(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 816 703**

(51) Int. CI.:

G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2014 PCT/GB2014/051583**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14188206**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2014 E 14728607 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3004885**

(54) Título: **Evaluación asistida del pronóstico en la enfermedad inflamatoria**

(30) Prioridad:

24.05.2013 GB 201309358

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2021

(73) Titular/es:

KINGS COLLEGE LONDON (100.0%)
Strand
London, Greater London WC2R 2LS, GB

(72) Inventor/es:

MAYR, MANUEL y
CUELLO, FRIEDERIKE

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

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

Evaluación asistida del pronóstico en la enfermedad inflamatoria

Campo de la invención

La invención se refiere a la evaluación de sujetos que padecen enfermedades inflamatorias, por ejemplo, estrés oxidativo en una enfermedad inflamatoria. En particular, la invención se refiere a la evaluación asistida del pronóstico de tales sujetos y/o su respuesta al tratamiento.

Antecedentes de la invención

Muchos pacientes con una enfermedad aguda grave tienen una inflamación sistémica abrumadora que provoca lesiones extensas del tejido y el síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS). El MODS es común, asociado con alta mortalidad, morbilidad a corto plazo y enfermedad crónica significativa. Cuando se desarrolla, generalmente se requiere de soporte artificial de órganos en una unidad de cuidados intensivos (ICU). A pesar del tratamiento inmediato con antibióticos y cuidados de apoyo, todavía no se dispone de una terapia efectiva. La manifestación de la enfermedad implica una respuesta inflamatoria importante acompañada de hipotensión, hiporeactividad vascular y depresión cardíaca.[1] Este último es reversible y probablemente mediado por los efectos sinérgicos de las citocinas inflamatorias y el óxido nítrico. Por el contrario, otros órganos, tales como los pulmones, los riñones y el hígado pueden fallar rápidamente. Los MODS que ocurren en los pacientes de la ICU son mortales con frecuencia. Por lo tanto, la categorización temprana de pacientes con diferentes pronósticos es importante, pero resulta difícil en la técnica anterior. Otro problema en la técnica es la ausencia de un biomarcador oportuno y/o específico para el resultado de la enfermedad.

La sepsis severa [SS] es una enfermedad aguda común en las unidades de cuidados intensivos [ICU] con altas tasas de mortalidad y morbilidad crónica. Cuando se asocia con insuficiencia cardiovascular [denominado shock séptico], la tasa de mortalidad es muy alta [50-80 %]. Un problema en la técnica es la falta de disponibilidad de biomarcadores (tales como los biomarcadores específicos de órganos) que permiten el diagnóstico temprano del shock séptico inminente para clasificar con precisión a los pacientes para intervenciones personalizadas y focalizadas. Hay aproximadamente 30 000 casos anuales de SS en el Reino Unido y los números están aumentando. Una respuesta inflamatoria incontrolada a la infección provoca daño y, subsecuentemente, fallo de órganos tales como los pulmones, el corazón y los riñones. Los mecanismos que subyacen no están claros. La atención médica de los pacientes combina un tratamiento inmediato con antibióticos y cuidados de apoyo y, frecuentemente, se proporciona el soporte artificial de órganos en una ICU. Sin embargo, a pesar de más de 200 ensayos controlados aleatorizados de sepsis desde 1992, no existen terapias efectivas. En consecuencia, aproximadamente 200 000 pacientes de ICU en los Estados Unidos mueren cada año. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de biomarcadores específicos que permitan a los médicos, en tiempo real, estratificar el riesgo, iniciar terapias apropiadas y/o rastrear con precisión la respuesta al tratamiento.

Ningún biomarcador existente predice de manera confiable la mortalidad o la respuesta al tratamiento. Por lo tanto, los clínicos de cabecera no pueden predecir de manera confiable el riesgo de muerte ni monitorear la respuesta biológica al tratamiento. Si bien se han evaluado > 100 biomarcadores potenciales de sepsis diferentes, ninguno tiene la suficiente especificidad o sensibilidad para ser clínicamente útil. Ejemplos comunes incluyen la proteína C reactiva (CRP) y la procalcitonina (PCT). Ninguno de los dos predice la mortalidad de manera confiable. Ninguno de los dos está asociado con la respuesta al tratamiento.

Inforzato y otros (2010 The Journal of Biological Chemistry, Volumen 285, páginas 17 681 a 17 692) informan que la Pentraxina (PTX3) forma un octámero asimétrico. Se describen estudios biofísicos de la PTX3. Se estudian tanto las moléculas de PTX3 humanas recombinantes como las nativas. Se enseña que la proteína está compuesta de ocho subunidades idénticas de protómeros. Se describe la estructura del octámero ensamblado. El octámero ensamblado se considera una estructura asimétrica, que consiste de dos regiones de lóbulo de diferentes tamaños conectadas por una región de tallo. Los autores consideran que el dominio N-terminal del protómero proporciona el principal determinante estructural que subyace de esta organización cuaternaria. Se enseña que el octámero de la PTX3 contiene dos sitios de unión a FGF2, mientras que son los tetrámeros los que actúan como unidades funcionales en el reconocimiento de ligandos. Inforzato *y otros* no divulgan ninguna conexión entre las diferentes PTX3s oligoméricas y cualquier afección médica. Inforzato *y otros* se limita a la caracterización estructural/biofísica de la PTX3.

Inforzato y otros (2008 The Journal of Biological Chemistry, Volumen 283, páginas 10 147 a 10 161) informan el estudio de la caracterización estructural de la PTX3 y su papel en la organización de la matriz de cúmulos. Los autores usaron el análisis PAGE tanto nativo como desnaturalizante y concluyeron que la PTX3 está compuesta principalmente de octámeros unidos covalentemente. Los autores también estudiaron la PTX3 mediante el uso de espectrometría de masas, así como también mutagénesis dirigida al sitio de cisteína/serina. Como resultado de sus estudios, los autores informan que los residuos de cisteína en las posiciones 47, 49 y 103 en el dominio N-terminal de la PTX3 son importantes para estabilizar la forma tetramérica de la PTX3. Además ellos informan que las cisteínas en las posiciones 317 y 318 están implicadas en la unión de los tetrámeros de la PTX3 para formar octámeros de la PTX3. Los autores

continúan para producir un modelo refinado de estructura de la PTX3, teniendo en cuenta los enlaces disulfuro intracatenarios. Los autores estudian la PTX3 mutada en un sistema que rescata la organización defectuosa de la matriz de cúmulos, que está conectada a la ovulación. Los autores encontraron que los tetrámeros de PTX3 mostraban actividad de rescate de tipo salvaje, mientras que la PTX3 mutante en forma de dímeros tenía una funcionalidad deteriorada. Los autores concluyeron que los tetrámeros de PTX3 eran las unidades moleculares funcionales requeridas para la organización y estabilización de la matriz de cúmulos. No hay ninguna enseñanza en este documento sobre la importancia de los octámeros de la PTX3.

Rady (2007 Journal of Intensive Care Medicine, Volumen 22, páginas 386 a 388) presenta un artículo editorial que revisa el campo de la sepsis y la disfunción múltiple de órganos. En particular, el autor analiza la relación causa-efecto de los biomarcadores en la sepsis. Con más detalle, el autor presenta un análisis detallado del campo y el estudio del péptido natriurético tipo B (BNP), y su uso en la sepsis y como un predictor del resultado clínico. El BNP es un marcador dominante en el campo de la sepsis. Este documento no trata sobre la PTX3. El autor concluye que la relación causa-efecto de los biomarcadores en la sepsis y el resultado clínico sigue siendo difícil de alcanzar.

La investigación adicional sobre el BNP y su correlación con el resultado de la enfermedad se presenta por Rivers y otros (2007 Journal of Intensive Care Medicine Volumen 22, páginas 363 a 373). Los autores presentan un estudio detallado del valor del BNP, que incluye su utilidad diagnóstica, terapéutica y de pronóstico en pacientes críticos. Los autores presentan estudios de curso de tiempo que rastrean los niveles de BNP en pacientes con sepsis grave y shock séptico. Los autores extraen conclusiones sólidas sobre el valor de BNP como marcador en este contexto. Se informan asociaciones estadísticamente significativas para los niveles de BNP y la disfunción orgánica, la disfunción miocárdica, la hipoxia global de los tejidos y la mortalidad. Por lo tanto, los autores enseñan al BNP como un marcador útil y confiable en la detección temprana, estratificación, tratamiento y pronóstico de pacientes con alto riesgo. Este estudio no discute la PTX3.

Pierrakos y Vincent (2010 Critical Care Volumen 14, páginas 1 a 18) presentan una revisión bibliográfica de biomarcadores en la sepsis. Los autores buscaron en bases de datos de literatura científica mediante el uso de varias palabras clave. Su búsqueda cubrió 3370 referencias que involucran 178 biomarcadores diferentes. Los autores discuten el hecho de que muchos biomarcadores se han evaluado para su uso en la sepsis. También ellos comentan que la mayoría de los biomarcadores se han probado clínicamente, pero relativamente pocos se han usado para el diagnóstico. La PTX3 (Pentraxina 3) se menciona en la tabla 10, línea 26 de este documento como distinguido entre el shock séptico y el SIRS. Ninguno de los biomarcadores revisados tenía suficiente especificidad o sensibilidad para ser empleado en la práctica clínica. No hay descripción en Pierrakos y Vincent de ninguno de los estados multiméricos de la PTX3.

