenimiento.
- 10 El kit puede incluir opcionalmente otro u otros reactivos requeridos para llevar a cabo un procedimiento biológico, tal como tampones, sales, enzimas, cofactores enzimáticos, sustratos, reactivos de detección, reactivos de lavado y similares. También pueden incluirse componentes adicionales en el kit, tales como tampones y soluciones para el aislamiento y/o tratamiento de una muestra de ensayo. El kit puede incluir adicionalmente una o más secuencias o muestras de control.
- 15 Uno o más de los componentes del kit puede liofilizarse opcionalmente y el kit puede comprender además reactivos adecuados para la reconstitución del componente o componentes liofilizados.
- 20 Los diversos componentes del kit se proporcionan en envases adecuados. El envase mismo puede ser un recipiente adecuado para llevar a cabo el procedimiento biológico, por ejemplo, una placa de microtitulación. En caso apropiado, el kit puede contener opcionalmente además recipientes de reacción, recipientes de mezcla y otros componentes que faciliten la preparación de reactivos o de una muestra de ensayo, o para llevar a cabo el procedimiento biológico. El kit puede incluir además uno o más instrumentos para ayudar con la obtención de una muestra de ensayo, tal como una jeringa, pipeta, fórceps o similares.
- 25 Los reactivos comprendidos en el kit o sus envases pueden estar codificados por colores para facilitar su uso. En el caso de que los reactivos estén codificados por colores, la adición de un reactivo a otro en una etapa particular puede resultar, por ejemplo, en un cambio de color de la mezcla, proporcionando de esta manera una indicación de que la etapa ha sido realizada.
- 30 El kit puede incluir opcionalmente instrucciones de utilización, que pueden proporcionarse en forma de papel, en forma legible por ordenador, tal como un CD, DVD, lápiz USB o similar, o en la forma de guías o instrucciones para acceder a un sitio web. El kit puede comprender además medios legibles por ordenador que comprenden software, o guías o instrucciones para acceder a un sitio web que proporciona software, para ayudar en la interpretación de los resultados obtenidos utilizando el kit.
- 35 Determinadas realizaciones de la invención se refieren a micromatrices para la detección de una pluralidad de GFTE. En una realización, la invención proporciona una micromatriz para detectar la expresión de una pluralidad de genes de Firma de tolerancia a endotoxinas en una muestra, en el que la micromatriz consiste esencialmente en una pluralidad de sondas polinucleótidas unidas a un soporte sólido, en el que cada una de las sondas polinucleótidas es capaz de hibridarse específicamente con un producto de expresión (o complemento del mismo) de un gen respectivo de la pluralidad de GFTE, en el que la pluralidad de genes se selecciona de entre ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN. Las sondas de control, por ejemplo, son sondas capaces de detectar la expresión de genes de mantenimiento. Las sondas para una pluralidad de genes de Firma inflamatoria pueden seleccionarse de entre las identificadas en la Tabla 4. Para el microanálisis, las secuencias de sondas típicamente son de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 80 nucleótidos de longitud, de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, o de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. A título de ejemplo únicamente, y que no pretende ser limitativo, generalmente las secuencias de sonda comprenden aproximadamente 25 nt en las matrices Affymetrix, y aproximadamente 60 nt en las matrices Agilent.
- 50 En determinadas realizaciones, las sondas de ácidos nucleicos son capaces de hibridarse con ADNc que comprenden secuencias de nucleótidos complementarias a los ARNm codificados por una pluralidad de GFTE.
- 60 La micromatriz consiste esencialmente en sondas de ácidos nucleicos capaces de hibridarse con ADNc que comprenden secuencias de nucleótidos complementarias a los ARNm codificados por una pluralidad de GFTE.

En algunas realizaciones, la micromatriz consiste en sondas de ácidos nucleicos capaces de hibridarse con ADNc que comprenden secuencias de nucleótidos complementarias a los ARNm codificados por una pluralidad de GFTE.

5 La pluralidad de GFTE se selecciona de entre los GFTE indicados en la Tabla 1. En algunas realizaciones, la pluralidad de GFTE comprende C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

10 En determinadas realizaciones, una micromatriz incluye sondas para 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 de los GFTE en la Tabla 1.

15 La pluralidad de sondas de una micromatriz que son específicas para GFTE consiste esencialmente en sondas para GFTE seleccionados de la Tabla 1.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de sondas de una micromatriz que son específicas para GFTE consiste en sondas para los GFTE seleccionados de la Tabla 1.

20 En determinadas realizaciones, la pluralidad de sondas de una micromatriz que son específicas para GFTE consiste en sondas para todos los GFTE en la Tabla 1.

25 En determinadas realizaciones, la pluralidad de sondas de una micromatriz que son específicas para los GFTE comprende sondas para GFTE seleccionados de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

30 En determinadas realizaciones, la pluralidad de sondas de una micromatriz que son específicas para los GFTE consiste en sondas para GFTE seleccionados de entre C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

35 En determinadas realizaciones, la pluralidad de sondas de una micromatriz que son específicas para GFTE consiste en sondas para cada uno de los siguientes: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

40 En determinadas realizaciones, una micromatriz incluye sondas para 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 de los GFTE siguientes: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

Aspectos adicionales dados a conocer en la presente memoria

45 En la presente memoria se dan a conocer los aspectos adicionales siguientes:

50 Se da a conocer en la presente memoria un método para identificar un paciente que presenta sepsis grave o está en riesgo de desarrollar sepsis grave, en el que dicho método comprende obtener una muestra biológica del individuo y determinar el nivel de expresión de por lo menos dos o más genes de la firma de tolerancia a endotoxinas, en la que se indica el riesgo de sepsis, sepsis grave o insuficiencia cardíaca por la expresión alterada de genes de la firma de tolerancia a endotoxinas respecto a la expresión de los mismos genes en los individuos sin sepsis.

55 En la presente memoria se da a conocer además un método para identificar un paciente que presenta sepsis grave o está en riesgo elevado de desarrollar sepsis grave, que comprende obtener una muestra biológica del paciente y determinar el nivel de expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince genes diferentes de la Firma de tolerancia a endotoxinas (GFTE) en la muestra biológica, de manera que la presencia o riesgo elevado de sepsis grave está indicado por el nivel de expresión de los GFTE. Puede determinarse el nivel de expresión de más de 15, 20, 25 o 30 o aproximadamente 31 GFTE diferentes.

60 Por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce, o por lo menos quince, o hasta 31 de los GFTE pueden seleccionarse del grupo que consiste en RNASE1, ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59,

- CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN.
- Puede determinarse el nivel de expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 de los GFTE en la Tabla 1.
- Puede determinarse el nivel de expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 de los GFTE siguientes: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.
- El método dado a conocer en la presente memoria puede comprender además la determinación del nivel de expresión de los mismos GFTE en una muestra de control de un individuo que no presenta sepsis. En el caso de que los niveles de expresión de los GFTE de la muestra del paciente y de la muestra de control sean diferentes, se identifica que el paciente presenta sepsis grave o está en riesgo elevado de sepsis grave.
- Puede que no se haya llegado a un diagnóstico definitivo de que el paciente presenta sepsis grave o puede haberse diagnosticado ya que el paciente presenta sepsis grave.
- La muestra biológica puede seleccionarse de un grupo que consiste en sangre, tejido, líquido amniótico, saliva, orina, líquido amniótico, líquido de lavado broncoalveolar y células cutáneas.
- La identificación de un paciente con sepsis grave puede utilizarse para guiar la terapia óptima para el paciente.
- El nivel de expresión de GFTE puede determinarse mediante la evaluación del nivel de ARN o ADNc en la muestra biológica. El nivel de expresión de GFTE puede determinarse utilizando uno o más métodos seleccionados de entre reacción en cadena de polimerasa (PCR), transcriptasa inversa (RT)-PCR, amplificación por replicasa Q-beta, reacción en cadena de ligasa, amplificación de secuencia de ácidos nucleicos, amplificación de señal (Ampliprobe), ciclado óptico y otras variaciones de los métodos de amplificación basados en PCR o no basados en PCR, expresión diferencial, análisis Northern, hibridación, micromatrices, secuenciación de ADN, RNA-Seq, secuenciación de ácidos nucleicos, análisis MassArray y espectrometría de masas MALDI-TOF.
- En la presente memoria se da a conocer un método para identificar un individuo que está en riesgo de insuficiencia cardíaca, en el que el método comprende obtener una muestra biológica del individuo y determinar el nivel de expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince GFTE diferentes de la muestra biológica, de manera que el nivel de expresión de los GFTE indica el riesgo de insuficiencia orgánica. Puede determinarse el nivel de expresión de más de 15, 20, 25 o 30 o aproximadamente 31 GFTE diferentes.
- El método dado a conocer en la presente memoria puede comprender además el nivel de expresión de los mismos GFTE en una muestra de control de un individuo que no presenta sepsis. En el caso de que los niveles de expresión de los GFTE de la muestra del paciente y de la muestra de control sean diferentes, se identifica que el paciente presenta un riesgo de insuficiencia orgánica.
- Por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce, o por lo menos quince, o hasta 31 de los GFTE pueden seleccionarse del grupo que consiste en RNASE1, ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN.
- Puede determinarse el nivel de expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 50, 51, 52, 53, 54,

55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 de los GFTE en la Tabla 1.

Puede determinarse el nivel de expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 de los GFTE siguientes: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

En la presente memoria se da a conocer un método para tratar la sepsis grave, en el que el método comprende identificar un paciente que presenta sepsis grave o está en riesgo elevado de desarrollar sepsis grave y tratar dicho paciente con por lo menos un antibiótico potente que está indicado para el tratamiento de la sepsis grave. La identificación del paciente puede comprender obtener una muestra biológica del paciente y determinar el nivel de expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince GFTE diferentes en la muestra biológica, de manera que la presencia o riesgo elevado de sepsis grave está indicado por el nivel de expresión de dichos dos GFTE. Puede determinarse el nivel de expresión de más de 15, 20, 25 o 30 o aproximadamente 31 GFTE diferentes.

Por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce, o por lo menos quince, o por lo menos 31 de los GFTE pueden seleccionarse del grupo que consiste en RNASE1, ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN.

Puede determinarse el nivel de expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 de los GFTE en la Tabla 1.

Puede determinarse el nivel de expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 de los GFTE siguientes: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HISTH2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

El método dado a conocer en la presente memoria puede comprender además el nivel de expresión de los mismos GFTE en una muestra de control procedente de un individuo que no presenta sepsis. En el caso de que los niveles de expresión de los GFTE procedentes de la muestra del paciente y de la muestra de control sean diferentes, se identifica que el paciente presenta sepsis grave y se administra en el mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de por lo menos un antibiótico potente para está indicado para el tratamiento de la sepsis grave.

En la presente memoria se da a conocer un kit de ensayo para la identificación de la sepsis grave, que comprende por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un GFTE diferente. El kit puede comprender más de 15, 20, 25 o 30, o aproximadamente 31 ácidos nucleicos diferentes.

El kit puede comprender por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce, o por lo menos quince, o por lo menos 31 ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un GFTE diferente, en el que los GFTE se seleccionan del grupo que consiste en RNASE1, ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2,

PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN.

5 Un kit puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un GFTE diferente en la Tabla 1.

10 Un kit puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de uno de los GFTE siguientes: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

15 En la presente memoria se da a conocer además un kit de ensayo para la identificación de individuos que presentan un riesgo elevado de desarrollar sepsis grave, en el que el kit comprende por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un GFTE diferente. El kit puede comprender más de 15, 20, 25 o 30, o aproximadamente 31 ácidos nucleicos diferentes.

20 El kit puede comprender por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce, o por lo menos quince, o por lo menos 31 ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un GFTE diferente, en el que los GFTE se seleccionan del grupo que consiste en RNASE1, ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN

30 Un kit puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un GFTE diferente en la Tabla 1.

40 Un kit puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de uno de los GFTE siguientes: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

45 En la presente memoria se da a conocer además un kit de ensayo para la identificación de individuos que presentan un riesgo de insuficiencia orgánica, en el que el kit comprende por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un GFTE diferente. El kit puede comprender más de 15, 20, 25 o 30, o aproximadamente 31 ácidos nucleicos diferentes.

50 El kit puede comprender por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce, o por lo menos quince, o por lo menos 31 ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un GFTE diferente, en el que los GFTE se seleccionan del grupo que consiste en RNASE1, ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1,

CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN.23.

Un kit puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un GFTE diferente en la Tabla 1.

Un kit puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 ácidos nucleicos diferentes, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde o es complementaria a la secuencia de nucleótidos de uno de los GFTE siguientes: C19orf59, CCL22, CD14, CD300LF, CYP1B1, DHRS9, FCER1G, FPR1, FPR2, GK, HIST2H2AA3, HK2, HK3, HPSE, LILRA5, MGST1, PDLIM7, PLAUR, PSTPIP2, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A4, S100A9, S100A12, SERPINA1, UPP1, CPVL, CST3, LY86 y PROCR.

Los kits de ensayo pueden comprender instrucciones de utilización, un dispositivo de recolección de muestras, uno o más reactivos para la preparación de muestras y una muestra de control positivo.

Los kits de ensayo pueden comprender instrucciones de utilización, un dispositivo de recolección de muestras, uno o más reactivos para la preparación de muestras y una muestra de control positivo.

Los kits de ensayo pueden comprender instrucciones de utilización, un dispositivo de recolección de muestras, uno o más reactivos para la preparación de muestras y una muestra de control negativo y una muestra de control positivo.

En la presente memoria se da a conocer un método de tratamiento de un paciente con sepsis grave, que comprende administrar en el paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas mediante la modificación de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, or por lo menos 31 GFTE diferentes en una célula procedente del individuo.

El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en interferón gamma, ODN CpG con o sin IL-10; anti-CD40; inhibidores de STAT3, STAT6, p50 NFκB y IKKβ; imidazoquinolinas y ácido zoledrónico. El agente puede ser una célula inmunitaria.

En la presente memoria se da a conocer un método de prevención o retraso de la sepsis grave en un paciente, en el que el método comprende administrar en el paciente una cantidad eficaz de un agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas mediante la modificación de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o hasta 99 GFTE diferentes en una célula del paciente.

El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en interferón gamma, ODN CpG con o sin IL-10; anti-CD40; inhibidores de STAT3, STAT6, p50 NFκB y IKKβ; imidazoquinolinas y ácido zoledrónico. El agente puede ser una célula inmunitaria.

En la presente memoria se da a conocer además un método de tratamiento de la sepsis grave en un paciente, en el que el método comprende administrar en el paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas mediante modificación de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o por lo menos 31 GFTE diferentes en una célula del paciente, y que comprende además la monitorización de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o por lo menos 31 GFTE diferentes en muestras obtenidas del paciente durante la terapia.

El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en interferón gamma, ODN CpG con o sin IL-10; anti-CD40; inhibidores de STAT3, STAT6, p50 NFκB y IKKβ; imidazoquinolinas y ácido zoledrónico. El agente puede ser una célula inmunitaria.

Otro método dado a conocer en la presente memoria es un método de prevención o retraso de la sepsis grave en un paciente, que comprende administrar en el paciente una cantidad eficaz de un agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas mediante modificación de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o por lo menos 31 GFTE diferentes en una célula del paciente, y que comprende además la monitorización de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o por lo menos 31 GFTE diferentes en muestras obtenidas del paciente durante el tratamiento preventivo.

El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en interferón gamma, ODN CpG con o sin IL-10; anti-CD40; inhibidores de STAT3, STAT6, p50 NFkB y IKK β ; imidazoquinolinas y ácido zoledrónico. El agente puede ser una célula inmunitaria.