El documento US 2010/0292131 describe kits y métodos para el diagnóstico, pronóstico y predicción de la sepsis en un sujeto, o para la diferenciación entre la sepsis y el SIRS en un sujeto. La descripción se centra en medir los niveles de pro-hepcidina (pro-HEPC) y/o una medición de ciertas proteínas histonas. La pentraxina 3 se menciona en este documento como uno de un panel de biomarcadores adicionales, que pueden analizarse simultáneamente con los principales marcadores que se estudian. Este documento no parece describir información sobre los estados multiméricos de la PTX3.

El documento EP 2 092 342 B1 describe un método para medir los niveles de pentraxina (PTX3) en el plasma. En particular, este documento describe un método para medir los niveles de PTX3 en muestras de plasma, que comprende tratar la muestra con un agente aglutinante antes de determinar los niveles de PTX3. No hay descripción o discusión en este documento de los multímeros de la PTX3.

Muller y otros (2001 Critical Care Medicine Volumen 29, páginas 1404 a 1407) describe cómo los niveles circulantes de la pentraxina PTX3 larga se correlacionan con la gravedad de la infección en pacientes críticos. Los autores comparan la PTX3 con el marcador más establecido de proteína C reactiva (CRP) en pacientes críticos. Los autores concluyen que la PTX3 está elevada en pacientes críticos y se correlaciona con la gravedad de la enfermedad y la infección. Los autores no tratan las formas multiméricas de la PTX3 en esta descripción.

Mauri y otros (2010 Intensive Care Medicine Volumen 36, páginas 621 a 629) describen altos niveles persistentes de PTX3 en plasma durante los primeros días después del comienzo de la sepsis grave y el shock séptico que están asociados con la mortalidad. Noventa pacientes fueron estudiados. Los pacientes fueron incluidos en el estudio al ingreso en los cuidados intensivos. Los niveles de PTX3 se midieron a varios intervalos. La mortalidad se registró a los noventa días. Los autores concluyeron que los altos niveles persistentes de PTX3 circulante durante los primeros días desde el comienzo de la sepsis pueden estar asociados con la mortalidad. También concluyeron que la PTX3 se correlaciona con la gravedad de la sepsis y con la disfunción de la coagulación/fibrinólisis asociada a sepsis. Los autores no consideraron ni evaluaron la multimerización de la PTX3.

Vänskä y otros (2011 Haematologica Volumen 96, páginas 1385 a 1389) describen que el alto nivel de Pentraxina 3 predice el shock séptico y la bacteriemia al comienzo de la neutropenia febril después de la quimioterapia intensiva de pacientes hematológicos. Los autores midieron en su estudio la PTX3 y la CRP. Los autores concluyeron que la PTX3 es un predictor temprano de las complicaciones en pacientes hematológicos con fiebre neutropénica. También

concluyeron que el alto PTX3 predice el shock séptico y la bacteriemia ya en el comienzo de la neutropenia febril. Los autores no examinaron el estado multimérico de la PTX3, sino que solo evaluaron los niveles totales de la PTX3.

Daigo y otros (2012 Molecular and Cellular Proteomics Volumen 11, páginas 1 a 12) describen que el perfil proteómico del complejo de pentraxina 3 circulante en la sepsis demuestra la interacción con la azurocidina 1 y otros componentes de la trampa extracelular de neutrófilos. Los autores usaron la proteómica de escopeta de los complejos de PTX3 circulantes para estudiar los ligandos de PTX3. Los autores identificaron 104 proteínas candidatas, que incluyen varias proteínas conocidas que interactúan con PTX3. Los autores mostraron una interacción directa con PTX3 de proteínas bactericidas como la azurocidina 1 y la mieloperoxidasa. La discusión sobre la oligomerización de PTX3 parece limitarse a probar si la unión a AZU1 requirió o no el oligómero de dominio N-terminal conocido de PTX3, como es el caso de la interacción FGF2 - PTX3. Los autores concluyen que la unión de AZU1-PTX3 es por un mecanismo similar a la unión de PTX3-FGF2. No hay estudio de los propios oligómeros de PTX3 en esta publicación.

Uusitalo-Seppälä y otros (2013 Plos One Volumen 8, páginas E53661) describen que la pentraxina 3 se asocia con la sepsis grave y la enfermedad mortal en pacientes de la sala de emergencias con sospecha de infección. Los autores midieron los niveles de PTX3 en plasma mediante el uso de una prueba ELISA de fase sólida disponible comercialmente al ingresar a las salas de emergencia. Los autores compararon los niveles de PTX3 con los niveles de CRP y los niveles de PCT. Los autores encontraron que una alta concentración de PTX3 predijo la enfermedad grave y un mal resultado. No hay discusión ni estudio sobre la oligomerización de la PTX3 en este informe.

D1 - SCHNABEL R Y OTROS (2008 AMERICAN HEART JOURNAL, MOSBY- YEAR BOOK INC, ESTADOS UNIDOS, Vol. 156, núm. 6, ISSN 0002-8703, (20081201), páginas 1201.e1 - 1201.e11), describen que la suplementación con selenio mejora la capacidad antioxidante in vitro e in vivo en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria.

D2 - ANGSTWURM MATTHIAS WA MD Y OTROS (CRITICAL CARE MEDICINE, 1999, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, ESTADOS UNIDOS, Vol. 27, núm. 9, ISSN 0090-3493, páginas 1807 - 1813) describen que el reemplazo de selenio en pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica grave mejora el resultado clínico.

D3 - MULLER B Y OTROS (CRITICAL CARE MEDICINE, 2001, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, ESTADOS UNIDOS, Vol. 29, núm. 7, ISSN 0090-3493, páginas 1404 - 1407) describen los niveles circulantes de la pentraxina larga PTX3 tienen correlación con la gravedad de la infección en pacientes críticos.

D4 - UUSITALO-SEPPALA Y OTROS (PLOS ONE, 2013, vol. 8, página E53661) describen que la pentraxina 3 (PTX3) se asocia con la sepsis grave y la enfermedad mortal en pacientes de la sala de emergencias con sospecha de infección, y describen un estudio de cohorte prospectivo.

D5 - INFORZATO Y OTROS (JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2010, vol. 285, núm. 23 ISSN 0021-9258, páginas 17 681 - 17 692) describen que el inhibidor angiogénico de la pentraxina larga PTX3 forma un octámero asimétrico con dos sitios de unión para FGF2.

D6 - JYOTI BALHARA Y OTROS (FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, 2013, vol. 4, doi: 10.3389/fimmu.2013.00127) describen que la pentraxina 3 puede ser un inmunorregulador en los pulmones y evaluaron su papel en la inmunidad pulmonar, ya que los pulmones tienen un riesgo constante de infecciones y daño en los tejidos que se atribuyen a la exposición perpetua a agentes extraños.

D7 - El documento WO2008078344 (HUMANITAS MIRASOLE SPA [IT] y otros, describen un método para medir los niveles de pentraxina larga PTX3 en plasma.

La presente invención tiene por objeto superar los problemas asociados con la técnica anterior.

Resumen de la invención

Es conocido en la técnica evaluar los niveles de PTX3. Se sabe en la técnica que la PTX3 está asociada con la sepsis grave. En la técnica se sabe que la PTX3 está asociada con la enfermedad mortal, por ejemplo, en los ingresos de pacientes en la ICU. Sin embargo, en la técnica siempre se han evaluado solo los niveles totales de PTX3. La PTX3 se trata en la técnica como una sustancia única. La medición de PTX3 en la técnica consiste en determinar los niveles totales de PTX3 presentes en un sujeto o muestra.

Por el contrario, los presentes inventores han estudiado formas multiméricas de PTX3. La PTX3 puede existir como un monómero, un tetrámero u un octámero. Los presentes inventores han hecho descubrimientos sorprendentes, en particular en relación con el octámero. Más específicamente, los inventores han identificado una relación robusta y estadísticamente significativa entre el octámero PTX3 y el grado de estrés oxidativo en el sujeto. Más importante aún, los inventores han demostrado que evaluar los niveles octaméricos de la PTX3 contribuye con información valiosa para el pronóstico del sujeto. La invención se basa en estos notables hallazgos.

Así, en un aspecto, la invención proporciona un método de recopilación de información *in vitro* útil para predecir el resultado clínico en un sujeto, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, el método comprende proporcionar una muestra de dicho sujeto y determinar el nivel octamérico de la PTX3 en dicha muestra,

en donde determinar el nivel de la PTX3 octamérica comprende medir la cantidad total de PTX3 presente, y medir la cantidad de PTX3 octamérica presente, y calcular la proporción de PTX3 total que está presente como octámero,

en donde si la proporción de PTX3 octamérica es mayor al 50 %, el sujeto se identifica como un posible no sobreviviente.