En la presente memoria se da a conocer además un método de prevención o retraso de la insuficiencia orgánica en un paciente, en el que el método comprende administrar en el paciente una cantidad eficaz de un agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas mediante modificación de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o por lo menos 31 GFTE diferentes en una célula del paciente, y que comprende además la monitorización de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o por lo menos 31 GFTE diferentes en muestras obtenidas del paciente durante el tratamiento preventivo.

El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en interferón gamma, ODN CpG con o sin IL-10; anti-CD40; inhibidores de STAT3, STAT6, p50 NFkB y IKK β ; imidazoquinolinas y ácido zoledrónico. El agente puede ser una célula inmunitaria.

Un método de tratamiento de la sepsis grave dado a conocer en la presente memoria puede comprender la administración en el paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente seleccionado del grupo que consiste en interferón gamma; ODN CpG con o sin IL-10; anti-CD40; inhibidores de STAT3, STAT6, p50 NFkB y IKK β ; imidazoquinolinas y ácido zoledrónico. El método puede comprender además la monitorización de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o por lo menos 31 GFTE diferentes en muestras obtenidas del paciente durante la terapia.

Un método de prevención o retraso de la sepsis grave dado a conocer en la presente memoria puede comprender la administración en el paciente de una cantidad eficaz de un agente seleccionado del grupo que consiste en interferón gamma; ODN CpG con o sin IL-10; anti-CD40; inhibidores de STAT3, STAT6, p50 NFkB y IKK β ; imidazoquinolinas y ácido zoledrónico. El método puede comprender además la monitorización de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o por lo menos 31 GFTE diferentes en muestras obtenidas del paciente durante el tratamiento preventivo.

Un método de prevención o retraso de la insuficiencia orgánica dado a conocer en la presente memoria puede comprender la administración en el paciente de una cantidad eficaz de un agente seleccionado del grupo que consiste en interferón gamma; ODN CpG con o sin IL-10; anti-CD40; inhibidores de STAT3, STAT6, p50 NFkB y IKK β ; imidazoquinolinas y ácido zoledrónico. El método puede comprender además la monitorización de la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o por lo menos 31 GFTE diferentes en muestras obtenidas del paciente durante el tratamiento preventivo.

En la presente memoria se da a conocer además un método para identificar un agente que es capaz de tratar la sepsis, en el que el método comprende poner en contacto una célula con el agente y determinar la expresión de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince GFTE diferentes en la célula.

La célula puede ser una célula tolerante a endotoxinas. El método puede comprender además la puesta en contacto de la célula con una endotoxina tras el contacto de la misma con el agente. La endotoxina puede ser lipopolisacárido

bacteriano o ácido lipoteicoico. El lipopolisacárido bacteriano o ácido lipoteicoico puede encontrarse presente en una bacteria.

5 Pueden obtenerse agentes mediante la puesta en contacto de una célula con una dosis adecuada de endotoxina, la espera durante 18 horas, seguido de la puesta en contacto de la célula nuevamente con una dosis similar de la misma endotoxina u otra para crear una célula tolerante a endotoxinas, seguido de la incubación de la célula tolerante a endotoxinas con un agente y el examen de la restauración de la capacidad celular de interactuar con una tercera dosis de endotoxina (rotura de tolerancia).

10 El método puede comprender además la puesta en contacto de una segunda célula con interferón gamma, ODN CpG con o sin IL-10, anti-CD40, un inhibidor de STAT3, STAT6, p50, NFκB o IKKβ, una imidazoquinolina o ácido zoledrónico, y la determinación de la expresión de los mismos GFTE en la segunda célula.

15 El método puede comprender además el someter a ensayo el agente para la capacidad de alterar el fenotipo de los macrófagos de M2 a M1.

20 Pueden obtenerse agentes mediante la puesta en contacto de una célula con una dosis adecuada de endotoxina, la espera durante 18 horas y la puesta en contacto de la célula nuevamente con una dosis similar de la misma endotoxina u otra para crear una célula tolerante a endotoxinas, seguido de la incubación de la célula tolerante a endotoxinas con un agente y el examen de la restauración de la capacidad celular de interactuar con una tercera dosis de endotoxina (rotura de tolerancia). La endotoxina puede ser lipopolisacárido bacteriano o ácido lipoteicoico.

25 Puede identificarse un agente capaz de tratar la sepsis mediante un método dado a conocer en la presente memoria. El agente puede ser capaz de alterar el fenotipo de los macrófagos de M2 a M1.

30 En la presente memoria se da a conocer además un método de tratamiento de la sepsis mediante la supresión de la tolerancia a endotoxinas. Puede utilizarse un agente que sea capaz de modificar la expresión de por lo menos un, o por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once, o por lo menos doce, o por lo menos trece, o por lo menos catorce o por lo menos quince, o por lo menos 31 GFTE diferentes en una célula de un paciente.

35 Para conseguir una mejor comprensión de la invención descrita en la presente memoria, se proporcionan los ejemplos siguientes. Se entenderá que estos ejemplos pretenden describir realizaciones ilustrativas de la invención.

Ejemplos

Métodos

40 *Visión de conjunto:* se obtuvieron las firmas génicas de tolerancia a endotoxinas y de LPS inflamatorias a partir de análisis de micromatrices publicados [Pena OM et al. Journal of Immunology 2011; 186:7243-54] de PBMC humanas que identificaban los genes expresados a nivel diferente de las PBMC de control. Para permitir comparaciones más directas entre firmas, los genes inflamatorios expresados diferencialmente se redujeron adicionalmente de 178 a 93 genes, mediante solapamiento con una tabla de datos de micromatrices de endotoxemia experimental (GSE3284) [Calvano et al., Nature, 2005, 437:1032-1037] de las PBMC de individuos sanos estimulados con una dosis baja de LPS *in vivo* a las 2 y 6 horas. El análisis de las firmas de 'Tolerancia a endotoxinas' e 'Inflamatoria' en pacientes y controles se llevó a cabo utilizando la prueba estadísticamente rigurosa de grupo de genes llamada ROAST [Wu D. et al. Bioinformatics 2010; 26:2176-82]. La selección de conjuntos de datos se basó en los criterios de inclusión siguientes: 1) Estudios de cohortes transversales o longitudinales. 2) Poblaciones de sangre entera o de leucocitos purificados. 3) Pacientes pediátricos o adultos. 4) Sujetos sanos, que se utilizaron a modo de controles. 5) Solo conjuntos de datos publicados en revistas científicas. Los conjuntos de datos normalizados se descargaron de NCBI GEO utilizando el paquete Bioconductor GEOquery [Davis S, Meltzer PS. Bioinformatics 2007; 23:1846-7]. Todo el procesamiento de los datos se llevó a cabo en R utilizando Bioconductor [Gentleman RC et al. Genome Biology 2004; 5:R80]. Para el estudio de RNA-Seq que se informa en la presente memoria, se reclutaron 73 pacientes (de edades 60±17; 46 varones, 27 mujeres) con consentimiento diferido de acuerdo con la aprobación del Comité de ética humana de la UBC en el momento de la primera exploración en una sala de urgencias basándose en la opinión de médicos de que existía un potencial de que la condición del paciente evolucionase a sepsis. Después de la primera extracción de sangre, se preparó el ARN total a partir de sangre entera, se convirtió en ADNc, se secuenció en un analizador genómico Ilx de Illumina, se localizó en el mapa del genoma humano y se convirtió en Tablas de expresión mediante métodos estándares. La normalización se llevó a cabo con la función Voom del paquete Limma. Todos los demás parámetros clínicos basados en pruebas rutinarias se obtuvieron mediante examen de las historias clínicas de los pacientes.

65 *Conjuntos de datos de metaanálisis.* Se llevaron a cabo búsquedas de conjuntos de datos de sepsis en los depósitos públicos NCBI GEO y EBI Array Express. La selección de conjuntos de datos (Tabla 2) se basó en los criterios de inclusión siguientes: 1) Estudios de cohortes transversales o longitudinales. 2) Poblaciones de sangre entera o de

leucocitos purificados. 3) Pacientes pediátricos o adultos. 4) Sujetos sanos, que se utilizaron a modo de controles. 5) Solo conjuntos de datos publicados como parte de un estudio en una revista científica. En la Tabla 2 se proporciona una lista de los conjuntos de datos a los que se ha accedido.

5

Tabla 2: descripción de conjuntos de datos de sepsis públicos reanalizados*

N*	GEO ID (nº GSE)	Muestras seleccionadas	Muestras (sepsis/controles)	Localización; Tipo celular; Tiempo de recolección de muestra	nº Pubmed; Año	Plataforma de matriz
1	28750	Se utilizaron muestras únicamente de sujetos con sepsis y controles sanos. El grupo de sujetos postquirúrgico fue excluido de los análisis.	10/ 20	Australia; Leucocitos; UCI <24 h>	21682927; 2011	A
2	13015	Se utilizaron muestras con sepsis debida a organismos diferentes de <i>B. pseudomallei</i> ; los controles eran sanos, sin comorbilidades.	24/3	Tailandia; Sangre entera; en las 24 h siguientes al diagnóstico de sepsis	19903332; 2009	B
3	9692	Se utilizaron todas las muestras proporcionadas por el estudio.	30/ 15	EE. UU.; Leucocitos; UCI <24H>	18460642; 2007	A
4	26378	Se utilizaron todas las muestras proporcionadas por el estudio.	82/ 21	EE. UU.; Leucocitos; UCI <24 h>	21738952; 2011	A
5	26440	Se utilizaron todas las muestras proporcionadas por el estudio.	98/ 32	EE. UU.; Leucocitos; ICU <24 h>	21738952; 2011	A
6	4607	Se utilizaron solo las muestras de sujetos que experimentaban choque séptico recolectadas los días 1 y 3 después de la admisión en la UCI.	69/ 15	EE. UU.; Leucocitos; ICU <24 h>	17374846; 2006	A
		Las muestras de sujetos con SRIS y SRIS resuelto fueron excluidas.				
7	8121	Se utilizaron todas las muestras proporcionadas por el estudio.	60/ 15	EE. UU.; Leucocitos; UCI <24 h>	17932561; 2007	A
8	11755	Se utilizaron muestras únicamente de sujetos sépticos 24 horas (día 1) y 72 horas (día 3) después de la admisión en la UCI. Las muestras obtenidas 8 horas después de la admisión fueron excluidas de los análisis.	5/3	Países Bajos; Leucocitos; UCI <24 h>	23842590; 2008	A
9	13904	Se utilizaron únicamente muestras de sujetos con sepsis y con choque séptico. Los sujetos con SRIS fueron excluidos de los análisis.	158/ 18	EE. UU.; Leucocitos; UCI <24 h>	19325468; 2008	A
<i>Tabla 2, notas al pie:</i> * Los datos de micromatrices se descargaron del depósito "Gene Expression Omnibus" (GEO). Se proporcionan los artículos asociados (proporcionados por el número Pubmed), los números de pacientes analizados y los detalles de los estudios específicos. La descripción del estudio se incluye como nota al pie. La plataforma de matriz era A. Matriz GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0; B. 'Beadchip' de expresión GPL6947 Illumina HumanHT-12 V3.0.						

DISEÑO DE ESTUDIO según estudio, columna 1 de la Tabla 2:

1. GSE 28750. Transversal. Ensayo clínico prospectivo multicéntrico llevado a cabo en 4 centros terciarios de cuidados críticos en Australia. Se reclutaron los pacientes de sepsis si cumplían los criterios de la Declaración de consenso de 1992 y mostraban evidencia clínica de infección sistémica según las pruebas microbiológicas. Se utilizaron sujetos sanos como controles normales en el estudio.
2. GSE 13015. Transversal. Estudio de pacientes con sepsis con un hemocultivo positivo por *Burkholderia pseudomallei* y sepsis debida a otros organismos, frente a controles no infectados.
3. GSE 9692. Transversal. Niños <10 años de edad admitidos en la unidad de cuidados intensivos pediátrica (UCIP), con criterios específicamente pediátricos para choque séptico. Se reclutaron pacientes de control normales de las instituciones participantes utilizando los criterios de exclusión siguientes: enfermedad febril reciente (en las últimas 2 semanas); utilización reciente de medicación antiinflamatoria (en las últimas 2 semanas) o cualquier antecedente de enfermedad crónica o aguda asociada a inflamación.
4. GSE 26378. Transversal. Se generaron datos de expresión de niños con choque séptico mediante la utilización de muestras de ARN obtenidas de sangre entera que representaban las primeras 24 horas después de la admisión en la UCIP. Se utilizaron sujetos sanos (niños) como controles normales en el estudio.
5. GSE 26440. Transversal. Se generaron datos de expresión de niños con choque séptico mediante la utilización de muestras de ARN obtenidas de sangre entera que representaban las primeras 24 horas después de la admisión en la UCIP. Se utilizaron sujetos sanos (niños) como controles normales en el estudio.
6. GSE 4607. Longitudinal. Eran elegibles para el estudio los niños <10 años de edad admitidos en la unidad de cuidados intensivos pediátrica y que cumplían los criterios de SRIS o choque séptico. Se reclutaron pacientes de control de los departamentos ambulatorios u hospitalarios de las instituciones participantes utilizando los criterios de exclusión siguientes: enfermedad febril reciente (en las últimas 2 semanas); utilización reciente de medicación antiinflamatoria (en las últimas 2 semanas) o cualquier antecedente de enfermedad crónica o aguda asociada a inflamación.
7. GSE 8121. Longitudinal. Se generaron perfiles de expresión genómicos a partir de ARN obtenido de sangre entera de niños con choque séptico, correspondientes a los días 1 y 3 de choque séptico, respectivamente. Se reclutaron pacientes de control normales de las instituciones participantes utilizando los criterios de exclusión siguientes: enfermedad febril reciente (en las últimas 2 semanas); utilización reciente de medicación antiinflamatoria (en las últimas 2 semanas) o cualquier antecedente de enfermedad crónica o aguda asociada a inflamación.
8. GSE 11755. Longitudinal. Estudio prospectivo de caso-control, se incluyeron seis niños con sepsis meningocócica. Se extrajo sangre en cuatro puntos temporales (t=0, t=8, t=24 y t=72 h tras la admisión en la unidad de cuidados intensivos pediátrica). Se utilizaron sujetos sanos (niños) como controles normales en el estudio.
9. GSE 13904. Longitudinal. Perfiles de expresión genómica de niños críticamente enfermos que representan el espectro de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), sepsis y choque séptico los días 1 y 3 después de la admisión. Se utilizaron sujetos sanos (niños) como controles normales en el estudio.

Selección de los pacientes y diseño del estudio. En el estudio de cohortes controlado, observacional, sin enmascaramiento, se reclutaron pacientes con sospecha de sepsis, basada en la opinión del médico responsable, procedentes del hospital St. Paul's, Vancouver, Canadá, a la primera sospecha clínica de sepsis. Para determinar el tamaño apropiado de muestra para dicho estudio, se utilizó un cálculo estándar de la potencia para una sensibilidad adecuada [Jones SR, S Carley y M Harrison. *Emergency medicine Journal* 2003; 20, 453-458, 2003]. Para conseguir una sensibilidad de por lo menos 0,9 a un nivel de confianza de 95 %, se estimó un tamaño de muestra de 35 pacientes de sepsis y 70 pacientes en total (suponiendo que 50 % de los pacientes con sospecha de sepsis presentan realmente sepsis). Se reclutó un total de 72 pacientes, que se demostró posteriormente que incluían 37 pacientes con sepsis. El único criterio de inclusión en dicho estudio era la sospecha de sepsis tras la observación por el médico responsable. La mayoría de pacientes (83 %) se reclutaron a partir de la sala de urgencias. Tal como se muestra en la Tabla 3, dichos individuos eran heterogéneos. El protocolo de aprobación ética de la UBC permitía el consentimiento diferido, permitiendo un reclutamiento temprano de los pacientes en cohortes que iban desde no infectados a pacientes con choque séptico. Como controles se reclutaron individuos sanos que habían dado su consentimiento, sin pruebas de infección, para los que se había programado una cirugía no urgente. Se recogió sangre en tubos con EDTA en el momento del hemocultivo inicial y se dejaron inmediatamente en hielo. Se separó el plasma y las capas leucocitarias y se transfirieron 2 alícuotas de 1 ml a crioviales con código de barras a -20°C hasta su traslado a un congelador de -80°C asegurado con alarma. Se asignaron números de identificación del estudio en dichos formularios de reclutamiento securizados y se utilizaron durante todos los análisis posteriores; de esta manera, los investigadores que analizaban la expresión génica en estos pacientes desconocían la identidad o curso clínico de cada paciente, que solo se reveló durante el análisis final de los datos. Los datos clínicos fueron almacenados en una base de datos Oracle en un servidor RSS encriptado y con firewall situado en el hospital St Paul's.

Los médicos investigadores recolectaron los datos clínicos retrospectivamente sin conocimiento de los datos de secuencias de ARN. Se definió una nueva disfunción orgánica basándose en los valores de laboratorio recogidos en el sistema electrónico de registro médico. Las insuficiencias orgánicas agudas evaluadas fueron la presencia de choque (tratamiento con un vasopresor), el síndrome de distrés respiratorio agudo (que requería ventilación mecánica), la coagulopatía (recuento de plaquetas <80/μl), insuficiencia hepática (nivel total de bilirrubina >34 μmol/l) y lesión renal aguda (una elevación del nivel sérico de creatinina ≥26,5 μmol/l o ≥1,5 veces respecto al nivel basal. Las constantes vitales iniciales se extrajeron retrospectivamente a partir de registros en papel.

Tabla 3: datos de pacientes individuales reclutados para el estudio de cohortes controlado

ID de lab.	UCI o no UCI ¹	Nº de órganos con insuficiencia*	Criterios diagnósticos ²					Primera presión parcial de CO ₂	
			Microbiología [§]	Presión arterial en el triaje, sistólica/diastólica	Recuento inicial de leucocitos	Temp. en el triaje (°C)	Frecuencia cardíaca en el triaje		Frecuencia respiratoria en el triaje
GRUPO DE SEPSIS									
612920	UCI	4	Positivo	94/62	17	37,8	170	40	ND ³
154114	UCI	3	Positivo	73/45	22,4	36,7	73	32	38
297580	UCI	4	Positivo	86/40	10,4	35,3	56	16	30
212463	UCI	3	Positivo	165/101	19,1	37,5	98	34	71
708631	UCI	2	Positivo	100/61	8	38,2	96	10	42
799587	UCI	5	Positivo	84/45	7,2	37	127	22	25
795380	UCI	3	Positivo	139/90	4,2	30,4	53	22	61
913994	UCI	4	Positivo	81/62	10,4	39,3	139	40	26
889485	UCI	4	Positivo	67/53	16,3	36,1	142	26	30
137731	UCI	3	Positivo	130/78	19,8	36,4	100	16	52
862476	UCI	4	Positivo	136/80	25,8	39,2	110	30	49
864637	UCI	4	Positivo	83/54	11,3	37,2	126	26	51
980414	UCI	3	Positivo	112/62	26,3	37,9	126	44	35
375523	UCI	4	Positivo	134/58	37,7	38,5	133	34	ND
364132	No UCI	0	Positivo	98/68	9,4	38,3	119	22	ND
450578	No UCI	0	Positivo	86/44	18,4	37,7	86	18	ND
694402	No UCI	1	Positivo	175/81	2,2	37,4	118	22	ND
732740	No UCI	2	Positivo	155/83	3,2	37,1	107	22	ND
826967	No UCI	1	Positivo	129/66	23,8	37,2	109	20	ND
300271	UCI	3	Negativo	103/57	15,3	36,7	102	22	42
679797	UCI	3	Negativo	96/57	40	36,9	127	24	ND
266144	UCI	4	Negativo	217/121	2,1	36,5	135	20	28

(continuación)

ID de lab.	UCI o no UCI ¹	Nº de órganos con insuficiencia*	Criterios diagnósticos ²	Presión arterial en el triaje, sistólica/diastólica	Recuento inicial de leucocitos	Temp. en el triaje (°C)	Frecuencia cardíaca en el triaje	Frecuencia respiratoria en el triaje	Primera presión parcial de CO ₂
GRUPO DE SEPSIS									
602395	UCI	3	Negativo	105/95	12,9	37,5	92	ND	37
476146	UCI	3	Negativo	106	15,2	36,2	105	- ⁴	44
853176	No UCI	0	Negativo	139/69	14,4	37,1	105	23	ND
220171	No UCI	2	Negativo	76/51	3,3	39	109	18	ND
581691	No UCI	1	Negativo	102/57	19,5	36,7	105	24	ND
823914	No UCI	0	Negativo	90/52	12,3	37,2	138	28	ND
155286	No UCI	0	Negativo	141/79	14,8	36,4	114	20	ND
658301	No UCI	1	Negativo	114/76	16,6	36,7	119	16	ND
800267	No UCI	1	Negativo	143/97	6,3	36,5	130	24	ND
235545	No UCI	0	Negativo	103/78	21,8	36,4	105	18	ND
342306	No UCI	1	Negativo	120/73	12,1	36,7	136	16	ND
468026	No UCI	0	Negativo	171/110	6,4	37,3	101	22	ND
522087	No UCI	0	Negativo	124/62	7	36,7	120	38	ND
716574	No UCI	1	Negativo	117/89	5,8	36,4	106	40	ND
746024	No UCI	1	Negativo	91/55	19,1	37,4	90	28	ND

(continuación)

GRUPO NO SEPSIS										
ID de lab.	UCI o no UCI ¹	Nº de órganos con insuficiencia*	Criterios diagnósticos ²				Temp. en el triaje (°C)	Frecuencia cardíaca en el triaje	Frecuencia respiratoria en el triaje	Primera presión parcial de CO ₂
			Microbiología ³	Presión arterial en el triaje, sistólica/diastólica	Recuento inicial de leucocitos					
402569	UCI	3	Positivo	123/74	10,4	37,1	74	16	31	
941715	No UCI	0	Positivo	119/65	5,1	36,8	82	16	ND	
583654	No UCI	0	Positivo	180/96	7,6	36,4	64	20	ND	
237093	No UCI	0	Positivo	102/58	10,3	36,6	82	16	ND	
355472	No UCI	1	Positivo	147/70	13,4	38	66	20	ND	
416442	No UCI	2	Positivo	133/62	7	39,5	89	20	ND	
439362	No UCI	1	Positivo	146/84	5,6	36,8	89	16	ND	
701198	No UCI	1	Positivo	147/68	5,6	36,4	107	18	ND	
583577	UCI	2	Negativo	203/111	11,2	36	85	32	73	
749752	UCI	3	Negativo	85/50	12,3	36,6	60	18	ND	
673143	UCI	4	Negativo	162/87	9,1	36,8	90	20	40	
362763	UCI	3	Negativo	126/60	7,3	37	90	_3	39	
377121	UCI	1	Negativo	128/88	4,8	37,2	115	20	36	
288187	No UCI	0	Negativo	95/57	9,7	36,9	98	20	ND	
993234	No UCI	0	Negativo	152/57	6,8	36,6	88	24	ND	
890426	No UCI	1	Negativo	135/75	8,1	37,6	105	16	ND	
290697	No UCI	0	Negativo	100/61	8,4	36,7	91	20	ND	
104582	No UCI	0	Negativo	140/88	17,1	36,6	74	20	ND	
245286	No UCI	0	Negativo	136/75	5,7	36,8	105	20	ND	
417642	No UCI	0	Negativo	120/60	6,9	36,7	77	24	ND	
911536	No UCI	0	Negativo	123/80	4,3	39,4	90	18	ND	

(continuación)

GRUPO NO SEPSIS										
ID de lab.	UCI o no UCI ¹	Nº de órganos con insuficiencia*	Criterios diagnósticos ²							
			Microbiología ³	Presión arterial en el triaje, sistólica/diastólica	Recuento inicial de leucocitos	Temp. en el triaje (°C)	Frecuencia cardíaca en el triaje	Frecuencia respiratoria en el triaje	Primera presión parcial de CO ₂	
346081	No UCI	0	Negativo	167/70	2,1	36,9	72	20	ND	
449469	No UCI	0	Negativo	127/78	5,9	37,3	104	16	ND	
568243	No UCI	1	Negativo	159/98	6,7	36,9	93	18	ND	
695232	No UCI	1	Negativo	142/84	19,1	37,8	90	16	ND	
770905	No UCI	0	Negativo	123/60	13,2	35,4	73	16	ND	
929438	No UCI	1	Negativo	170/102	12,8	37,4	83	16	ND	
602005	No UCI	0	None ⁵	130/66	1,8	36,6	64	14	ND	
145305	No UCI	0	Negativo	142/75	8,4	36,8	67	18	ND	
366713	No UCI	0	Negativo	91/58	10,8	36,6	71	16	ND	
332278	No UCI	1	Negativo	99/59	8,5	36,6	86	16	ND	
379752	No UCI	0	Negativo	130/69	10,6	36,9	65	16	ND	
669339	No UCI	0	Negativo	123/80	5,9	37	77	16	ND	
310017	No UCI	0	Negativo	141/96	11,4	36,9	88	20	ND	
504886	No UCI	0	Negativo	99/55	ND	36,4	66	16	ND	

Tabla 3, notas al pie: * en las 48 h siguientes a la sospecha de sepsis, ³ la mayoría en las 48 h siguientes a la sospecha de sepsis. Indica si el paciente fue transferido a la UCI tras la primera exploración clínica, ²Criterios diagnósticos de sepsis según [Bone RC, RA Balk, FB Cerra, RP Dellinger, AM Fein, WA KNDus, RM Schein, WJ Sibbald, ASCC Committee, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis, ACCP/SCCM Consensus Conference Committee, American College of Chest Physicians/Soc Critical Care Medicine, 1992, Chest 2009;136:e28; Hotchkiss, RS, IE Karl, The pathophysiology and treatment of sepsis, N Engl J Med 2003; 348, 138-150]. La frecuencia respiratoria y la presión parcial de CO₂ ya no son criterios utilizados, aunque se añadieron como información complementaria.³ND: indica 'no disponible'. ⁴El paciente estaba bajo ventilación. ⁵ 'Ninguno' se refiere a que no se solicitó ningún cultivo

RNA-Seq. Se prepararon bibliotecas de ADNc a partir de ARN total con el kit de prep. de muestras de ARN total TruSeq Stranded con la guía de preparación de muestras Ribo-Zero (Illumina). Se unieron adaptadores indexados únicos (Illumina) durante la prep. de muestras y estas se analizaron agrupadas y se cargaron en un único carril de celda de flujo para reducir la variabilidad técnica. El método RNA-Seq se llevó a cabo en un instrumento GAllx (Illumina) utilizando un procedimiento de lectura única con lecturas de secuencia de 63 pb de longitud (+secuencias adaptadoras/índices). Se convirtieron datos en bruto de lectura automática de nucleótidos en archivos de secuencia FASTQ utilizando Off-Line Basecaller 1.9.4 (Illumina) y una secuencia de comandos Perl personalizada. Las lecturas se alinearon con el genoma humano hg19 utilizando el software TopHat versión 2.06 y Bowtie2 2.0.0-beta6. Las lecturas se localizaron inicialmente en transcritos Ensembl con la búsqueda de nuevas uniones deshabilitada. A continuación, las coordenadas genómicas se transformaron en recuentos de genes Ensembl codificantes de proteína. Para ello, en primer lugar, se definió un modelo génico quimérico mediante la fusión de todos los transcritos codificantes de proteína para un gen dado. Los transcritos que presentaban lecturas en menos de 50 % de sus exones en todas las muestras se definieron como no expresados y fueron excluidos del transcriptoma quimérico. Las lecturas que se solapaban con los genes quiméricos se contaron mediante la utilización de la secuencia de comandos htseq-count en el modo intersección (no vacío) (ver el sitio web de EMBL). La secuencia de comandos descarta las lecturas con múltiples localizaciones en el mapa genómico, así como lecturas que se solapan en múltiples genes diferentes, a fin de generar un archivo de recuentos génicos de localización única.

Análisis de los datos. Todo el procesamiento de los datos se llevó a cabo en R utilizando Bioconductor. Para el metaanálisis, se descargaron conjuntos de datos normalizados de NCBI GEO utilizando el paquete GEOquery de Bioconductor. Se incluyó una etapa adicional de normalización en cuantiles en el caso de que los datos requiriesen normalización adicional. Para el análisis de RNA-Seq, se normalizaron los datos utilizando la función Voom en el paquete Limma, que convierte los recuentos de lecturas en recuentos ponderados en base logarítmica 2 por millón. Tanto para el metaanálisis como los análisis de RNA-Seq, se resumieron los datos utilizando el modelo lineal en el paquete Limma.

Definición y análisis de firmas génicas. Las firmas génicas de tolerancia a endotoxinas e inflamatoria se obtuvieron a partir de análisis de micromatrices publicados anteriormente [Pena et al., 2011] de PBMC humanas que identificaban los genes expresados diferencialmente en comparación con PBMC de control. Para permitir comparaciones más directas entre firmas, los genes inflamatorios expresados diferencialmente se redujeron adicionalmente de 178 a 93 genes, utilizando un conjunto de datos de micromatrices de endotoxemia experimental (GSE3284) obtenido de las PBMC de individuos sanos estimulados *in vivo* con una dosis baja de LPS durante 2 y 6 horas. Es importante señalar que los dos conjuntos de datos de expresión génica primaria (GSE22248 y GSE3284) utilizados para obtener firmas seguidamente fueron excluidos de las pruebas posteriores de validación de conjuntos de datos. El análisis de la presencia o ausencia de las firmas de tolerancia a endotoxinas e inflamatoria en pacientes y controles se llevó a cabo utilizando la bien establecida prueba estadísticamente rigurosa de grupo de genes ROAST. Las pruebas de grupo de genes preguntan esencialmente si un grupo/firma génica dado presenta una frecuencia enriquecida de una firma en un conjunto de datos. El método ROAST además permite la consideración de la dirección de expresión de un gen durante el cálculo del enriquecimiento, lo que incrementa la precisión de la prueba en casos en que se conoce la dirección de expresión del gen (Wu et al., Bioinformatics, 2010; 26(17):2176-82). Se ejecutó ROAST con 99999 rotaciones, de manera que el valor de p más significativo que resultó de este análisis fue de 0,00001. También se definieron firmas adicionales relacionadas con la tolerancia a endotoxinas en múltiples umbrales de significancia a partir del conjunto de datos anteriormente publicado (figura 4) y de un conjunto de datos independiente alternativo de tolerancia a endotoxinas [Del Fresno C, et al. Journal of Immunology 2009; 182:6494-507] procedente de pacientes de fibrosis quística, con resultados esencialmente idénticos.

Análisis de bosque aleatorio de predicciones diagnósticas. Cada conjunto de datos se dividió en conjuntos de entrenamiento (que contenían 75 % de los pacientes de sepsis y controles) y de ensayo (que contenían 25 % de pacientes de sepsis y controles) utilizando el muestreo aleatorio. Se omitieron los conjuntos de datos GSE13015 y GSE11755 de dicho análisis debido al bajo número de controles (N=3) en cada conjunto de datos. Para cada uno de los restantes 8 conjuntos de datos, se definió el modelo en el conjunto de entrenamiento y después se evaluó en el conjunto de ensayo utilizando el paquete randomForest [Liaw A, Wiener M. R News 2002; 2:18-22] con ntree configurado en 1000. Se repitió el procedimiento 100 veces y se registraron las precisiones de predicción medias para cada conjunto de datos.