Una proporción alta de PTX3 octamérica (por ejemplo > 50%) se asocia con una mayor posibilidad de un resultado adverso.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de recopilación de información *in vitro* útil para predecir el resultado clínico en un sujeto, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, el método que comprende proporcionar una muestra de dicho sujeto y determinar el nivel de PTX3 octamérica en dicha muestra, en donde un nivel elevado de PTX3 octamérica en comparación con un nivel de referencia indica una posibilidad reducida de supervivencia.

El nivel de referencia puede ser un valor determinado previamente para un sujeto sano, o puede ser un valor determinado para el mismo sujeto, por ejemplo, un nivel determinado en un punto de tiempo inicial para el mismo sujeto. Esto es discutido con más detalle más abajo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* como se describió anteriormente en donde se determina la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica. Las ventajas adicionales de usar la relación de PTX3 octamérico a PTX3 monomérico se describen más abajo, por ejemplo con referencia a los dibujos donde se pueden encontrar las curvas ROC.
Determinar adecuadamente el nivel de PTX3 octamérica comprende determinar la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica. En las modalidades donde se determina la relación, las referencias al nivel de PTX3 deben interpretarse en consecuencia, y pueden requerir la determinación del nivel monomérico de PTX3 así como también la PTX3 octamérica (en lugar de la determinación del nivel total de PTX3 así como también la PTX3 octamérica).

Así, en un aspecto, la invención proporciona un método de recopilación de información *in vitro* útil para predecir el resultado clínico en un sujeto, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, el método que comprende proporcionar una muestra de dicho sujeto y determinar la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica en dicha muestra,

en donde determinar la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica comprende medir la cantidad de PTX3 octamérica presente, y medir la cantidad de PTX3 monomérica presente, y calcular la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, si la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica es elevada, el sujeto se identifica como un posible no sobreviviente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* como se describió anteriormente en donde las cantidades de PTX3 monomérica y de PTX3 octamérica se determinan por las etapas de

a) separar las proteínas en la muestra en condiciones no reductoras;

b) determinar las cantidades de PTX3 monomérica y de PTX3 octamérica al cuantificar las cantidades de esas formas de PTX3 como se separan en la etapa (a).

Adecuadamente, la etapa (b) comprende transferir las proteínas separadas a una membrana y cuantificar las cantidades de esas formas de PTX3 en dicha membrana.

Adecuadamente, las cantidades de PTX3 monomérica y de PTX3 octamérica se determinan por espectrometría de masas.

Adecuadamente, el sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria.

Adecuadamente dicha enfermedad inflamatoria es la sepsis, la enfermedad cardiovascular o una enfermedad reumatoide.

Adecuadamente dicha enfermedad inflamatoria es la sepsis.

Adecuadamente, dicha sepsis es sepsis grave o shock séptico. Adecuadamente dicha sepsis es sepsis grave.

Adecuadamente, dicho sujeto está experimentando estrés oxidativo en dicha enfermedad inflamatoria.

Adecuadamente, la muestra comprende sangre o plasma, más adecuadamente plasma.

Adecuadamente, la medición se repite en un intervalo de tiempo predeterminado.

Adecuadamente dicho intervalo de tiempo es diario.

También se describe un método para identificar a un paciente en riesgo de insuficiencia aguda de órganos, que comprende realizar el método como se describió anteriormente en donde la detección de PTX3 octamérica elevada, o la relación elevada de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, indica una mayor posibilidad de insuficiencia aguda de órganos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta de un sujeto al tratamiento, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, que comprende realizar el método como se describe anteriormente al menos dos puntos temporales diferentes y comparar los niveles de PTX3 octamérica en esos al menos dos puntos temporales diferentes, en donde observar un nivel decreciente de PTX3 octamérica, o una relación decreciente de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, en los puntos de tiempo posteriores indica una respuesta positiva al tratamiento.

También se describe un método para identificar a un paciente en riesgo de insuficiencia aguda de órganos, que comprende realizar el método como se describió anteriormente en donde la detección de una relación elevada de PTX3 octamérica a monomérica indica una mayor posibilidad de insuficiencia aguda de órganos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta de un sujeto al tratamiento que comprende realizar el método como se describió anteriormente al menos dos puntos de tiempo diferentes y comparar los niveles de PTX3 octamérica, o las relaciones de PTX3 octamérica a monomérica, en esos al menos dos puntos de tiempo diferentes, en donde observar un nivel decreciente de PTX3 octamérica, o una relación decreciente de PTX3 octamérica a monomérica, en los puntos temporales posteriores indica una respuesta positiva al tratamiento.

También se describe un método para tratar a un paciente que padece la enfermedad inflamatoria que comprende realizar el método como se describió anteriormente en donde si se observa un nivel aumentado de PTX3 octamérica, o una relación aumentada de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, se administra un tratamiento o medicamento a dicho sujeto, dicho tratamiento o medicamento seleccionado adecuadamente de un antioxidante (por ejemplo, selenio, N-acetilcisteína), un fármaco para mejorar la función cardíaca (por ejemplo, Levosimendán, inhibidores de la PDE como la Milrinona (Yano y otros 2000, Am. J. Physiol. vol. 279, H1898-H1905)), y una estatina, preferentemente una estatina.

También se describe un método para recopilar información útil para ayudar al pronóstico de un sujeto que padece de estrés oxidativo que comprende realizar el método como se describió anteriormente, en donde un nivel elevado de PTX3 octamérica, o una relación elevada de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, indica un pronóstico negativo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de recopilación de información *in vitro* útil para predecir el resultado clínico en un sujeto, el método que comprende proporcionar una muestra de dicho sujeto y determinar el nivel de PTX3 monomérica en dicha muestra,

en donde determinar el nivel de PTX3 monomérica comprende medir la cantidad total de PTX3 presente, y medir la cantidad de PTX3 monomérica presente, y calcular la proporción de PTX3 total que está presente como monómero,

en donde si la proporción de PTX3 monomérica es mayor del 90 %, el sujeto se identifica como un probable sobreviviente.

Adecuadamente, si la proporción de PTX3 monomérica es inferior al 20 %, el sujeto se identifica como un probable no sobreviviente.

Adecuadamente, si la proporción de PTX3 monomérica es inferior al 20 %, el sujeto se identifica como no respondedor al tratamiento trascendental. Puede ser apropiado administrar un cambio o intensificación de la intervención terapéutica a un sujeto así identificado.

En una modalidad, determinar el nivel de PTX3 octamérica en dicha muestra comprende poner en contacto dicha muestra con un reactivo capaz de unirse a dicha PTX3 e inferir la cantidad de PTX3 a partir de la cantidad de reactivo unido. Esta etapa puede estar precedida por una etapa de separación que permita la determinación del estado de la PTX3 monomérico o multimérico así detectado. Un ejemplo de un reactivo capaz de unirse a dicha PTX3 es un anticuerpo anti-PTX3.

En una modalidad, determinar el nivel de PTX3 octamérica en dicha muestra comprende introducir dicha muestra en un aparato capaz de determinar las masas de las moléculas en dicha muestra e inferir la cantidad de PTX3 a partir de la salida de datos por dicho aparato. Un ejemplo de dicho aparato es un espectrómetro de masas.

Descripción detallada de la invención

Durante la última década, el campo de la proteómica ha hecho un progreso impresionante. El proteoma del plasma, sin embargo, es el proteoma más complejo del cuerpo humano[2], y hasta la fecha todavía es difícil detectar los componentes menores directamente en los fluidos corporales[3]. Como una estrategia alternativa, los inventores aplicaron la proteómica al tejido cardíaco enfermo[4], donde los biomarcadores potenciales son menos diluidos[5-7]. Para las investigaciones de proteómica descritas en la presente descripción, los inventores eligieron un modelo de ratón séptico para identificar candidatos a biomarcadores. La validación se realizó mediante el uso de muestras de plasma de pacientes con sepsis ingresados en las ICU. En la presente descripción se enseña por primera vez que evaluar el estado de oxidación de los biomarcadores inflamatorios, tales como la pentraxina-3 (PTX3), proporciona un predictor superior del resultado de la enfermedad en pacientes que padecen una enfermedad inflamatoria, particularmente una enfermedad inflamatoria que comprende estrés oxidativo, tal como pacientes sépticos.

Por PTX3 nos referimos a la pentraxina 3 de mamífero, adecuadamente al polipéptido de pentraxina 3 humano. La secuencia de referencia para esto es el número de acceso de Uniprot P26022.

Las secuencias depositadas en las bases de datos pueden cambiar con el tiempo. Adecuadamente, se usa la versión actual. Adecuadamente, la base de datos es la versión 2013_05 de UniProt (1 de mayo de 2013).