EJEMPLO 1: definición y caracterización de la firma.

Los pacientes de sepsis confirmada expresan una "Firma de tolerancia a endotoxinas". Con el fin de caracterizar el desarrollo del estadio inmunosupresor en la sepsis y determinar concluyentemente sus relaciones con la tolerancia a endotoxinas, se adoptó un enfoque bioinformático robusto. Para definir una firma génica de tolerancia a endotoxinas, se utilizaron análisis de micromatrices de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) humana tratadas o bien una vez con LPS para modelizar la señalización inflamatoria, o dos veces para modelizar la tolerancia a endotoxinas. Se identificó una "Firma de tolerancia a endotoxinas" (Tabla A, posteriormente), que comprendía 99 genes, basándose en genes expresados diferencialmente de forma única en PBMC tolerantes a endotoxinas, aunque no en PBMC inflamatorias, comparado con controles. A título comparativo, los presentes

inventores definieron una "Firma inflamatoria" a partir de datos de micromatrices de PBMC anteriores (Pena et al., 2011) y un conjunto de datos de endotoxemia experimental *in vivo* (Calvano et al., 2005) (figura 1, Tabla 4). Tras definir una firma genética para la tolerancia a endotoxinas, los presentes inventores llevaron a cabo un meta-análisis global de 9 cohortes publicadas de sepsis clínica independientes y con enmascaramiento, que comprendían 536 pacientes de sepsis temprana (1 o 3 días después de la admisión en la UCI) y 142 controles sanos (Tabla 2, figuras 2, 3 y 4). En la totalidad de dichos conjuntos de datos reanalizados, los pacientes habían sido reclutados 1 o 3 días después de la admisión en la UCI.

Tabla A: genes de Firma de tolerancia a endotoxinas y su expresión relativa en PBMC tolerantes a endotoxinas vs. controles

Símbolo génico	Descripción	Factor de cambio
ADAM15	Dominio 15 de metalopeptidasa ADAM	-2,1
ADAMDEC1	Proteína similar a ADM, decisina 1	3,0
ALCAM	Molécula de adhesión celular de leucocitos activada	-2,0
ALDH1A1	Miembro 1 de la familia de la aldehído deshidrogenasa 1	-3,8
ANKRD1	dominio 1 de repetición de anquirina (músculo cardíaco)	4,1
C19orf59	marco de lectura abierta 59 del cromosoma 19	12,6
CA12	Anhidrasa carbónica XII	8,2
CAMP	Péptido antimicrobiano catelicidina	-3,9
CCL1	Ligando 1 de quimioquina (motivo C-C); SCYA1	7,1
CCL19	Ligando 19 de quimioquina (motivo C-C); MIP3 β	4,1
CCL22	Ligando 22 de quimioquina (motivo C-C); MDC	7,0
CCL24	Ligando 24 de quimioquina (motivo C-C); Eotaxina-2	19,8
CCL7	Ligando 7 de quimioquina (motivo C-C)	21,0
CD14	Molécula CD14	2,5
CD300LF	miembro F de la familia de moléculas similares a CD300	2,1
CD93	Molécula CD93	4,6
CDK5RAP2	proteína 2 asociada a la subunidad reguladora de CDK5	2,2
CPVL	Carboxipeptidasa, tipo vitelogénico	-3,6
CST3	Cistatina C	-4,2
CST6	Cistatina E/M	-2,5
CTSK	Catepsina K	-2,4
CXCL10	Ligando 10 de quimioquina (motivo C-X-C)	-9,9
CYP1B1	Polipéptido 1, subfamilia B, familia 1, citocromo P450	2,1
CYP27B1	Polipéptido 1, subfamilia B, familia 27, citocromo P450	3,0
DDIT4	Transcrito 4 inducible por daño en el ADN	2,2
DHRS9	Miembro 9 de deshidrogenasa/reductasa (familia SDR)	-5,7
DPYSL3	Molécula 3 similar a dihidropirimidinasa	2,6
EGR2	Proteína 2 de respuesta de crecimiento temprano	2,0
EMR1	Proteína 1 similar a receptor hormonal, de tipo mucina, que contiene un módulo similar a EGF	2,1
EMR3	Proteína 3 similar a receptor hormonal, de tipo mucina, que contiene un módulo similar a EGF	2,4
FBP1	Fructosa-1,6-bisfosfatasa 1	3,2
FCER1G	Receptor fragmento Fc de Ig γ , de alta afinidad I; polipéptido gamma	2,0
FCER2	Receptor fragmento Fc de Ig ϵ ; de baja afinidad II (CD23)	2,9
FPR1	Receptor 1 de péptido formilo	5,7
FPR2	Receptor 2 de péptido formilo	4,9
GK	Glicerol quinasa	2,3
GPMB	Glucoproteína (transmembranal) NMB	-8,1
GPR137B	receptor 137B acoplado con proteína G	2,2
HBEGF	factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina	2,5
HIST1H1C	Agregado de histonas 1, H1C	2,3
HIS T2H2AA3	Agregado de histonas 2, H2AA3	4,0
HIS T2H2AC	Agregado de histonas 2, H2AC	3,6
HK2	Hexoquinasa 2	2,4
HK3	Hexoquinasa 3 (leucocito)	2,1
HPSE	Heparanasa	2,4
HSD11B1	Hidroxiesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1	4,1

(continuación)

Símbolo génico	Descripción	Factor de cambio
HTRA1	HTRA serina peptidasa 1	-3,3
IL18BP	Proteína de unión a interleuquina 18	-3,5
IL3 RA	Receptor de interleuquina 3, alfa (baja afinidad)	4,2
ITGB8	Integrina, beta 8	2,1
KIAA1199	KIAA1199	4,1
LILRA3	Receptor de tipo inmunoglobulina leucocitario, subfamilia A (sin dominio TM), miembro 3	14,0
LILRA5	Receptor de tipo inmunoglobulina leucocitario, subfamilia A (co dominio TM), miembro 5	2,6
LIPA	Lipasa A, ácido lisosómico, colesterol esterasa	-4,5
LY86	Antígeno linfocitario 86	-2,6
MARCO	Receptor de macrófago con estructura colagenosa	3,7
MGST1	Glutathión S-transferasa 1 microsómica	2,7
MMP7	Metalopeptidasa matricial 7 (matrilisina, uterina)	12,0
MT1F	Metalotioneína 1F	16,2
MT1G	Metalotioneína 1G	61,1
MT1H	Metalotioneína 1H	51,1
MT1M	Metalotioneína 1M	23,8
MT1X	Metalotioneína 1X	14,8
MXD1	Proteína 1 de dimerización MAX	2,0
MYADM	Marcador de diferenciación asociado a célula mieloide	2,1
NEFH	Neurofilamento, polipéptido pesado	2,1
NQO1	NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 1	-2,3
NRIP3	Proteína 3 de interacción con receptor nuclear	2,2
OLIG2	Factor de transcripción 2 del linaje de oligodendrocitos	2,5
PANX2	Panexina 2	2,7
PAPLN	Papilina, glucoproteína sulfatada similar a proteoglicano	2,0
PDLIM7	PDZ y LIM dominio 7 (enigma)	3,1
PLAUR	Activador del plasminógeno, receptor de uroquinasa	2,7
PLD3	Familia de la fosfolipasa D, miembro 3	-3,1
PPBP	Proteína básica proplaquetaria (ligando 7 de quimioquina (motivo C-X-C))	6,8
PROCR	Receptor de proteína C, endotelial	2,0
PSTPIP2	Proteína 2 de interacción con la prolina-serina-treonina fosfatasa	-2,1
PTGES	Prostaglandina-E sintasa	3,3
PTGR1	Prostaglandina reductasa 1	2,6
RAB13	RAB13, miembro de la familia del oncogén RAS	2,3
RARRES1	Respondedor de receptor del ácido retinoico (inducido por tazaroteno) 1	-3,8
RETN	Resistina	4,4
RHBDD2	Proteína 2 que contiene dominio romboide	2,9
RNASE 1	Ribonucleasa, familia de la ARNasa A, 1 (pancreática)	-10,4
S100A12	proteína S100 de unión al calcio A12	3,7
S100A4	proteína S100 de unión al calcio A4	-2,7
S100A8	proteína S100 de unión al calcio A8	2,1
S100A9	proteína S100 de unión al calcio A9	2,5
SERPINA1	Inhibidor de serpina peptidasa, clado A (α -1 anti-proteinasa, antitripsina), miembro 1	5,7
SERPINB7	Inhibidor de serpina peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 7	4,3
SLC16A10	Miembro 10 (transportador de aminoácidos aromáticos), familia de portadores de solutos 16	2,9
SLC7A11	Familia de portadores de solutos 7 (cadena ligera del transportador de aminoácidos aniónicos, sistema xc-), miembro 11	2,3
TGM2	Transglutaminasa 2	2,1
TLR7	receptor 7 de tipo Toll	-2,2
TMEM158	Proteína transmembranal 158 (gen/pseudogén)	2,1
TREM1	Receptor inductor expresado sobre células mieloides 1	3,5
TSPAN4	Tetraspanina 4	-2,4
UPP1	Uridina fosforilasa 1	2,1
VCAN	Versicán	5,3

Tabla 4: genes de Firma inflamatoria y su expresión relativa en PBMC inflamatorias vs. controles

Símbolo génico	Descripción	Factor de cambio
CCL20	Ligando 20 de quimioquina (motivo C-C); MIP3 α	14,6
CCL3L1	Proteína 1 similar a ligando 3 de quimioquina (motivo C-C); MIP1AP	9,2
G0S2	conmutador 2 de G0/G1	7,2
CFB	Factor B del complemento	6,1
AK4	Adenilato ciclasa 4	5,4
IFIT3	Proteína inducida por interferón con repeticiones tetratricopéptido 3	5,1
HERC5	Dominios HECT y RLD que contienen la E3 ubiquitina-proteína ligasa 5	4,8
PDSS1	Prenil (decaprenil) difosfato sintasa, subunidad 1	4,8
BATF	Factor de transcripción de cremallera de leucinas básico, similar a ATF	4,7
DNAAF1	Dineína, axonemal, factor de ensamblaje 1	4,7
XAF1	Factor 1 asociado a XIAP	4,4
PIM2	Oncogén PIM-2	4,2
IFI44	Proteína 44 inducida por interferón	3,7
F3	Factor de coagulación III (tromboplastina, factor tisular)	3,6
FAM129A	Familia con similitud de secuencias 129, miembro A	3,5
IFIT2	Proteína inducida por interferón con repeticiones tetratricopéptido 2	3,4
KCNJ2	Canal de potasio rectificador entrante, subfamilia J, miembro 2	3,4
MX2	Proteína 2 de resistencia a mixovirus (virus influenza) (ratón)	3,4
EIF2AK2	Factor de inicio de traducción eucariótico 2-alfa quinasa 2	3,2
CCL3L3	Proteína 3 similar a ligando 3 de quimioquina (motivo C-C); LD78	3,1
IRF7	Factor regulador de interferón 7	3,1
CXCL2	Ligando 2 de quimioquina (motivo C-X-C); MIP2 α	3,0
FFAR2	Receptor 2 de ácidos grasos libres	3,0
RIPK2	Serina-treonina quinasa 2 de interacción con receptores	3,0
ADORA2A	Receptor de adenosina A2a	2,9
SAMD9L	Proteína similar a proteína 9 que contiene dominio de motivo alfa estéril	2,9
GRAMD1A	Dominio GRAM que contiene 1A	2,8
SOD2	Superóxido dismutasa 2, mitocondrial	2,8
SOCS1	Supresor de señalización de citoquinas 1	2,7
CD80	Molécula CD80	2,6
TNF	Factor de necrosis tumoral	2,6
CASP5	Caspasa 5, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis	2,5
CD83	Molécula CD83	2,5
IFI35	Proteína 35 inducida por interferón	2,5
PIM1	Oncogén Pim-1	2,5
SLAMF7	Miembro 7 de la familia SLAM	2,5
TRIM25	Proteína 25 que contiene motivo tripartito	2,5
C1orf122	Marco de lectura abierta 122 del cromosoma 1	2,4
GBP4	Proteína de unión a guanilato 4	2,4
PIM3	Oncogén Pim-3	2,4
GBP2	Proteína de unión a guanilato 2, inducible por interferón	2,3
RNF144B	Proteína de dedo anular 144B	2,3
TXN	Tiorredoxina	2,3
YRDC	Proteína que contiene dominio Yrdc (<i>E. coli</i>)	2,3
ALCAM	Molécula de adhesión celular de leucocitos activada	2,2
ANTXR2	Receptor 2 de toxina del ántrax	2,2
ISG20	Gen de exonucleasa estimulada por interferón, 20 kDa	2,2
OASL	Proteína similar a 2',5'-oligoadenilato sintetasa	2,2
PARP9	Familia de polimerasa poli(ADP-ribosa), miembro 9	2,2
PTX3	Pentraxina 3, larga	2,2
TNFAIP2	Factor de necrosis tumoral, proteína 2 inducida por alfa	2,2
TNFSF10	Superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 10	2,2
B4GALT5	UDP-Gal:betaglucnac beta 1,4-galactosiltransferasa, polipéptido 5	2,1
BCL3	Proteína 3 de LLC/linfoma de células B	2,1
EDN1	Endotelina 1	2,1
GADD45B	Proteína de detención del crecimiento e inducible por daño en el ADN, beta	2,1
IRAK2	Quinasa 2 asociada a receptor de interleuquina-1	2,1

(continuación)

Símbolo génico	Descripción	Factor de cambio
JUNB	Protooncogén Jun B	2,1
MTF1	Factor de transcripción 1 regulado por metales	2,1
NFKB2	Factor nuclear 2 de intensificador génico del polipéptido ligero kappa en células B	2,1
SAMD9	Proteína 9 que contiene dominio de motivo alfa estéril	2,1
UPB1	Ureidopropionasa, beta	2,1
GCH1	GTP ciclohidrolasa 1	2,0
HSH2D	Proteína que contiene dominio SH2 hematopoyético	2,0
NFKBIZ	Factor nuclear de intensificador génico del polipéptido ligero kappa en inhibidor de células B, zeta	2,0
TNIP 1	Proteína 1 de interacción con TNFAIP3	2,0
ZC3H12A	Proteína 12A que contiene proteína de dedo de zinc de tipo CCCH	2,0
CORO1B	Coronina, proteína de unión a actina, 1B	-2,0
H2AFY	Familia de la histona 2A, miembro Y	-2,0
IFFO1	Familia de filamentos intermedios huérfanos 1	-2,0
SPIRE 1	Homólogo de Spire 1 (<i>Drosophila</i>)	-2,0
TSC22D3	Familia del dominio TSC22, miembro 3	-2,0
CSF1R	Receptor del factor estimulante de colonias 1	-2,1
PLIN2	Perilipina 2	-2,1
ZMIZ1	Proteína 1 que contiene proteína de dedo de zinc de tipo MIZ	-2,1
CTSB	Catepsina B	-2,2
LPAR6	Receptor 6 de ácido lisofosfatídico	-2,2
MS4A7	Proteína de 4 dominios transmembranal, subfamilia A, miembro 7	-2,2
SLAMF8	Miembro 8 de la familia SLAM	-2,2
IDH1	Isocitrato deshidrogenasa 1 (NADP+), soluble	-2,3
LTA4H	Leucotrieno A4 hidrolasa	-2,4
CAMK1	Proteína quinasa I dependiente de calcio/calmodulina	-2,5
CORO1C	Coronina, proteína de unión a actina, 1C	-2,5
CLEC10A	Familia 10 de dominio de lectina de tipo C, miembro A	-2,9
CD86	molécula CD86	-3,1
PDK4	Piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 4	-3,1
ACP5	Fosfatasa ácida 5, resistente a tartrato	-3,2
HAVCR2	Receptor celular 2 del virus de la hepatitis A	-3,2
ASGR1	Receptor 1 de asialoglucoproteína	-3,4
NCEH1	Éster de colesterol hidrolasa neutra 1	-3,6
RCBTB2	Regulador de la condensación cromosómica (RCC1) y dominio 2 de BTB (POZ)	-3,9
ADAP2	ArfGAP con dominios PH duales 2	-4,6
HMOX1	Hemooxigenasa (deciclante) 1	-5,5