Adecuadamente, la secuencia es como se muestra más abajo:

sp|P26022|PTX_3_HUMAN proteína relacionada con Pentraxina PTX3 OS = Homo sapiens GN=PTX3 PE=1SV=3

MHLLAILFCALWSAVLAENSDDYDLMYVNLDNEIDNGLHPTEDPTPCACGQEHSEWDKLF
IMLENSQMRERMLLQATDDVLRGELQRLREELGRLAESLARPCAPGAPAEARLTSALDEL
LQATRDAGRRLARMEGAEAQRPEEAGRALAAVLEELRQTRADLHAVQGWAARSWLPAGC
E
TAILFPMRSKKIFGSVHPVRPMRLESFSACIWVKATDVLNKTILFSYGTKRNPYEIQLYL
SYQSIVFVVGGEENKLVAEAMVSLGRWTHLCGTWNSEEGLTSLWVNGELAATTVEMATGH
IVPEGGILQIGQEKNGCCVGGGFDETLAFSGRLTGFNIWDSVLSNEEIRETGGAESCHIR
GNIVGWGVTEIQPHGGAQYVS

Los inventores emprendieron una investigación proteómica sin sesgos. Realizaron esta investigación en un modelo de sepsis en ratón. Al analizar las muestras, notaron que sorprendentemente se encontró pentraxina-3 (PTX3) en la fracción insoluble de sus muestras. Esto fue muy sorprendente. La proteína no debería haberse detectado en la fracción insoluble, debido a las técnicas de preparación de muestras que se usaron. La expectativa era que la proteína se hubiera acumulado en el suero el plasma. Al estudiar esta sorprendente anomalía, los inventores descubrieron que era una forma octamérica de la pentraxina-3. Sin desear limitarse a la teoría, parece que la forma octamérica de la PTX3 puede quedar atrapada en el espacio extracelular y/o puede imprimir inflamación en el tejido en el que se encuentra.

En el curso de sus estudios, los inventores también identificaron la mieloperoxidasa como la oxidasa potencial responsable de ciertos eventos subyacentes (ver Tabla 1). En particular, esto se encuentra en los neutrófilos, donde genera radicales libres para matar las bacterias. La PTX3 puede estar implicada en la trampa extracelular de neutrófilos, que también está implicada en varios estados dañinos del paciente, tal como la aterosclerosis/enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, en una modalidad, la invención se refiere al uso de la PTX-3 como marcador de formación de la trampa extracelular de neutrófilos.

Describimos un marcador novedoso que puede identificar a los pacientes con shock séptico que están en riesgo de muerte y determinar su respuesta al tratamiento. Mediante el uso de la proteómica, hicimos una observación novedosa: la pentraxina-3, una proteína que se sabe que aumenta en el shock séptico, se oxida en la sangre y los diferentes estados de oxidación proporcionan un predictor superior del resultado de la enfermedad sobre las mediciones convencionales de esta proteína y otros marcadores de daño del tejido cardíaco.

En una modalidad, la invención se refiere a la pentraxina 3 oxidada como un nuevo biomarcador para la supervivencia en la sepsis.

Mediante el uso de un enfoque sistemático de proteómica en un modelo preclínico de sepsis, identificamos la pentraxina-3 como candidato principal, pero también hicimos las observaciones novedosas de que esta proteína estaba presente en una forma oxidada y que su estado de oxidación estaba asociado con un mal resultado de la enfermedad en los pacientes. La pentraxin-3 es apenas detectable en el plasma de individuos sanos, pero aumenta hasta 100 veces en la sepsis en dependencia de la gravedad de la enfermedad. Las mediciones convencionales de la

técnica anterior de biomarcadores inflamatorios tienen una debilidad distintiva de que los niveles de proteína tienden a permanecer altos incluso después del ingreso a la ICU. Por el contrario, ventajosamente el marcador de la invención (estado de oxidación de PTX3) se normaliza rápidamente en los respondedores a la terapia. Por ejemplo, el día 2 después del ingreso a la ICU, la PTX3 oxidada era indetectable en los sobrevivientes, pero aún constituía más de la mitad de la proteína total en los no sobrevivientes (ver la sección de ejemplos y los dibujos adjuntos).

Hemos aplicado un enfoque de proteómica sistemática para el descubrimiento de biomarcadores en un modelo preclínico de sepsis. Entre las proteínas expresadas más diferencialmente se encontraba una proteína de la fase aguda que se sabe que está asociada con una mayor mortalidad en pacientes sépticos. Curiosamente, la pentraxina-3 se acumuló como multímero debido a la formación de enlaces disulfuro, sobre todo en corazones, aortas, riñones y pulmones, órganos que son susceptibles a las complicaciones sépticas. La isoforma oxidada también se detectó en el plasma y el suero. Cuando cuantificamos los diferentes estados de oxidación en pacientes sépticos durante un período de tiempo de 11 días, no hubo diferencias entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes al ingreso a la ICU. Sin embargo, ya para el día 2, una reducción de la isoforma multimérica oxidada a la isoforma monomérica reducida se asoció con mejores posibilidades de supervivencia a 28 días de seguimiento. Esto a pesar de que los niveles de proteína total permanecen sin cambios. Esto está en marcado contraste con las técnicas de la técnica anterior que solo evalúan los niveles de la proteína PTX3, y no consideran el estado de oxidación de la PTX3.

APLICACIONES MÉDICAS

La invención proporciona un método para evaluar el estrés oxidativo, adecuadamente la respuesta al estrés oxidativo. Adecuadamente, este es el estrés oxidativo en la inflamación.

La invención se refiere a la evaluación de la enfermedad inflamatoria. La enfermedad inflamatoria abarca una variedad de afecciones. Un ejemplo de una enfermedad inflamatoria a la que puede aplicarse la invención es la sepsis. La sepsis es una enfermedad inflamatoria aguda, en particular una enfermedad cardiovascular inflamatoria aguda, tal como una enfermedad que implica al sistema cardiovascular.

Una enfermedad inflamatoria a la que puede aplicarse la invención es la enfermedad cardiovascular. La enfermedad cardiovascular es una enfermedad inflamatoria crónica. La enfermedad cardiovascular puede ser uno o más de MI, AF, A. pectoris, aterosclerosis, ataques isquémicos transitorios, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, cardiomiopatía y/o insuficiencia cardíaca.

Una enfermedad inflamatoria a la que puede aplicarse la invención es una enfermedad reumatoide.

En una modalidad, la invención puede aplicarse para evaluar la activación de neutrófilos, tal como la activación de neutrófilos que conduce a la formación de la trampa extracelular de neutrófilos.

Más adecuadamente, la invención se aplica a la evaluación del estrés oxidativo en la enfermedad inflamatoria.

Más adecuadamente, la invención se aplica a la predicción de los resultados del paciente en la enfermedad inflamatoria tales como el estrés oxidativo en la enfermedad inflamatoria.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para la evaluación asistida del pronóstico de un sujeto que comprende inferir a partir de la cantidad de PTX3 octamérica presente en una muestra de dicho sujeto la posibilidad de supervivencia de dicho sujeto.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para la evaluación asistida del pronóstico de un sujeto que comprende inferir a partir de la cantidad de PTX3 octamérica presente en una muestra de dicho sujeto la respuesta posible de dicho sujeto a la terapia o al tratamiento.

SEPSIS

A pesar del tratamiento rápido, la sepsis todavía se asocia con una mortalidad significativa. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de novedosos biomarcadores de pronóstico independientes para predecir el resultado de la enfermedad. La PTX3 oxidada es un ejemplo de dicho marcador de acuerdo con la presente invención.

Los pacientes en una unidad de cuidados intensivos reciben típicamente la terapia intensiva. En la técnica anterior, es difícil o imposible comprender los resultados posibles para pacientes individuales durante la terapia. Sin embargo, la invención nos permite ventajosamente evaluar los resultados posibles (pronóstico) de los pacientes en este entorno. Más específicamente, al evaluar los niveles de PTX3 octamérica en pacientes que reciben terapia intensiva, pueden predecirse resultados probables. Los niveles elevados de la PTX3 octamérica indica una menor posibilidad de supervivencia.
Los niveles elevados de la PTX3 octamérica pueden indicar la administración del tratamiento intensivo y/o supervisión, o pueden indicar una estadía prolongada en la ICU.

Los niveles más bajos de la PTX3 octamérica indican una mayor posibilidad de supervivencia.

Los niveles más bajos de la PTX3 octamérica pueden indicar una salida más temprana de la ICU.

Es una ventaja de la invención que las terapias o los tratamientos proporcionados a los sujetos pueden adaptarse de acuerdo con los resultados de la prueba. Por ejemplo, los pacientes que muestran niveles más altos de la PTX3 octamérica tienen menos posibilidad de sobrevivir. Por lo tanto, una intervención médica más radical puede estar indicada para un paciente que muestra un nivel más alto de PTX3 octamérica. Por ejemplo, los sujetos que muestran una PTX3 octamérica alta se les puede administrar un tratamiento de mayor riesgo o se les puede administrar un tratamiento más intensivo. Por ejemplo, los pacientes que muestran la PTX3 octamérica alta se les puede administrar con hemodiálisis. Por ejemplo, los pacientes que muestran la PTX3 octamérica alta pueden proporcionarse con tratamiento más temprano que los pacientes que muestran una PTX3 octamérica más baja.

La invención proporciona ventajas a los proveedores de atención médica, así como también a los pacientes. Por ejemplo, si se puede trasladar a un paciente de una unidad de cuidados intensivos a una sala común, la institución que proporciona su tratamiento tiene un ahorro sustancial de costos. De acuerdo con la invención, cuando se observa que un paciente tiene un nivel de PTX3 octamérica más bajo, es más probable que sobreviva y es menos probable que necesite un tratamiento intensivo. Por lo tanto, es posible mover a los pacientes que muestran la PTX3 octamérica más baja a una sala de categoría inferior, tal como trasladarlos de una unidad de cuidados intensivos a una sala de hospital convencional.