- Con el fin de evaluar la expresión relativa de las firmas de tolerancia a endotoxinas e inflamatoria en pacientes de sepsis frente a controles sanos, se utilizó un enfoque de prueba de conjuntos génicos, que examina si una firma (conjunto génico) dada está significativamente enriquecida entre grupos en un conjunto de datos. Se encontró que los
- 5 pacientes de sepsis en la totalidad de las 9 cohortes mostraban un perfil de expresión inmunitaria fuertemente asociado con la Firma de tolerancia a endotoxinas en comparación con los controles (figura 2). Estos resultados eran independientes de los umbrales de factor de cambio/estadísticos que se utilizaron para definir la Firma de tolerancia a endotoxinas (figura 4). Aunque la Firma inflamatoria estaba significativamente asociada a la mayoría de los conjuntos
- 10 de datos, esta asociación era consistentemente más débil para la Firma de tolerancia a endotoxinas (figura 3). En contraste con informes anteriores que asocian la tolerancia a endotoxinas únicamente a la sepsis de estadio tardío (Cavillon J, C Adrie, C Fitting, M Adib-Conquy. J Endotoxin Res 2005; 11:311-320; Otto, GP, M Sossdorf, RA Claus, J Rodel, K Menge, K Reinhart, M Bauer, NC Riedemann. Critical Care 2011; 15:R183; Schefold JC, D Hasper, HD Volk, PReinke. Medical hypotheses 2008; 71:203-208), la asociación con la "Firma de tolerancia a endotoxinas" se
- 15 encontraba presente en pacientes de sepsis ya incluso en el día 1 después de la admisión en la UCI y se mantenía el día 3, concordando con el desarrollo temprano de un perfil "estable" de tolerancia a endotoxinas en los pacientes de sepsis (figura 2). De esta manera, la disfunción inmunitaria en la sepsis aparentemente se caracteriza por la tolerancia a endotoxinas.
- 20 La "Firma de tolerancia a endotoxinas" se desarrolla muy pronto en los pacientes con sepsis y es detectable antes del diagnóstico. Una limitación de la totalidad de los 9 conjuntos de datos publicados anteriormente y que se utilizaron en el metaanálisis anterior fue el análisis del transcriptoma de pacientes de sepsis después del "diagnóstico confirmado" de sepsis y no en la primera presentación. De acuerdo con lo anterior, se generó una cohorte única de pacientes en

el estadio más temprano posible de la enfermedad clínica a fin de entender mejor la sucesión temporal del desarrollo de la tolerancia a endotoxinas y la utilidad diagnóstica de la firma identificada en la presente memoria. Los pacientes fueron reclutados inmediatamente después de la sospecha clínica de sepsis, basada en el análisis del médico responsable de los antecedentes del paciente, la exploración física y la solicitud de análisis de cultivos microbianos. Se llevó a cabo RNA-Seq en ARN aislado a partir de la muestra de sangre inicial obtenida para cultivos a fin de ayudar en el diagnóstico/identificación microbiana de la sepsis. Se llevó a cabo un cálculo de la potencia apropiada y basándose en éste, se reclutaron 72 pacientes con sospecha muy temprana de sepsis (Tabla 3), así como 11 pacientes adicionales de control, que fueron reclutados antes de una cirugía electiva sin morbilidades subyacentes. La investigación del potencial de un medio temprano de diagnóstico diferencial en dicha cohorte clínicamente problemática de pacientes que inicialmente se ha presentado con trastornos graves variables de tipo fisiológico (potencialmente causados por sepsis) tiene importantes implicaciones clínicas.

Basándose en las evaluaciones clínicas registradas más tempranas tras el aislamiento de las muestras (Tabla 3), los pacientes en la cohorte de 72 pacientes con sospecha de sepsis fueron clasificados retrospectivamente como "Sepsis" (n=37) o "No sepsis" (n=35), de acuerdo con los criterios diagnósticos actuales de sepsis (R. C. Bone et al., 2009). Inesperadamente, incluso en el estadio más temprano de sepsis clínica, la Firma de tolerancia a endotoxinas se encontraba significativamente enriquecida solo en los pacientes que posteriormente se confirmó que presentaban sepsis, y no en aquellos con otros diagnósticos ("No sepsis"), en comparación con los controles sanos (fig. 5A). En combinación con los resultados de los metaanálisis anteriores, la sepsis aparentemente está fuertemente asociada a la tolerancia a endotoxinas durante todos los estadios iniciales de la enfermedad clínica (figs. 2 y 5A). Además, aunque la Firma inflamatorio no alcanzó la significancia estadística en el grupo "No sepsis", el diferente enriquecimiento relativo de la Firma de tolerancia a endotoxinas y la Firma inflamatoria en los 2 grupos podría indicar una diferencia fundamental en el equilibrio de tolerancia a endotoxinas e inflamación exclusivo de los pacientes de sepsis: Finalmente, la Firma de tolerancia a endotoxinas también se encontraba enriquecida en el grupo "Sepsis" al compararlo directamente con el grupo "No sepsis" (fig. 5B), lo que apoya la especificidad de la tolerancia a endotoxinas para la sepsis, y no solo para pacientes "enfermos".

Uno de los retos del diagnóstico de la sepsis es la confirmación de la infección debido a la baja sensibilidad de los cultivos bacterianos (RC Bone et al., 2009). En efecto, los criterios diagnósticos actuales de sepsis se basan en "sospechas de infección", en lugar de una infección confirmada debido a dichas cuestiones de sensibilidad (RC Bone et al., 2009). Dicho concepto se puso de manifiesto en la comparación entre el enriquecimiento de la firma y los resultados del cultivo microbiano en ambos grupos de pacientes. De acuerdo con los resultados anteriores, la Firma de tolerancia a endotoxinas era más alta en el "grupo de sepsis" (fig. 5C) y la Firma inflamatoria en el grupo "no sepsis" con independencia del resultado del cultivo microbiano (fig. 5D), subrayando adicionalmente la interesante tendencia inversa de las firmas en estos dos grupos de pacientes "enfermos". Tal como se esperaba, dadas las cuestiones de sensibilidad de los cultivos microbianos, aunque la Firma de tolerancia a endotoxinas mostraba un enriquecimiento más significativo en el grupo con cultivo positivo, también se observaba un fuerte enriquecimiento en el grupo con cultivo negativo, lo que concuerda con la presencia de pacientes posiblemente identificados incorrectamente como "negativos para infección" en este grupo (fig. 5C). Debido a que el análisis de RNA-Seq se llevó a cabo en las mismas muestras de sangre utilizadas para los cultivos microbianos diagnósticos, la fuerte asociación entre sepsis y la Firma de tolerancia a endotoxinas sugiere que la Firma de tolerancia a endotoxinas podría proporcionar una herramienta más sensible para el diagnóstico que el cultivo microbiano.

Conjuntamente estos datos muestran que la tolerancia a endotoxinas está presente durante todo el curso clínico inicial de la sepsis, detectable antes del "diagnóstico", y que puede utilizarse para diferenciar pacientes que desarrollan sepsis en una cohorte de pacientes en la que hay una sospecha de sepsis.

Tabla 5: estadísticos referentes a insuficiencia orgánica y sitios de infección en la cohorte de pacientes

A. Sitio de insuficiencia orgánica	Número de pacientes
Pulmón (insuficiencia respiratoria)	22
Riñón (lesión renal aguda)	41
Hígado	9
Sistema cardiovascular	22
B. Sitio de infección	
Sangre	9
Tracto urinario	10
Tracto respiratorio	6
Tracto gastrointestinal	4
Piel y tejidos blandos	3
Hueso	1

A continuación, se investigó la relevancia del estado inmunosupresor controlado por la tolerancia a endotoxinas (según se detecta mediante la Firma de tolerancia a endotoxinas) para la gravedad de la sepsis según se define por el

desarrollo posterior de disfunción orgánica en la cohorte de pacientes con sospecha de sepsis. Se evaluó el desarrollo posterior de disfunción orgánica en las 48 horas siguientes al reclutamiento en el estudio (cardiovascular, coagulación, renal, hepática y respiratoria; Tablas 4 y 5) en pacientes agrupados retrospectivamente en grupos positivo para disfunción orgánica y negativo para disfunción orgánica, con independencia del diagnóstico de sepsis. A continuación, dichos grupos fueron sometidos al mismo análisis de prueba del conjunto génico que anteriormente. Resulta interesante que se encontró que la Firma de tolerancia a endotoxinas estaba asociada significativamente al desarrollo de disfunción orgánica individual o múltiple (3+) (fig. 6A, excepto insuficiencia en la coagulación). Aunque la admisión en la UCI puede depender de la subjetividad inherente del reglamento hospitalario, tal como el espacio o número de camas disponibles en cada departamento, los pacientes que se trasladan a la UCI generalmente se encuentran en un estado de progresivo deterioro, con un riesgo incrementado de mortalidad. Por lo tanto, también se evaluó el requisito de admisión en la UCI como una segunda medida menos precisa de gravedad de la enfermedad, y se observó que la Firma de tolerancia a endotoxinas nuevamente estaba asociada a una gravedad incrementada de la enfermedad (fig. 6B). Estos resultados indican que la tolerancia a endotoxinas está asociada a la gravedad de la sepsis y específicamente al desarrollo posterior de insuficiencia orgánica.

Dada la fuerte asociación entre tolerancia a endotoxinas y sepsis en más de 600 pacientes procedentes de 10 conjuntos independientes de datos, se investigó la utilidad de la Firma de tolerancia a endotoxinas como una herramienta en el diagnóstico de la sepsis. Aunque la Firma de tolerancia a endotoxinas completa de 99 genes resultó útil para caracterizar la disfunción inmunitaria en la sepsis, un número menor de genes resulta más útil en una prueba diagnóstica. De esta manera, la firma de 99 genes se analizó adicionalmente para identificar los subconjuntos útiles de dicha firma inicial que podrían someterse a ensayo posteriormente para su utilidad diagnóstica. Para ello, se seleccionaron los genes que mostraban una expresión diferencial de más de 1,5 veces entre pacientes de sepsis y controles en la mayoría (7 o más) de los 9 conjuntos de datos de la literatura. Lo anterior identificó un subconjunto de 31 genes de la Firma de tolerancia a endotoxinas original de 99 genes (fig. 7).

Se utilizó el algoritmo de clasificación randomForest para evaluar la capacidad de los genes en el subconjunto de 31 genes identificado, a fin de clasificar los pacientes de sepsis respecto de los controles. Cada conjunto de datos (externo e interno) se dividió en grupos de entrenamiento y de ensayo y se llevó a cabo la clasificación con randomForest de manera independiente en cada conjunto de datos. El subconjunto de 31 genes mostró una excelente precisión en la separación de los pacientes de sepsis respecto de los controles, con una precisión media de 95,7 % en todos los conjuntos de datos (Tabla 6). El subconjunto de 31 genes también mostró un buen comportamiento en la predicción de sepsis e insuficiencia orgánica individual/combinada en un grupo de pacientes con sospecha de sepsis, con precisiones comprendidas entre 62,4 % y 87,4 % (Tabla 6). También se llevó a cabo dicho mismo análisis con la Firma de tolerancia a endotoxinas de 99 genes completa, y se encontró que este conjunto de genes tenía un comportamiento equivalente, apoyando la idoneidad de la estrategia de reducción del número de genes (Tabla 7). La superficie bajo la curva de las evaluaciones de característica de receptor-operador (ABC) tuvo un comportamiento similar. El buen comportamiento del subconjunto de 31 genes en múltiples conjuntos diferentes de datos y en un momento clínicamente relevante (momento de los cultivos diagnósticos) apoya la utilización del subconjunto de 31 genes en el diagnóstico de la sepsis. Se identificó una fuerte asociación entre tolerancia a endotoxinas y sepsis en 10 conjuntos diferentes de datos y era independiente de las variables localización, método, sexo, edad, origen étnico y criterios diagnósticos de sepsis. De acuerdo con lo anterior, tanto la Firma de tolerancia a endotoxinas completa de 99 genes como el subconjunto de 31 genes presentará utilidad como una herramienta en el diagnóstico de la sepsis. Las herramientas diagnósticas precisas para la sepsis son una prioridad clínica elevada, debido a la importancia de la intervención precoz en la sepsis y la ausencia de características clínicas específicas a la sepsis [Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Lancet Infectious Diseases 2013; 13: 260-8]. Un beneficio adicional de utilizar biomarcadores relacionados con la tolerancia a endotoxinas es que también proporcionarían información sobre el estado funcional del sistema inmunitario del paciente.

Tabla 6: potencial diagnóstico de la Firma de tolerancia a endotoxinas*

Variable	Precisión utilizando el subconjunto de 31 genes de tolerancia a endotoxinas	Precisión utilizando la Firma de tolerancia a endotoxinas de 99 genes
Sepsis (números de pacientes entre paréntesis) vs. Controles		
Estudio de sepsis del propio laboratorio (37) vs, Controles	93,3%	92,7%
Estudio de GSE28750 (30) vs, Controles	99,3%	97,4%
Estudio de GSE9692 (45) vs, Controles	95,1%	96,6%
Estudio de GSE13904 (227) vs, Controles	96,3%	94,2%
Estudio de GSE26440 (130) vs, Controles	96,3%	96,0%

(continuación)

Variable	Precisión utilizando el subconjunto de 31 genes de tolerancia a endotoxinas	Precisión utilizando la Firma de tolerancia a endotoxinas de 99 genes
Estudio de GSE4607 (84) vs controles	93,6%	92,6%
Estudio de GSE8121 (71) vs controles	93,2%	92,2%
Estudio de GSE26378 (70) vs controles	98,3%	98,6%
Media	95,7%	95,0%
Sepsis vs No sepsis		
Sepsis vs No sepsis	62,4%	64,2%
Insuficiencia orgánica vs, No insuficiencia orgánica		
Respiratorio	77,5%	75,5%
Cardiovascular	77,2%	73,6%
Hígado	77,8%	78,0%
Lesión renal aguda	71,5%	74,1%
Coagulación	87,4%	86,4%
Combinado (3+)	77,3%	73,7%
Tabla 6, notas al pie: *Cada conjunto de datos se dividió en conjuntos de entrenamiento (que contenían 2/3 de los pacientes de sepsis y controles) y de ensayo (que contenían 1/3 de los pacientes de sepsis y controles) utilizando el muestreo aleatorio. Se omitieron los conjuntos de datos GSE13015 y GSE11755 de dicho análisis debido al bajo número de controles (N=3) en cada conjunto de datos. Para cada uno de los restantes 8 conjuntos de datos, se definió el modelo en el conjunto de entrenamiento y después se evaluó en el conjunto de ensayo utilizando el paquete randomForest con ntree configurado en 1000. Se repitió el procedimiento 1000 veces y se registraron las precisiones de predicción medias para cada conjunto de datos. Se repitió este análisis en el conjunto de datos para clasificar los pacientes con una sospecha inicial de sepsis que posteriormente desarrollaron o no desarrollaron sepsis o insuficiencia orgánica.		