La invención proporciona ventajas en el manejo de los pacientes y las expectativas familiares. Por ejemplo, los pacientes que muestran un nivel de PTX3 octamérica alto tienen menos probabilidades de sobrevivir. Se les puede proporcionar asesoramiento adecuado tanto a ellos como a sus familiares, para que estén mejor preparados para posibles resultados negativos.

Una ventaja de la invención es que permite centrar la atención y/o los recursos en pacientes de mayor riesgo.

Una ventaja de la invención es que permite que los tratamientos experimentales se dirijan a pacientes que tienen la menor probabilidad de supervivencia (los niveles más altos de PTX3 octamérica). Estos pueden incluir tratamientos que normalmente no se administrarían a pacientes que tienen buenas perspectivas de supervivencia.

En una modalidad, la invención se refiere a un método que evalúa la respuesta a la terapia, en donde la PTX3 octamérica reducida seguido de la administración de la terapia es indicativa de una respuesta positiva a dicha terapia, y/o en donde un nivel aumentado de PTX3 octamérica seguido de la administración de la terapia muestra una reacción adversa a dicha terapia.

En un aspecto de la invención, los inventores enseñan que la PTX3 octamérica es un marcador de estrés oxidativo.

En una modalidad, la invención se refiere a un método para tratar a un paciente que comprende evaluar sus niveles de PTX3 octamérica, en donde a un sujeto que muestra niveles elevados de PTX3 octamérica se le administra una terapia antinflamatoria tal como la cortisona o una estatina, adecuadamente una estatina.

APLICACIÓN DE PRUEBAS

La invención encuentra la aplicación en unidades de cuidados intensivos o salas de hospital. Los sujetos pueden ser ventajosamente probados rutinariamente al ingresar a la ICU. Ventajosamente, los pacientes pueden ser supervisados regularmente, por ejemplo, supervisados diariamente, por sus niveles de PTX3 octamérica. Ventajosamente, un médico puede revisar la PTX3 octamérica de los pacientes recogida a intervalos cronometrados. Esto tiene la ventaja de permitir al médico evaluar una mejora o empeoramiento de la afección de los pacientes. Esto tiene la ventaja de permitir al médico proporcionar el tratamiento individualizado a dicho paciente.

La invención puede aplicarse en el ámbito de la atención primaria/práctica general. Por ejemplo, los pacientes que presentan una posible enfermedad cardiovascular u otra enfermedad inflamatoria crónica, tal como la enfermedad reumatoide, pueden someterse a prueba para determinar sus niveles de PTX3 octamérica de acuerdo con la invención.

SINCRONIZACIÓN

Será evidente para el lector experto que el momento de las pruebas de acuerdo con la invención puede ser importante. Por ejemplo, en afecciones agudas como la sepsis, y/o para pacientes tratados en una unidad de cuidados intensivos, un curso de tiempo de PTX3 octamérica puede proporcionar información especialmente útil. El tiempo es un componente menos crítico de los métodos de la invención para afecciones crónicas tales como la enfermedad cardiovascular o la enfermedad reumatoide cuando pueden ser útiles intervalos de tiempo ocasionales (tales como mensuales, mensuales múltiples, semestrales, anuales o incluso más largos). La invención también puede ser útil en la supervisión de la optimización inicial del tratamiento al comienzo de la enfermedad o cuando el empeoramiento de la enfermedad requiere el ajuste de la medicación (WHO Stufenschema).

Con afecciones agudas tal como la sepsis, la invención proporciona las pruebas regulares, tal como las pruebas diarias.

Se debe señalar que una ventaja de la invención es que proporciona información del pronóstico para el resultado en afecciones inflamatorias.

Se debe señalar que una ventaja de la invención es que proporciona información del pronóstico bien para afecciones agudas o crónicas. El método de acuerdo con la invención proporciona información útil cuando se predicen eventos o resultados futuros para el sujeto que se está probando.

Adecuadamente, cuando la afección o la sospecha es una afección aguda, tal como la sepsis o tal como la supervisión de pacientes en las ICU, se determina la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica. Esto tiene la ventaja de un mayor poder discriminatorio como se muestra en las curvas ROC en los dibujos acompañantes, los cuales ilustran una o más modalidades ilustrativas.

Adecuadamente cuando la afección o sospecha es una afección crónica, tal como la enfermedad cardiovascular o enfermedad reumatoide, la detección de un nivel elevado de PTX3 octamérica, o incluso la detección de la mera presencia de PTX3 octamérica (por ejemplo, la detección de PTX3 en comparación con una referencia estándar en el que no se encuentra la PTX3 octamérica corresponde a un nivel elevado de PTX3 octamérica), es útil para ayudar a la determinación del pronóstico y/o predecir el resultado clínico para un sujeto.

Sin desear limitarse a la teoría, el análisis de las relaciones de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica también es útil en afecciones crónicas. Sin embargo, como una cuestión práctica, las cantidades absolutas de PTX3, como la PTX3 octamérica presente en afecciones crónicas, pueden ser bajas y, por razones puramente prácticas, frecuentemente no se desea analizar las relaciones en afecciones crónicas ya que el análisis del nivel de (y/o la proporción de) la PTX3 octamérica se lleva a cabo ventajosamente cuando se abordan afecciones crónicas.

Es una ventaja de la invención que la evaluación de PTX3 oxidada (octamérica) es superior a la prueba de la técnica anterior de PTX3 que implica solo evaluar los niveles de PTX3 totales. Por ejemplo, la invención es superior al proporcionar información mucho mejor.

La invención encuentra aplicación en programas de investigación. Por ejemplo, la invención encuentra aplicación en la evaluación del riesgo cardiovascular. Por ejemplo, la invención encuentra aplicación en programas de lípidos, tales como la investigación de la hiperlipidemia. La invención encuentra aplicación en la prueba de trastornos relacionados con el azúcar, tal como la hiperglucemia. La invención encuentra aplicación en la investigación de la presión sanguínea, tal como la investigación de la presión sanguínea elevada.

ESTÁNDAR DE REFERENCIA

El estándar de referencia se refiere típicamente a una muestra de un individuo sano, es decir, uno que no ha padecido la enfermedad inflamatoria.

El estándar de referencia puede ser una muestra real analizada en paralelo. Alternativamente, el estándar de referencia puede ser uno o más valores derivados previamente de una muestra comparativa, por ejemplo, una muestra de un sujeto sano. En tales modalidades, puede hacerse una mera comparación numérica al comparar el valor determinado para la muestra del sujeto con el valor numérico de una muestra de referencia analizada previamente. La ventaja de esto es que no tiene que duplicar el análisis al determinar las concentraciones en muestras de referencia individuales en paralelo cada vez que se analiza una muestra de un sujeto.

Adecuadamente, el estándar de referencia coincide con el sujeto que se analiza, por ejemplo, por género, por edad, por origen étnico u otros criterios tales que se conocen bien en la técnica. El estándar de referencia puede ser un número tal como una concentración absoluta elaborada por uno o más estudios previos.

Los estándares de referencia pueden corresponder adecuadamente a subgrupos específicos de pacientes, por ejemplo, aquellos con antecedentes relevantes anteriores, tales como una predisposición a la enfermedad inflamatoria.

Los estándares de referencia pueden corresponder adecuadamente a un individuo con una enfermedad crónica para ser útiles durante un estallido inflamatorio (AR).

Adecuadamente, el estándar de referencia se corresponde con el tipo de muestra que se analiza. Por ejemplo, la concentración del(de los) polipéptido(s) biomarcador(es) que se analiza(n) puede variar en dependencia del tipo o la naturaleza de la muestra. Será inmediatamente evidente para el trabajador experto que el(los) valor(es) de concentración para el estándar de referencia debe(n) ser para la misma muestra o una muestra comparable a la que se está probando en los métodos de la invención. Por ejemplo, si la muestra que se analiza es sangre, entonces el valor estándar de referencia debería ser sangre para garantizar que sea capaz de realizar una comparación cruzada significativa y, por lo tanto, se calcule una relación cuantitativa significativa. En particular, se debe tener extremo

cuidado si se intentan inferencias mediante la comparación entre las concentraciones determinadas para un sujeto de interés y las concentraciones determinadas para los estándares de referencia donde la naturaleza de la muestra no es idéntica entre los dos. Adecuadamente, el tipo de muestra para el estándar de referencia y el tipo de muestra para el sujeto de interés son los mismos.