- 5 La Firma de tolerancia a endotoxinas mostró una precisión excelente en la separación de los pacientes de sepsis respecto de los controles (precisión global: randomForest=95 %; superficie bajo la curva=98,9 %) y demostró una precisión similar en estudios individuales que contenían 19 a 227 pacientes (Tabla 6).
- 10 La asociación entre la Firma de tolerancia a endotoxinas y la sepsis confirmada era fuerte y estadísticamente significativa en 10 conjuntos de datos diferentes (figs. 2 y 5, Tabla 6) y era independiente del tamaño de la muestra, la localización, el método, el sexo, la edad y el origen étnico. Estos resultados confirman que la Firma de tolerancia a endotoxinas está asociada robustamente a sepsis muy temprana. La Firma de tolerancia a endotoxinas también estaba asociada a gravedad de la enfermedad, medida principalmente por el desarrollo de disfunción orgánica. Por lo tanto, está indicado un modelo actualizado de patogénesis de la sepsis mediada por una disfunción inmunitaria mediada por la tolerancia a endotoxinas. Además, los resultados muestran que la disfunción inmunitaria podría detectarse en un momento diagnóstico clínicamente relevante, proporcionando información única sobre el estado inmunitario funcional del paciente. La Firma de tolerancia a endotoxinas o subconjunto, por lo tanto, podría ayudar a definir un subconjunto de pacientes que podría beneficiarse de la inmunomodulación (p. ej., antitolerancia a endotoxinas) y terapias de apoyo.
- 15
- 20 La sepsis se clasifica generalmente como una respuesta inflamatoria excesiva (estadio temprano), seguida de una transición a un estadio dominado por antiinflamación/inmunosupresión (Hotchkiss et al., 2013). Sin embargo, la naturaleza y temporización de este último estadio no han sido bien caracterizadas. A diferencia de los informes anteriores que asocian la tolerancia a endotoxinas solo con la sepsis de estadio tardío, los resultados descritos en la presente memoria han revelado que la totalidad de las 10 cohortes de pacientes de sepsis muestran un perfil de expresión inmunitaria fuertemente asociado a la Firma de tolerancia a endotoxinas y al subconjunto, y en todos los estadios de la enfermedad clínica temprana (figs. 2, 5 y 6). Desde una perspectiva clínica general, la caracterización de la naturaleza y temporización de los estadios de inflamación excesiva y de antiinflamación/inmunosupresión resulta esencial al considerar cómo debe tratarse esta enfermedad. Lo anterior resulta especialmente importante porque los diferentes enfoques terapéuticos en gran medida han fracasado hasta el momento, probablemente debido a la falta de conocimiento sobre el estado inmunitario del paciente. Los datos proporcionados en la presente memoria muestran además que dicha firma pudo predecir el desarrollo de sepsis, lo que sugiere que la Firma de tolerancia a endotoxinas y el subconjunto presentan utilidad como una herramienta diagnóstica.
- 25
- 30
- 35 Más importante, el presente estudio ha podido demostrar con claridad la asociación entre la Firma de tolerancia a endotoxinas y su subconjunto con la gravedad de la enfermedad y la disfunción orgánica (fig. 6). La disfunción orgánica se considera el factor principal contribuyente al deterioro del paciente y, en última instancia, a la muerte. Resulta importante que la Firma de tolerancia a endotoxinas se encontraba presente hasta 48 horas antes del desarrollo de

disfunción orgánica, lo que indica que la firma o subconjunto puede utilizarse adicionalmente como un método de cribado para evaluar qué pacientes presentan un mayor riesgo de desarrollar una condición agravada.

Resulta importante señalar que, aunque los datos indican que el estado de tolerancia a endotoxinas predomina durante la sepsis temprana, la Firma inflamatoria también se encontraba significativamente enriquecida, aunque a niveles relativamente más bajos, en muchas de las comparaciones realizadas en el presente estudio. Desde una perspectiva biológica, estas observaciones sugieren que en individuos con infecciones localizadas (p. ej., en pacientes en el grupo No sepsis), al producirse un insulto inicial, la respuesta inflamatoria breve cede rápidamente para equilibrar la inflamación y llevar al sistema a la homeostasis. Sin embargo, en la sepsis, en el caso de que exista una fuente no controlada de infección y posiblemente factores genéticos contribuyentes (Murkin JM, and KR Walley, The Journal of Extra-Corporeal Technology 41, P43-49, 2009), el equilibrio inmunitario entre inflamación y tolerancia a endotoxinas llega a estar desequilibrado patológicamente hacia un estado crecientemente dominado por la tolerancia a las endotoxinas. De esta manera, los resultados en la presente memoria indican que existe una infección inicial (no controlada), durante la que las células inmunitarias en reposo, tales como los neutrófilos y los monocitos/macrófagos, resultan activados, dando como resultado que el paciente desarrolla los primeros síntomas clínicos fuertes. En pacientes sépticos, un segundo estímulo de endotoxina probablemente conduce a la rápida activación de un perfil de tolerancia a endotoxinas. Una vez se llega a la primera admisión en el hospital, dicho perfil de tolerancia a endotoxinas predomina en las células mononucleares de sangre periférica sistémicamente, mientras que todavía ocurre una inflamación neutrofílica residual en esta población en rápida multiplicación.

De esta manera, aunque sigue existiendo un componente inflamatorio en la sepsis, el estado impulsado por la tolerancia a endotoxinas está contribuyendo a la disfunción inmunitaria global en la sepsis y, de esta manera, en la gravedad de la enfermedad.

A nivel celular, la causa principal de la disfunción inmunitaria en la sepsis probablemente es la acumulación rápida de monocitos/macrófagos tolerizados, bloqueando al sistema en un estado de tipo M2 (Pena, OM, et al., J Immunol 2011, 186:7243-7254) en un intento por reducir la excesiva inflamación neutrofílica y sus consecuencias, tales como la fuga vascular, la coagulación, la muerte de linfocitos, etc. Sin embargo, el debilitamiento de las respuestas de monocitos/macrófagos en el paciente también puede conducir a una incapacidad de eliminar la infección primaria y a una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias, a pesar de la activación continua de otras poblaciones de células inmunitarias, tales como los neutrófilos. Debido a la continua renovación desde la médula ósea, los neutrófilos probablemente son los factores principales en las respuestas proinflamatorias de citoquinas, aunque también es probable que finalmente entren en un estado de tolerancia a las endotoxinas (Parker LC, et al., J Leukocyte Biology 2005; 78:1301-1305).

Además, en la presente memoria se ha demostrado que la Firma de tolerancia a endotoxinas y su subconjunto presentaban una asociación más estrecha con los cultivos positivos en el grupo de sepsis, y una tendencia más alta similar en aquellos que presentaban cultivos negativos (fig. 5C). Por el contrario, la Firma inflamatoria predominaba entre los pacientes "No sepsis", con una presencia más fuerte entre aquellos con cultivos positivos (fig. 5D). Resulta interesante observar las diferentes tendencias en cada grupo de pacientes, que concuerdan con los puntos anteriormente comentados: Una Firma inflamatoria inicial que se incrementa en la dirección de cultivos negativos a positivos en el grupo "No sepsis", lo que indica la etapa de incremento temprano de la inflamación durante una infección posiblemente localizada o un proceso inflamatorio estéril inicial. Después, en pacientes que rápidamente pasan a encontrarse extremadamente enfermos, como es el caso de aquellos pacientes en el grupo "Sepsis", se produce una rápida transición hacia un estado sistémico tolerante inducido por la infección, que conduce a una presencia más fuerte y creciente de un estado de tolerancia a las endotoxinas, tal como se observa en los resultados descritos, lo que indica una tendencia de cultivo negativo a cultivo positivo.

La caracterización de las contribuciones de los programas inflamatorio e inmunosupresor durante la enfermedad clínica resulta crucial al considerar las terapias dirigidas al huésped para el tratamiento. Los resultados descritos en la presente memoria demuestran que predomina un estado de tolerancia a endotoxinas durante la totalidad de los estadios más tempranos de la sepsis clínica y que probablemente está controlando la disfunción inmunitaria en la sepsis. De esta manera, en el caso de que haya una etapa inmunitaria caracterizada únicamente por inflamación excesiva, probablemente ocurre preclínicamente. Sin embargo, dado el significativo enriquecimiento de la Firma inflamatoria en muchos grupos de pacientes de sepsis, es probable que sea la combinación de tolerancia a endotoxinas e inflamación la que contribuya al patrón único de la patogénesis de la sepsis. Estos resultados exigen apartarse de un modelo de dos estadios y evolucionar hacia una etiología inmunitaria clínicamente relevante que se caracteriza por una disfunción inmunitaria controlada por la tolerancia a endotoxinas en los estadios más tempranos de la enfermedad clínica. La detección de una Firma de tolerancia a endotoxinas predominante apoya la sospecha de sepsis y, por lo tanto, dirigirá al equipo tratante a considerar las terapias complementarias y de inmunomodulación adecuadas para devolver el equilibrio a la respuesta inmunitaria.

En conclusión, dichos estudios han proporcionado la primera descripción de un perfil único de tolerancia a endotoxinas, presente en un estadio muy temprano del curso de la sepsis, ligado a la patogénesis de la misma, y asociado fuertemente al riesgo de disfunción orgánica.

EJEMPLO 2: nuevas terapias basadas en la Firma de tolerancia a endotoxinas

El análisis de redes de los genes de tolerancia a endotoxinas reveló que la mayoría de genes formaba una subred muy estrecha, lo que sugiere fuertemente que la firma es una manifestación de mecanismos críticos probablemente relacionados con la disfunción inmunitaria en los pacientes de sepsis (fig. 8).

Una consecuencia de conocer si un paciente va a sufrir pronto de sepsis es que puede aplicarse una terapia antibiótica apropiada que comprende un cóctel de los fármacos más potentes. Las directrices clínicas actuales indican que mientras que se espera a los resultados de los cultivos, debería iniciarse el tratamiento del paciente con ceftriaxona y azitromicina intravenosas. El objetivo de dicho régimen es intentar evitar los problemas más importantes de resistencias, ya que se cree que solo una parte de los pacientes que presenta el potencial de adquirir sepsis finalmente la desarrolla (ver, p. ej., la Tabla 3). El conocimiento muy temprano en el curso de la enfermedad de que un paciente presenta sepsis permitiría al médico prescribir las terapias más agresivas para intentar reducir la influencia de la infección.

Una segunda estrategia terapéutica sería intentar romper la tolerancia, revirtiendo el estado inmunosupresor de los macrófagos. Hasta hoy prácticamente todas las terapias que se han probado para tratar la sepsis se han intentado en un esfuerzo por conseguir lo contrario, es decir, suprimir un estado hiperinflamatorio, y ello tiene el potencial de empeorar la capacidad del paciente de defenderse frente a la sepsis. De acuerdo con ello, en más de 31 ensayos clínicos de supresión del estado hiperinflamatorio, este enfoque ha fracasado.

Entre los ejemplos de métodos para romper la tolerancia a endotoxinas se incluyen las células inmunitarias [Heusinkveld M, et al. Journal of Immunology 2011; 187:1157-1165], el interferón gamma, ODN CpG con o sin IL-10, anti-CD40, inhibidores de STAT3, inhibidores de STAT6, inhibidores de p50, inhibidores de NFκB, inhibidores de IKKβ, imidazoquinolinas y ácido zoledrónico [Sica A, Mantovani. Journal of Clinical Investigation 2012; 122:787-795]. Entre otros agentes potenciales se incluyen aquellos agentes químicos, células o productos naturales que suprimen la expresión de uno o más genes de la Firma de tolerancia a endotoxinas en macrófagos polarizados en M2, o la reversión de las propiedades de los macrófagos M2 *in vitro* e *in vivo* en las de un macrófago M1 [Sica y Mantovani, 2012].

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar (i) sepsis grave, o (ii) riesgo de desarrollar sepsis grave, o (iii) riesgo de insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave, en un sujeto, en el que el método comprende determinar en una muestra biológica obtenida del sujeto, un nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de por lo menos seis genes de Firma de tolerancia a endotoxinas (FTE) para proporcionar una firma génica de la muestra, y comparar la firma génica de la muestra con una firma génica de referencia, en la que la firma génica de referencia representa un nivel de expresión estándar de cada uno de la pluralidad de genes, en la que una diferencia entre la firma génica de la muestra y la firma génica de referencia indica que el sujeto presenta sepsis grave o está en riesgo de desarrollar sepsis grave o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave, en la que la pluralidad de genes se selecciona de entre ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende determinar en la muestra biológica el nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de por lo menos siete genes FTE a fin de proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos ocho genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos nueve genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos diez genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos once genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos doce genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos trece genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos catorce genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos quince genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos veinte genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos veinticinco genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, o por lo menos treinta y un genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra.
3. Método según la reivindicación 1, que comprende determinar en la muestra biológica el nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de por lo menos seis genes FTE a fin de proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos siete genes FTE a fin de proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos ocho genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos nueve genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos diez genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos once genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos doce genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos trece genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos catorce genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos quince genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos veinte genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, por lo menos veinticinco genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra, o por lo menos treinta y un genes FTE para proporcionar la firma génica de la muestra.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la diferencia entre la firma génica de la muestra y la firma génica de referencia se define como una diferencia de expresión de cada uno de por lo menos seis de la pluralidad de genes, por lo menos siete de la pluralidad de genes, por lo menos ocho de la pluralidad de genes, por lo menos nueve de la pluralidad de genes, por lo menos diez de la pluralidad de genes, por lo menos once de la pluralidad de genes, por lo menos doce de la pluralidad de genes, por lo menos trece de la pluralidad de genes, por lo menos catorce de la pluralidad de genes, por lo menos quince de la pluralidad de genes, por lo menos veinte de la pluralidad de genes, por lo menos veinticinco de la pluralidad de genes, por lo menos treinta de la pluralidad de genes, o por lo menos treinta y un genes de la pluralidad de genes.
5. Método según la reivindicación 4, en el que la diferencia de expresión es la regulación positiva en el caso de que el gen sea ADAMDEC1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PPBP, PROCR, PTGES, PTGR1, RAB13, RETN, RHBDD2, S100A12, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TMEM158, TREM1, UPP1 o VCAN, y la regulación negativa en el caso de que el gen sea ADAM15, ALCAM, ALDH1A1, CAMP, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, DHRS9, GPNMB, HTRA1, IL18BP, LIPA, LY86, NQO1, PLD3, PSTPIP2, RARRES1, RNASE1, S100A4, TLR7 o TSPAN4.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que determinar el nivel de expresión comprende detectar los ácidos nucleicos codificados por cada uno de la pluralidad de genes.
- 5 7. Método según la reivindicación 6, en el que determinar el nivel de expresión comprende uno o más de entre un método de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un método de amplificación no basado en PCR, PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), amplificación mediante replicasa Q-beta, reacción en cadena de la ligasa, amplificación de la señal (Ampliprobe), ciclado óptico, expresión diferencial, análisis Northern, hibridación, análisis de micromatrices, secuenciación de ADN, Ref-Seq, análisis MassArray y espectrometría de masas MALDI-TOF.
- 10 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la muestra biológica comprende sangre, plasma, suero, tejido, líquido amniótico, saliva, orina, heces, líquido de lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo o células cutáneas.
- 15 9. Antibiótico para la utilización en el tratamiento de un sujeto que se ha diagnosticado que presenta sepsis grave o que está en riesgo de desarrollar sepsis grave, mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 20 10. Antibiótico para la utilización en la reducción del riesgo de insuficiencia orgánica en un sujeto que se ha diagnosticado que presenta sepsis grave o que está en riesgo de desarrollar sepsis grave, mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 25 11. Antibiótico para la utilización según la reivindicación 9 o 10, en el que el antibiótico es un glucopéptido, una cefalosporina, un beta-lactamo, un inhibidor de beta-lactamasa, un carbapenem, una quinolona, una fluoroquinolona, un aminoglucósido, un macrólido, un monobactamo o una combinación de los mismos.
- 30 12. Agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas para la utilización en el tratamiento de un sujeto que se ha diagnosticado que presenta sepsis grave o que está en riesgo de desarrollar sepsis grave mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el agente comprende células inmunitarias, o el agente es interferón gamma, un oligonucleótido (ODN) CpG, una combinación de un ODN CpG con IL-10, un anticuerpo anti-CD40, un inhibidor de STAT3, un inhibidor de STAT6, un inhibidor de p50, un inhibidor de NFκB, un inhibidor de IKKβ, una imidazoquinolona o ácido zoledrónico.
- 35 13. Agente que contrarresta la tolerancia a endotoxinas para la utilización en la reducción del riesgo de insuficiencia orgánica en un sujeto que se ha diagnosticado que presenta sepsis grave o que está en riesgo de desarrollar sepsis grave mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el agente comprende células inmunitarias, o el agente es interferón gamma, un oligonucleótido (ODN) CpG, una combinación de un ODN CpG con IL-10, un anticuerpo anti-CD40, un inhibidor de STAT3, un inhibidor de STAT6, un inhibidor de p50, un inhibidor de NFκB, un inhibidor de IKKβ, una imidazoquinolona o ácido zoledrónico.
- 40 14. Método para identificar un agente candidato para el tratamiento de (i) sepsis grave o (ii) insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave, en el que el método comprende:
 - 45 a) poner en contacto una célula tolerante a endotoxinas con un agente de ensayo,
 - b) determinar el nivel de expresión de cada uno de una pluralidad de por lo menos seis genes de Firma de tolerancia a endotoxinas en la célula tolerante a endotoxinas para proporcionar una firma de expresión, en la que la pluralidad de genes se selecciona de entre ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN,
 - 50 c) comparar la firma de expresión con una firma de expresión de referencia, en la que la firma de referencia representa los niveles de expresión de la pluralidad de genes en una célula normal, y
 - 60 d) seleccionar el agente de ensayo como agente candidato para el tratamiento de sepsis grave o insuficiencia orgánica inducida por sepsis grave en el caso de que la firma de expresión se corresponda con la firma de referencia.
- 65 15. Kit para determinar el nivel de expresión de una pluralidad de genes seleccionados de entre ADAM15, ADAMDEC1, ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4,