Se debe señalar que para algunas modalidades de la invención, las concentraciones de polipéptido/proteína determinadas pueden compararse con una muestra previa del mismo sujeto. Esto puede ser beneficioso para supervisar el progreso de la terapia en un sujeto. Esto puede ser beneficioso para supervisar el curso y/o la efectividad de un tratamiento de un sujeto. En esta modalidad, el método puede comprender etapa(s) adicional(es) para comparar los niveles de PTX3 octamérica (o proporciones o relaciones) determinados para la muestra de interés con uno o más niveles de PTX3 octamérica (o proporciones o relaciones) determinados para diferentes muestras tales como muestras tomadas en diferentes puntos de tiempo para el mismo sujeto. Ejemplos de puntos de tiempo incluyen el ingreso a la ICU y/o el día 2 después del ingreso a la ICU. Al hacer tal comparación, puede recopilarse información sobre si los niveles de PTX3 octamérica están aumentando o disminuyendo en un sujeto en particular. Esta información puede ser útil para supervisar o predecir cambios en el tiempo, o cambios inhibidos o estimulados por un tratamiento particular o un régimen de terapia, o cualquier otra variable de interés. Por lo tanto, si los niveles de PTX3 octamérica se elevan, o se elevan aún más, en una muestra desde un punto de tiempo posterior del mismo sujeto, esto indica una posibilidad de pronóstico, tal como las perspectivas de supervivencia-empeoramiento en dicho sujeto. Igualmente, si los niveles de PTX3 octamérica se reducen en una muestra desde un punto de tiempo posterior del mismo sujeto, esto indica una posibilidad de mejora del pronóstico, tal como las perspectivas de supervivencia en dicho sujeto. Claramente, si estos efectos se observan en un sujeto sometido a tratamiento para la enfermedad inflamatoria tal como la sepsis, entonces las inferencias correspondientes con respecto a la efectividad del tratamiento pueden extraerse igualmente de acuerdo con la presente invención. En otras palabras, cuando un sujeto está en tratamiento, si los niveles de PTX3 octamérica se reducen en una muestra desde un punto de tiempo posterior del mismo sujeto, esto indica una posibilidad de que el tratamiento sea efectivo; si los niveles de PTX3 octamérica están elevados, o aumentan aún más, en una muestra de un punto de tiempo posterior del mismo sujeto, esto indica una posibilidad de que el tratamiento sea ineficaz.

De esta manera, la invención puede usarse para determinar si, por ejemplo, después del tratamiento del paciente con un fármaco o fármaco candidato, la enfermedad ha progresado o no, o si la tasa de progresión de la enfermedad se ha modificado. El resultado puede conducir a un pronóstico del resultado de la enfermedad.

VALORES DE LÍMITE DE CORTE

La tabla más abajo muestra los cálculos para un límite de corte deslizante para niveles del octámero. Estos son valores ilustrativos en el día 2. Estos valores ilustrativos son los medidos por densitometría de las transferencias Western.

Se hace referencia a la Figura 7B: los datos de la tabla más abajo corresponden al AUC de la Figura 7B.

PTX3 octamérica	**Vivas**			**Muertas**			**Características de la Prueba**		
	Frecuencia	Acumulado Por ciento		Frecuencia	Acumulado Por ciento		Definición de resultado positivo de la prueba	Sensibilidad	Especificidad
								100	0
0	17	73,91		1	14,29		>0	85,71	73,91
0,087	1	78,26					>0,087	85,71	78,26
0,323				1	28,57		>0,323	71,43	78,26
0,456	1	82,61					>0,456	71,43	82,61
0,557				1	42,86		>0,557	57,14	82,61
0,639	1	86,96					>0,639	57,14	86,96
0,648				1	57,14		>0,648	42,86	86,96
0,81	1	91,3					>0,81	42,86	91,3
0,904	1	95,65					>0,904	42,86	95,65
1,373				1	71,43		>1,373	28,57	95,65
1,529	1	100					>1,529	28,57	100

2,195				1	85,71		>2,195	14,29	100
4,733				1	100		>4,733	0	100

La elección del límite de corte óptimo depende de si el operador desea minimizar los falsos positivos y los falsos negativos. En este ejemplo, es más importante identificar la mayor cantidad posible de no sobrevivientes. Con un límite de corte = 0,1 para el octámero medido por densitometría, la sensibilidad es del 86 % y la especificidad es del 78 % (dos columnas a la derecha, hilera 3 - marcadas con un recuadro grueso en la tabla anterior).

El resto de la tabla ilustra todos los demás límites de corte que pueden usarse, por ejemplo, en enfermedades agudas como la sepsis.

Para la inflamación crónica, debe usarse el límite de corte más bajo - el octámero no es detectable en individuos sanos. Cualquier octámero detectable (valor> 0) debe considerarse un marcador de estrés oxidativo y/o inflamación abrumadora.

FORMATO DEL ENSAYO

Se debe señalar que oxidado y oxidado son sinónimos. Tienen el mismo significado. Los términos oxidado y oxidado se usan indistintamente en este documento.

La invención se centra en la PTX3 octamérica. La forma octamérica es una forma oxidada. A menos que sea evidente por el contexto, la mención de "PTX3 oxidada" o "PTX3 oxidada" puede tomarse como PTX3 octamérica.

Los métodos de la invención requieren la evaluación del nivel de PTX3 octamérica. Esto es completamente diferente a la técnica anterior que enseña solo la evaluación de la PTX3 total. Por el contrario, la invención deja en claro que es el nivel de la PTX3 octamérica (la forma oxidada de la PTX3) lo que es importante, tal como importante pronósticamente.

La evaluación de la PTX3 octamérica puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica. Adecuadamente, la PTX3 puede separarse en las diferentes formas monoméricas/multiméricas. Esto puede lograrse mediante electroforesis en gel, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), por ejemplo, PAGE no reductora.

Adecuadamente, la muestra se somete a PAGE en condiciones no reductoras. El material que resulta de la electroforesis puede luego analizarse para determinar el nivel de las especies individuales de PTX3 presentes. Esto puede hacerse por espectrometría de masas de las proteínas separadas. Esto puede hacerse mediante transferencia, tal como a través de una transferencia Western sobre una membrana apropiada. Esta membrana puede luego analizarse con un anticuerpo anti-PTX3 tal como Epitomics número de Catálogo 5414-1. Este proceso puede denominarse inmunotransferencia. De esta manera, pueden visualizarse las diferentes especies de PTX3 (monómeros frente a multímeros). El total de PTX3 presente se determina al sumar las cantidades individuales de las diferentes especies de PTX3 detectadas. Alternativamente, o además, el total de PTX3 presente puede determinarse mediante la evaluación de una muestra paralela en condiciones de gel reductor.

En una modalidad, la muestra que comprende la PTX3 puede dividirse en dos o más partes, una parte sometida a PAGE en condiciones reductoras y la otra parte sometida a PAGE en condiciones no reductoras. El material que resulta de la electroforesis puede luego transferirse, tal como a través de una transferencia Western a una membrana apropiada. Esta membrana puede luego analizarse con un anticuerpo anti-PTX3. De esta manera, las diferentes especies de PTX3 (monómeros frente a multímeros) pueden visualizarse en condiciones no reductoras. La PTX3 total debería aparecer como una sola especie en el tratamiento de las condiciones reductoras, que facilita de esta manera la cuantificación fácil de la PTX3 total presente.

Se debe señalar que hay al menos tres formas de PTX3. En primer lugar, está el monómero (forma reducida).

En segundo lugar, está el tetrámero (cuatro moléculas de PTX3 en un complejo). Aunque no se cree que los niveles del tetrámero sean importantes para los métodos de la invención en el sentido de asociación con un pronóstico particular y/o posibilidad de resultado adverso, los niveles del tetrámero pueden proporcionar un valor de control útil, por ejemplo, para la normalización de los niveles relativos del octámero entre individuos.

Por último, está la forma octamérica (oxidada) de la PTX3 (ocho moléculas de PTX3 en un complejo).

Cualquier mención de la evaluación del total de PTX3 significa la evaluación de la cantidad combinada de la PTX3 presente, es decir, que incluye el monómero, el tetrámero y el octámero. El nivel total de PTX3 no hace ninguna distinción entre las formas monoméricas/multiméricas. El nivel total de PTX3 puede determinarse directamente, o puede determinarse al sumar (adicionar) los niveles individuales del monómero, el tetrámero y el octámero.

La técnica anterior no solo no habría llevado a la presente invención a estudiar los niveles absolutos de PTX3, sino que también habría enmascarado la presente invención. Los inventores enseñan por primera vez que los niveles de PTX3 oxidada (octamérica) es un indicador clave del pronóstico y/o la respuesta al tratamiento para pacientes que padecen de enfermedad inflamatoria, tal como el estrés oxidativo. Es una medida de este subcomponente clave (modificación postraduccional clave) de lo que anteriormente se consideraba un solo analito, lo cual es importante. De acuerdo con la técnica anterior, se mide el 'total' de PTX3. Esto no tiene en cuenta el estado oligomérico de la PTX3. La medición del 'total' de PTX3 de hecho enmascara la notable correlación que los inventores han descrito, porque no distingue el componente informativo clave del análisis, específicamente los octámeros de la PTX3.