- 5 DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN en una muestra, en el que el kit consiste esencialmente en sondas específicas génicas para 6 a 99 genes, en el que cada una de las sondas específicas génicas es capaz de detectar un producto de expresión de un gen respectivo de la pluralidad de genes o complemento del mismo.
- 10 16. Kit según la reivindicación 15, en el que cada producto de expresión es un ácido nucleico y cada sonda específica génica comprende un polinucleótido capaz de unirse específicamente a por lo menos uno de dichos productos de expresión de ácido nucleico o el complemento del mismo.
- 15 17. Micromatriz para detectar la expresión de una pluralidad de genes de Firma de tolerancia a endotoxinas en una muestra, en el que la micromatriz consiste esencialmente en una pluralidad de 6 a 99 sondas polinucleótidas unidas a un soporte sólido, en el que cada una de las sondas polinucleótidas es capaz de hibridarse específicamente con un producto de expresión de un gen respectivo de la pluralidad de genes o complemento del mismo, en el que la pluralidad de genes se selecciona de entre ADAM15, ADAMDEC1, 20 ALCAM, ALDH1A1, ANKRD1, C19orf59, CA12, CAMP, CCL1, CCL19, CCL22, CCL24, CCL7, CD14, CD300LF, CD93, CDK5RAP2, CPVL, CST3, CST6, CTSK, CXCL10, CYP1B1, CYP27B1, DDIT4, DHRS9, DPYSL3, EGR2, EMR1, EMR3, FBP1, FCER1G, FCER2, FPR1, FPR2, GK, GPNMB, GPR137B, HBEGF, HIST1H1C, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HK2, HK3, HPSE, HSD11B1, HTRA1, IL18BP, IL3RA, ITGB8, KIAA1199, LILRA3, LILRA5, LIPA, LY86, MARCO, MGST1, MMP7, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X, 25 MXD1, MYADM, NEFH, NQO1, NRIP3, OLIG2, PANX2, PAPLN, PDLIM7, PLAUR, PLD3, PPBP, PROCR, PSTPIP2, PTGES, PTGR1, RAB13, RARRES1, RETN, RHBDD2, RNASE1, S100A12, S100A4, S100A8, S100A9, SERPINA1, SERPINB7, SLC16A10, SLC7A11, TGM2, TLR7, TMEM158, TREM1, TSPAN4, UPP1 y VCAN.