Sin desear limitarse a la teoría, parece que el tetrámero puede ser una forma intermedia entre el monómero y el octámero. La invención no enseña un valor pronóstico para los niveles de la forma tetramérica de la PTX3. Puede ser útil evaluar los niveles del tetrámero para "normalizar" las muestras. Parece que los niveles del tetrámero pueden ser relativamente constantes. Así, adecuadamente en una modalidad, las cantidades de PTX3 octamérica presente pueden normalizarse frente a la cantidad de PTX3 tetramérica presente. Adecuadamente, las cantidades de PTX3 octamérica presente pueden expresarse como cantidades por microgramo de PTX3 tetramérica. Adecuadamente, la determinación de las cantidades de PTX3 octamérica comprende la determinación de la cantidad de PTX3 octamérica y la determinación de la cantidad de PTX3 tetramérica y el cálculo de la cantidad de PTX3 octamérica por microgramo de PTX3 tetramérico.

Adecuadamente, se determina la cantidad de octámero de PTX3.

Adecuadamente, se determina la proporción de octámero de PTX3 del total de PTX3.

Adecuadamente, se determina la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica. Esto tiene la ventaja de no requerir la determinación de niveles absolutos de PTX3. Esto tiene la ventaja de evitar la necesidad de determinar la cantidad de PTX3 tetramérica (o cualquier otra forma no implicada de PTX3) presente.

Adecuadamente, se evalúan los niveles de la PTX3 oxidada.

Adecuadamente, se evalúan los niveles de octámero de la PTX3.

Adecuadamente, se evalúa la cantidad de PTX3 oxidada como un por ciento (proporción) de la PTX3 total.

Adecuadamente, se evalúa la cantidad de octámero de PTX3 como un por ciento (proporción) de la PTX3 total.

Adecuadamente, se evalúa la relación de la PTX3 oxidada a PTX3 reducida.

Adecuadamente, se evalúa la relación de PTX3 oxidada (PTX3 octamérica) a PTX3 reducida (PTX3 monomérica).

Adecuadamente, se evalúa la relación de octámero de PTX3 a monómero de PTX3.

La relación de PTX3 octamérica puede calcularse como la relación de octámero a monómero.

Los niveles de PTX3, tales como los niveles de PTX3 monomérica/tetramérica/octamérica, pueden evaluarse mediante la espectrometría de masas (MS).

Los niveles de PTX3, tales como los niveles de PTX3 monomérica/tetramérica/octamérica, pueden evaluarse mediante lectura directa, tal como mediante el uso de ligando(s) (por ejemplo, anticuerpos) capaces de unir selectivamente las formas monoméricas/tetraméricas/octaméricas de la PTX3. La PTX3 total puede cuantificarse mediante el uso de un ligando pan-PTX3 (como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo) que se une a todas las formas de la PTX3 independientemente de su estado monomérico/polimérico.

El uso de la detección directa de la PTX3 monomérica/tetramérica/octamérica tal como por MS o por ligandos selectivos (por ejemplo, anticuerpos específicos para la PTX3 monomérica/tetramérica/octamérica) ofrece la ventaja de evitar la necesidad de separación, tal como la separación en gel de la separación capilar de las formas monomérica/tetramérica/octamérica de la PTX3, que se requiere cuando se detecta mediante el uso de un ligando pan-PTX3 para la detección (por ejemplo, un anticuerpo que se une a la PTX3 independientemente de su estado monomérico/tetramérico/octamérico).

Se debe señalar que la medición de los niveles absolutos de la PTX3 octamérica tiene valor en los métodos de la invención. Sin embargo, ventajosamente se evalúa la proporción de la PTX3 octamérica.

Los niveles de PTX3 octamérica pueden visualizarse a través de técnicas de caracterización estándar, tales como la tinción de plata de geles electroforéticos, la medición de iones de péptidos representativos mediante el uso de la espectrometría de masas (que incluye la supervisión de la reacción múltiple/la supervisión de reacción seleccionada (MRM/SRM), que es el tipo de exploración con el ciclo de trabajo más alto y se usa para supervisar una o más

transiciones iónicas específicas con alta sensibilidad), o los métodos de detección inmunológica que incluyen la transferencia Western, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o la radioinmunoensayo. Otras técnicas de caracterización estándar de este tipo mediante las cuales pueden visualizarse niveles de PTX3 octamérica se conocen bien para los expertos en la técnica. Estos incluyen sucesivas separaciones cromatográficas de las fracciones y comparaciones de los picos, la electroforesis capilar, las separaciones mediante el uso de redes de microcanales, que incluye en un microchip, y los métodos de espectrometría de masas que incluyen la supervisión de la reacción múltiple (MRM), si corresponde.

Las separaciones cromatográficas pueden llevarse a cabo mediante la cromatografía líquida de alto rendimiento como se describe en la literatura de Pharmacia, el cromatograma obtenido en la forma de un gráfico de absorbancia de luz a 280 nm frente al tiempo de separación. El material que da picos resueltos de forma incompleta se vuelve a cromatografiar y así sucesivamente.

La electroforesis capilar es una técnica descrita en muchas publicaciones, por ejemplo en la literatura "Total CE Solutions" suministrada por Beckman con su sistema P/ACE 5000. La técnica depende de la aplicación de un potencial eléctrico a través de la muestra contenida en un pequeño tubo capilar. El tubo tiene una superficie cargada, tal como vidrio de silicato cargado negativamente. Los iones con carga opuesta (en este caso, iones positivos) son atraídos a la superficie y luego migran al electrodo apropiado de la misma polaridad que la superficie (en este caso, el cátodo). En este flujo electroosmótico (EOF) de la muestra, los iones positivos se mueven más rápido, seguidos por el material no cargado y los iones cargados negativamente. Por lo tanto, las proteínas se separan esencialmente de acuerdo con la carga sobre ellas.

Las redes de microcanales funcionan un tanto similar a los capilares y pueden formarse por fotoablación de un material polimérico. En esta técnica, se usa un láser UV para generar pulsos de luz de alta energía que se disparan en ráfagas sobre los polímeros que tienen características de absorción UV adecuadas, por ejemplo el tereftalato de polietileno o el policarbonato. Los fotones incidentes rompen los enlaces químicos con un espacio confinado, lo que lleva a un aumento de la presión interna, las miniexplosiones y la expulsión del material ablacionado, dejando atrás huecos que forman microcanales. El material de microcanal logra una separación basada en el EOF, como en la electroforesis capilar. Es adaptable a la forma de microchip, cada chip tiene su propio inyector de muestra, la columna de separación y el detector electroquímico: ver J.S.Rossier y otros, 1999, Electrophoresis 20: páginas 727-731.

Otros métodos incluyen realizar un ensayo de unión para la PTX3. Puede usarse cualquier agente de unión razonablemente específico. Preferentemente, el agente de unión está marcado. Preferentemente, el ensayo es un inmunoensayo, especialmente entre el biomarcador y un anticuerpo que reconoce la proteína, especialmente un anticuerpo marcado. Puede ser un anticuerpo generado contra parte o la totalidad de la proteína marcador, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un antisuero policlonal antihumano de alta especificidad para la PTX3. La PTX3 capturado puede entonces analizarse para determinar su estado monomérico o multimérico.

Cuando el ensayo de unión es un inmunoensayo, puede llevarse a cabo al medir el alcance de la interacción PTX3/anticuerpo. Puede usarse cualquier método conocido de inmunoensayo. Se prefiere un ensayo sándwich. En un ensayo sándwich ilustrativo, un primer anticuerpo contra la proteína marcador se une a la fase sólida, tal como un pocillo de una placa de microtitulación de plástico o membrana seca, y se incuba con la muestra y con un segundo anticuerpo marcado específico para la proteína a analizar. Alternativamente, puede usarse un ensayo de captura de anticuerpos. Aquí, se permite que la muestra de prueba se una a una fase sólida, y luego se añade el anticuerpo anti-proteína PTX3 y se deja que se unan. Después de lavar el material no unido, la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida se determina mediante el uso de un segundo anticuerpo marcado, anti- al primero.

El agente de unión en el ensayo de unión puede ser un agente de unión específico marcado, que puede ser un anticuerpo u otro agente de unión específico. El agente de unión generalmente se marcará a sí mismo, pero alternativamente puede detectarse mediante una reacción secundaria en la que se genera una señal, por ejemplo, a partir de otra sustancia marcada.

La etiqueta puede ser una enzima. El sustrato para la enzima puede ser, por ejemplo, formador de color, fluorescente o quimioluminiscente.

Puede usarse una forma amplificada de ensayo, de manera que se produce una "señal" mejorada a partir de un nivel relativamente bajo de proteína a detectar. Una forma particular de inmunoensayo amplificado es el ensayo quimioluminiscente mejorado. Convenientemente, el anticuerpo está marcado con la peroxidasa de rábano picante, que participa en una reacción quimioluminiscente con luminol, un sustrato de peróxido y un compuesto que aumenta la intensidad y la duración de la luz emitida, típicamente el 4-yodofenol o el ácido 4-hidroxicinámico.

Otra forma de inmunoensayo amplificado es la inmuno-PCR. En esta técnica, el anticuerpo se une covalentemente a una molécula de ADN arbitraria que comprende iniciadores de PCR, de manera que el ADN con el anticuerpo unido a él se amplifica por la reacción en cadena de la polimerasa. Ver E. R. Hendrickson y otros, Nucleic Acids Research 23: 522-529 (1995). La señal se lee como antes.

También se contempla dentro de la invención usar (i) una matriz de anticuerpos o 'chip', o una matriz de suspensión de microesferas capaz de detectar la PTX3 que interactúa con ese anticuerpo.