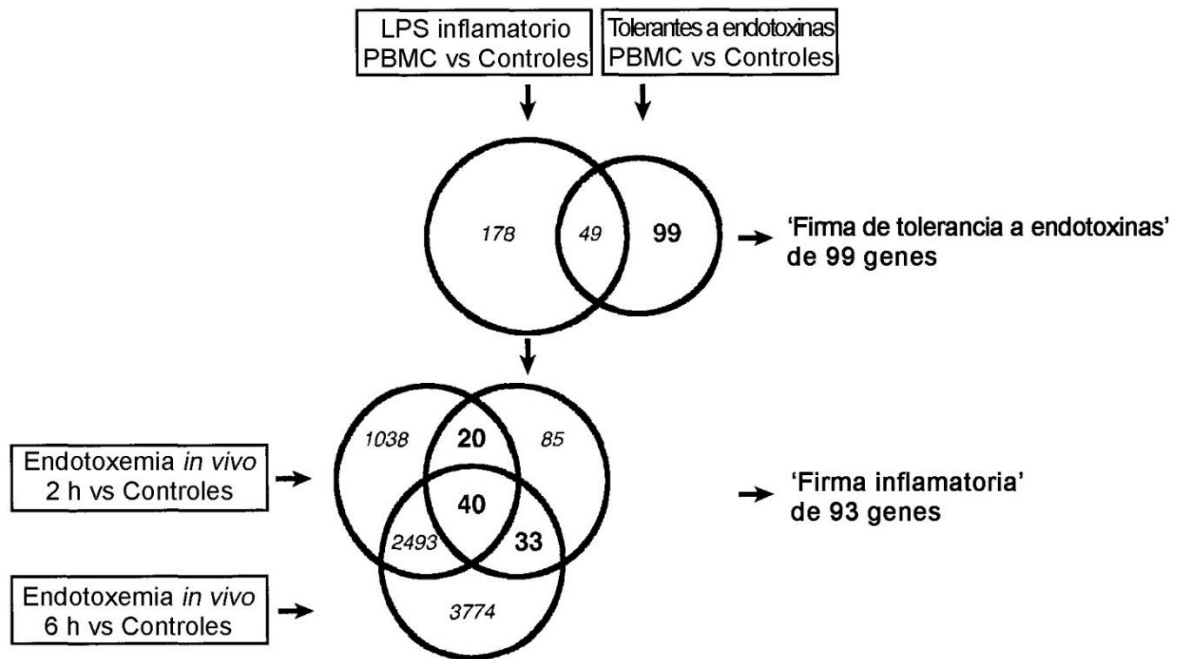


FIG. 1

Reanálisis de conjuntos de datos de sepsis publicados

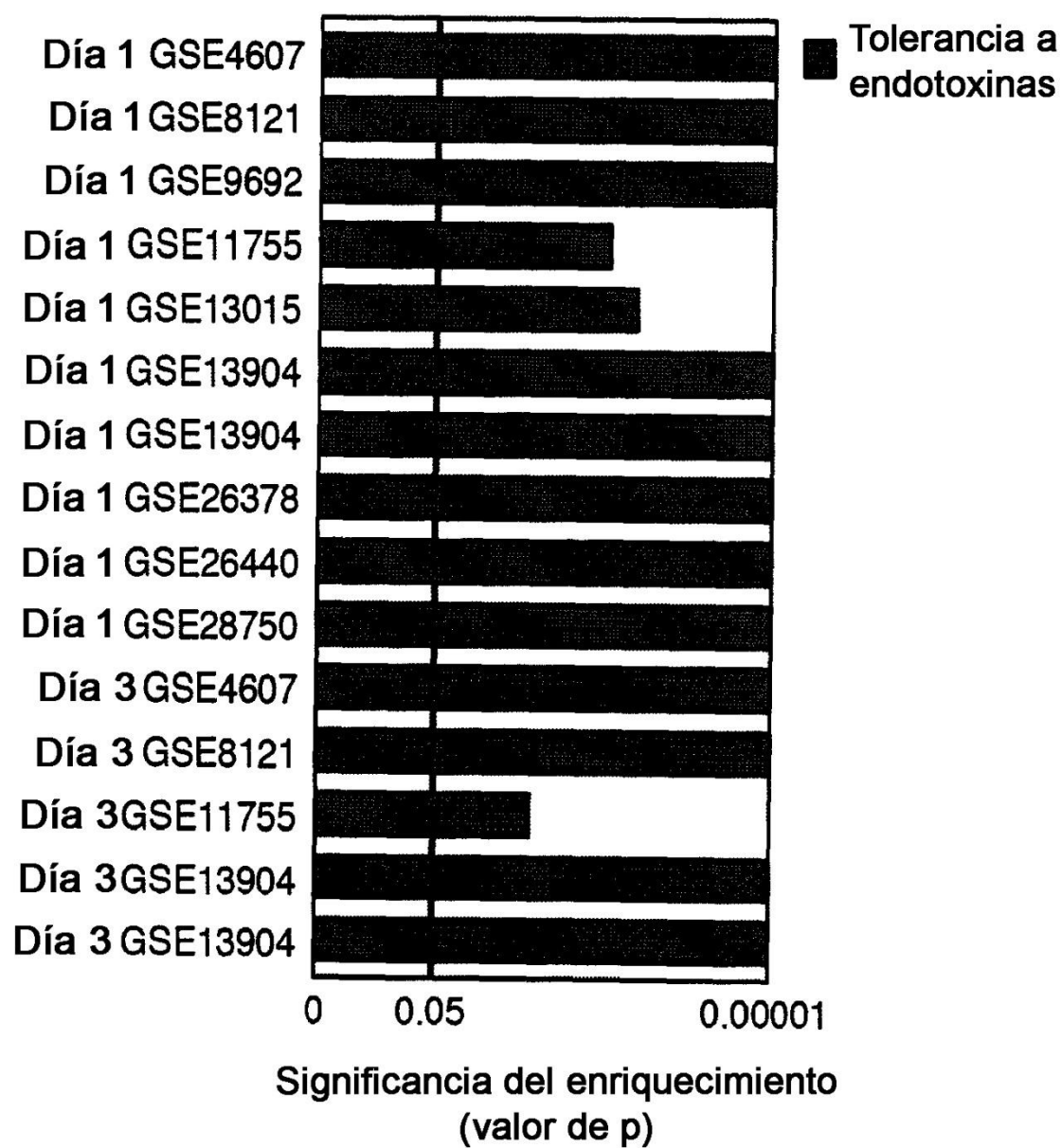


FIG. 2

Reanálisis de conjuntos de datos de sepsis publicados

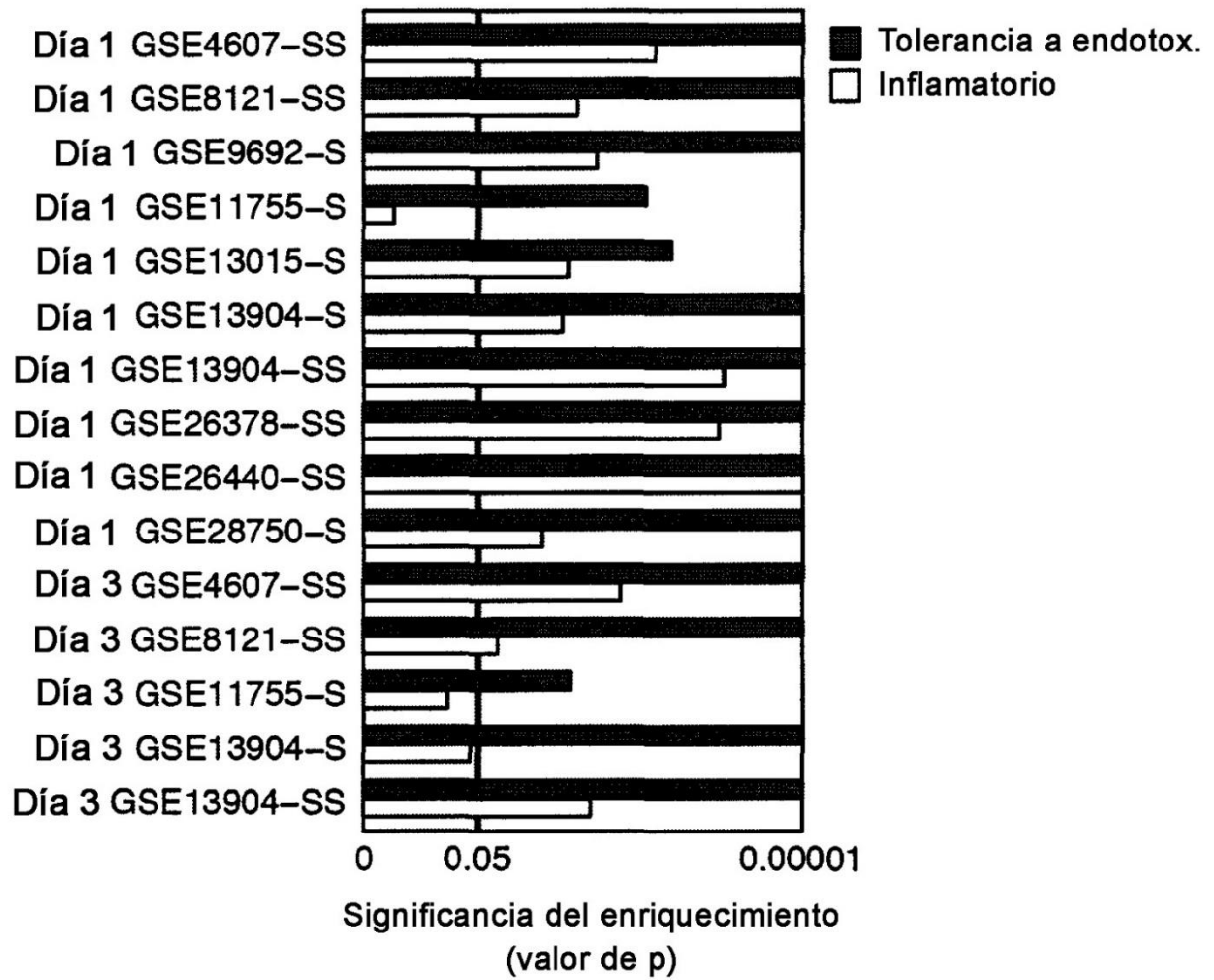


FIG. 3

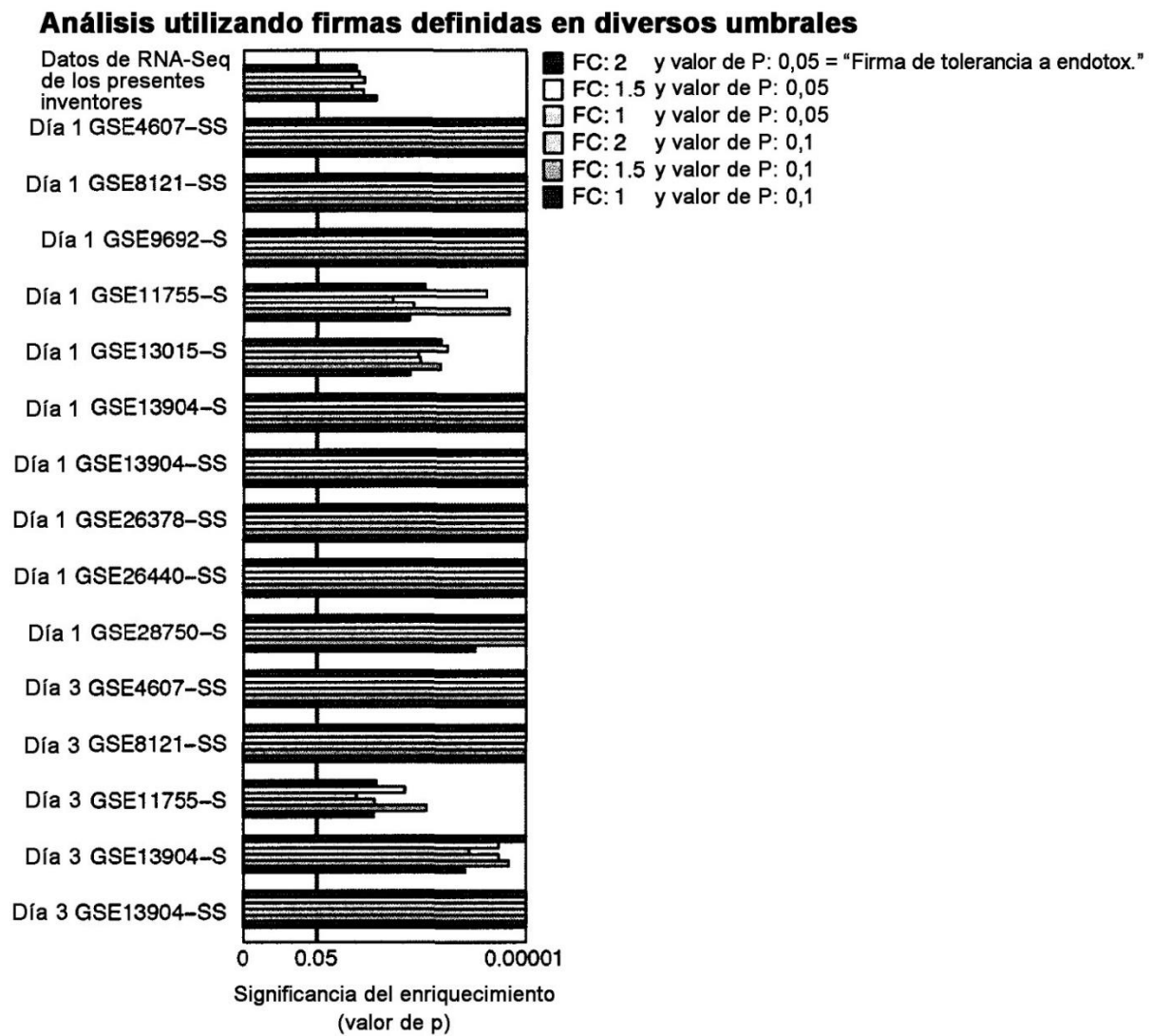


FIG. 4

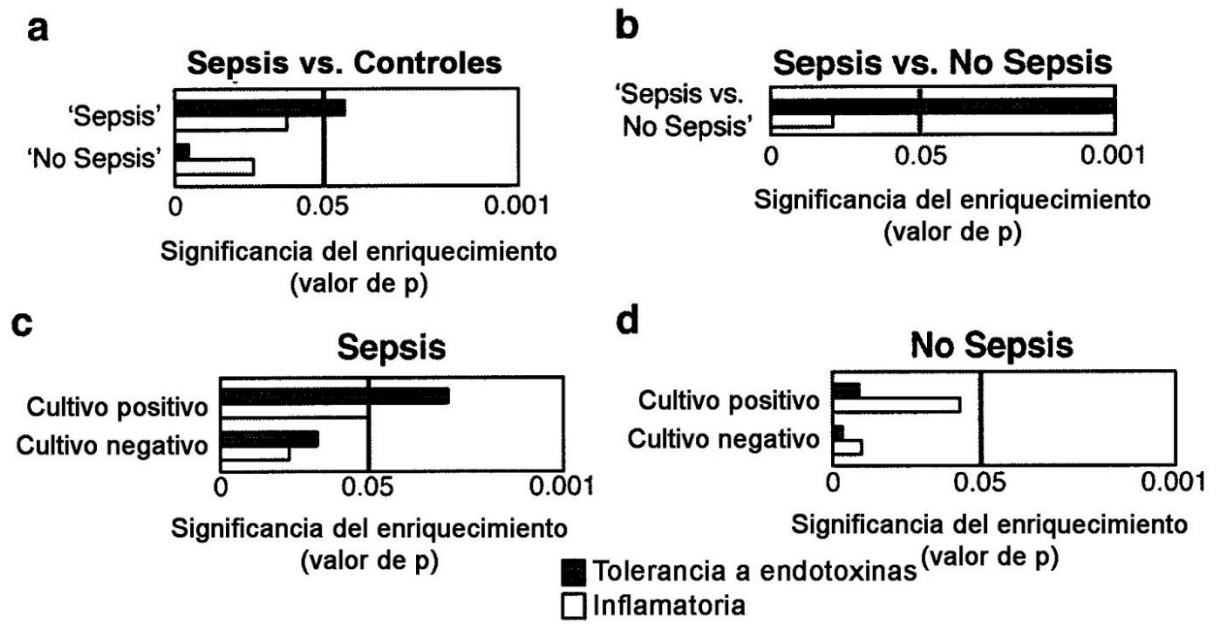


FIG. 5

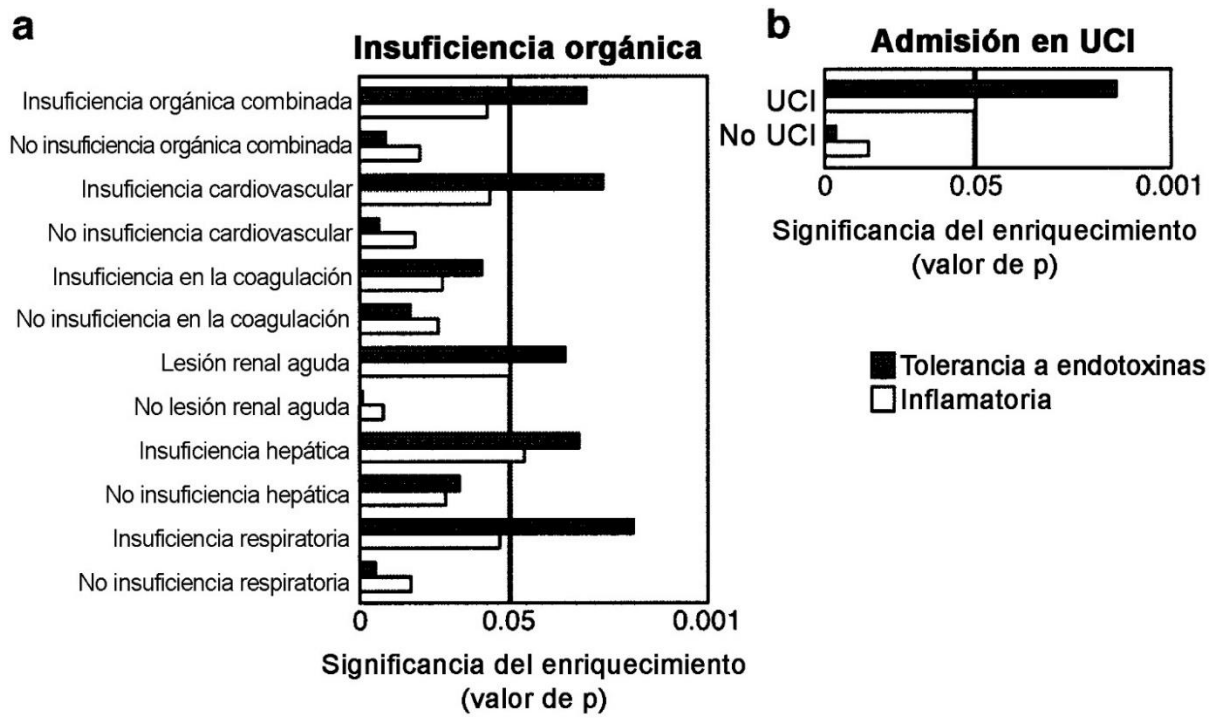


FIG. 6

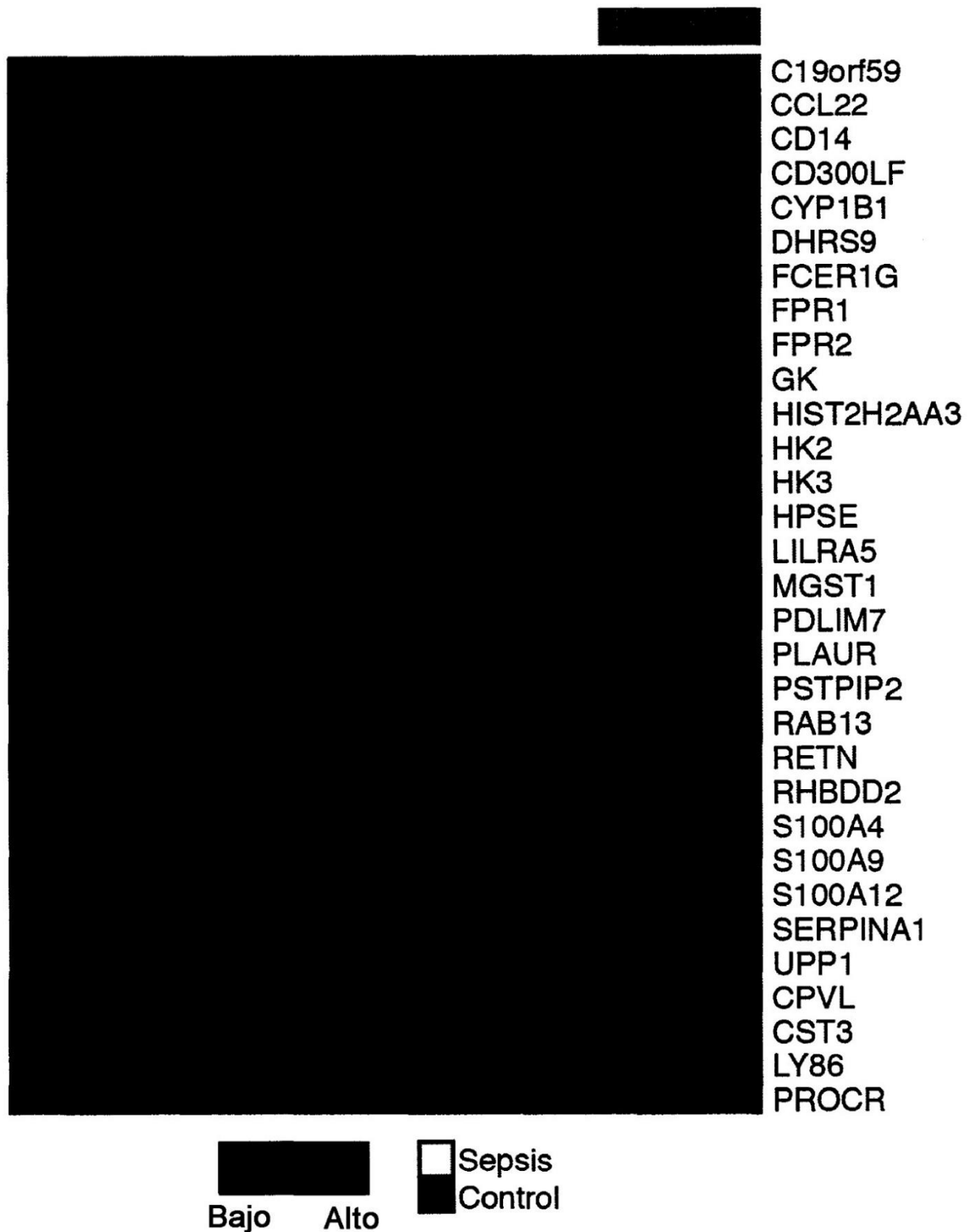


FIG. 7

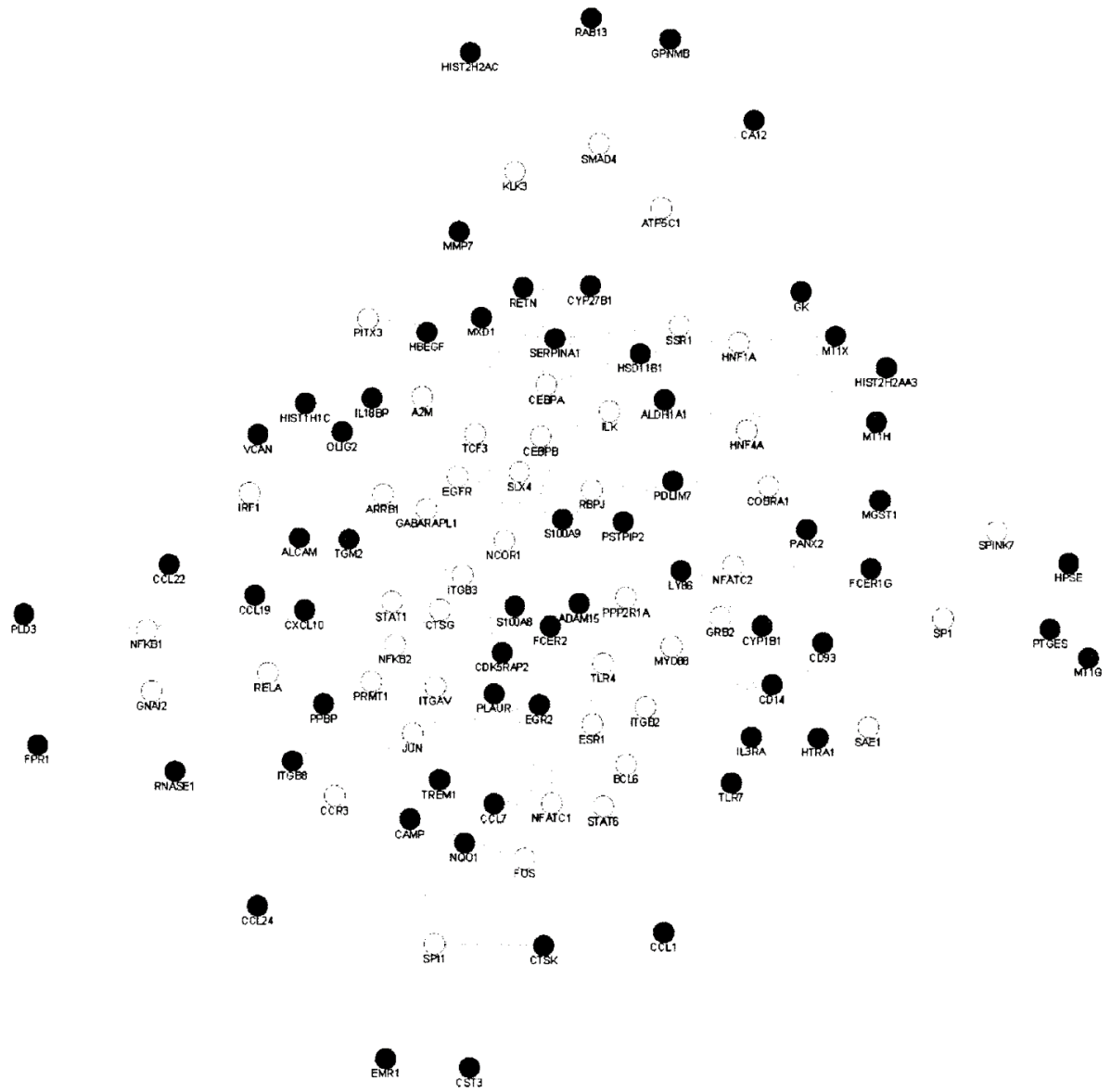


FIG. 8