Un chip de anticuerpo, una matriz de anticuerpo o una micromatriz de anticuerpo es una matriz de elementos direccionables únicos en una superficie sólida continua de manera que en cada elemento direccionable único se inmoviliza un anticuerpo con especificidad definida para un antígeno de una manera que permite la subsecuente captura del antígeno objetivo y la subsecuente detección del alcance de dicha unión. Cada elemento direccionable único está separado de todos los demás elementos direccionables únicos en la superficie sólida para que la unión y la detección de los antígenos específicos no interfiera con ningún elemento direccionable único adyacente.

Una "matriz de suspensión de microesferas" es una suspensión acuosa de una o más partículas identificables distintas de manera que cada partícula contiene características de codificación relacionadas con su tamaño y color o marca fluorescente y a las que se recubren todas las perlas de una combinación particular de tales características de codificación un anticuerpo con una especificidad definida para un antígeno de una manera que permita la subsecuente captura del antígeno objetivo y la subsecuente detección del alcance de dicha unión. Pueden encontrarse ejemplos de tales matrices en www.luminexcorp.com donde se describe la aplicación de la matriz de suspensión de microesferas xMAP® en el sistema Luminex® 100™.

MUESTRA

El término "muestra" o "muestra biológica", como se usa en la presente descripción, significa una muestra biológica derivada de un paciente a investigar. La muestra biológica puede ser cualquier muestra adecuada conocida en la técnica en la que pueda detectarse la expresión de los marcadores seleccionados. Se incluyen células individuales o poblaciones de células como las obtenidas de los tejidos o los fluidos corporales. La muestra biológica puede comprender, por ejemplo, una muestra de sangre o de tejido.

Adecuadamente, la muestra puede ser sangre, suero o plasma. Adecuadamente, la muestra es plasma. El plasma puede prepararse a partir de la sangre mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como centrifugación para eliminar las PBMC.

Por lo tanto, adecuadamente la muestra para análisis comprende proteína.

Adecuadamente, la muestra es una muestra *in vitro*.

Adecuadamente, la muestra es una muestra extracorpórea.

En una modalidad, adecuadamente, el método es un método *in vitro*. En una modalidad, adecuadamente, el método es un método extracorpóreo. En una modalidad, adecuadamente, el muestreo real del sujeto (recolección de muestra biológica) no es parte del método de la invención. Adecuadamente, el método no implica la recolección de la muestra biológica. Adecuadamente, la muestra es una muestra recogida previamente. Adecuadamente, el método no requiere la presencia del sujeto cuya proteína se está analizando. Adecuadamente, la muestra es una muestra *in vitro*. Adecuadamente, el método no implica la decisión médica real, *stricto sensu;* tal decisión *stricto sensu* típicamente sería tomada por el médico.

Adecuadamente el método de la invención se realiza *in vitro.* Adecuadamente, el método de la invención se realiza extracorpóreamente.

Cuando las proporciones de PTX3 se discuten en la presente descripción, se pretende que signifiquen una proporción de una masa o una cantidad total estimada de PTX3. Por ejemplo, ocho moléculas de PTX3 en un solo complejo octamérico junto con ocho moléculas de PTX3 presentes como monómeros individuales dan una relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica de uno a uno. No es un enfoque de "conteo de complejos" (es decir, ocho moléculas de PTX3 presentes como un complejo octamérico junto con ocho moléculas de PTX3 presentes como ocho monómeros individuales no dan una relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica de uno a ocho; la masa de PTX3 presente como monómero es equivalente a la masa de PTX3 presente como octámero, por lo que la relación es de uno a uno), pero es un conteo de la cantidad de PTX3 presente en las formas alternativas.

Otros aspectos particulares y preferidos se exponen en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Las características de las reivindicaciones dependientes pueden combinarse con las características de las reivindicaciones independientes según sea apropiado y en combinación con otras enunciadas explícitamente en las reivindicaciones.

Cuando una característica del aparato se describe como operable para proporcionar una función, se apreciará que esto incluye una característica del aparato que proporciona esa función o que está adaptada o configurada para proporcionar esa función.

APLICACIONES ADICIONALES

En otra modalidad, la invención se refiere a un método para identificar un sujeto, tal como un sujeto que tiene sepsis, en riesgo de desarrollar insuficiencia aguda de órganos, que comprende realizar el método como se describió anteriormente en donde un nivel más alto de PTX3 octamérica, o la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, indica que dicho sujeto se identifica como en riesgo de desarrollar insuficiencia aguda de órganos.

La invención también se refiere al método para ayudar a la predicción del resultado clínico en un sujeto, el método que comprende realizar el método como se describió anteriormente en donde un nivel más alto de PTX3 octamérica, o la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, indica que dicho sujeto se predice que será un probable no sobreviviente.

La invención también se refiere al método para proporcionar un pronóstico para un sujeto, el método que comprende realizar el método como se describió anteriormente en donde un nivel más alto de PTX3 octamérica, o la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, indica que dicho sujeto se atribuyó un pronóstico de probable no supervivencia.

La invención también se refiere a un método para tratar a un sujeto que padece de una enfermedad inflamatoria que comprende realizar el método como se describió anteriormente en donde si se detecta un nivel más alto de PTX3 octamérica, o la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, entonces se administra a dicho sujeto un medicamento dirigido a los mediadores circulantes de la inflamación.

Adecuadamente, la enfermedad inflamatoria es la sepsis, más adecuadamente la enfermedad inflamatoria es la insuficiencia aguda de órganos (AOF).

La invención también se refiere a un método para identificar a un sujeto en riesgo de muerte, que comprende realizar el método como se describió anteriormente en donde un nivel más alto de PTX3 octamérica, o la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, indica que dicho sujeto está identificado como en riesgo de muerte. La muerte puede deberse a insuficiencia aguda de órganos, sepsis u otra afección inflamatoria de la invención.

Adecuadamente, la invención se aplica a pacientes de las ICU.

La invención también se refiere a un método para tratar a un sujeto que padece de una enfermedad inflamatoria que comprende realizar el método como se describió anteriormente en donde si se detecta un nivel más alto de PTX3 octamérica, o la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, entonces se administra a dicho sujeto un medicamento dirigido a la inflamación dentro de los tejidos. Adecuadamente, la enfermedad inflamatoria es la sepsis, más adecuadamente la enfermedad inflamatoria es la insuficiencia aguda de órganos (AOF).

Enseñamos un nuevo biomarcador de pronóstico, identificado a través de la investigación, que predice la insuficiencia cardiovascular y/o un mayor riesgo de muerte por shock séptico. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden aplicarse a la identificación de sujetos en riesgo de insuficiencia cardiovascular y/o mayor riesgo de muerte por shock séptico.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de recopilación de información útil para determinar el grado de estrés oxidativo en un sujeto que padece un trastorno inflamatorio, el método que comprende proporcionar una muestra de dicho sujeto y determinar el nivel de PTX3 octamérica en dicha muestra, o la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, en donde un nivel más alto de PTX3 octamérica, o la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, indica un mayor grado de estrés oxidativo.

Breve descripción de los dibujos

Las modalidades de la presente invención se describirán de aquí en adelante, con referencia a los dibujos acompañantes, en los que:

La Figura 1 muestra el análisis de proteómica. **A,** Tinción con hematoxilina y eosina en el control y los corazones sépticos. Ampliación xio. Barra de escala 200 µm. Inmunotinción para el marcador de macrófagos **Iba-1. B**, Expresión diferencial de proteínas extracelulares en el análisis proteómico. Tenga en cuenta la pronunciada regulación positiva de la pentraxina 3 (PTX3, flecha). **C,** Datos de conteo del espectro de proteómica para la PTX3; Proteína 3 rica en cisteína y glicina (CSRP3); proteína 1 que contiene dominio de repetición de anquirina (ANKRi); y motivo tripartito que contiene la proteína 72 (Trim72). Expresión igual de la α-actinina-1 y la proteína C de unión a la miosina cardíaca (cMyBP-C); **D,** Validación por inmunotransferencia. Se realizaron las inmunotransferencias western representativas de la fracción insoluble en Tritón en 4 corazones por grupo. Investigación para la α-actinina; la proteína C de unión a la miosina cardíaca (cMyBP-C); y la tinción con Coomassie aseguró la carga equitativa de proteínas.

La Figura 2 muestra la oxidación de la PTX3 en la sepsis. **A,** Los corazones de los ratones C57Bl6 control o tratados con LPS se subfraccionaron en la fracción soluble e insoluble en Tritón. Las fracciones se sometieron al análisis de inmunotransferencia western en condiciones reductoras (panel superior) o no reductoras (panel inferior). Se analizaron las inmunotransferencias western representativas de 3 corazones de ratón por grupo para la PTX3, la teletonina, (marcador del compartimento que contiene el miofilamento insoluble) y el GAPDH (marcador del compartimento que

contiene citosol soluble). Se analizaron los diferentes estados de oxidación de la PTX3 (octámero, tetrámero y monómero) por inmunotinción. **B,** Las muestras de tejido de corazón, aorta, riñón, bazo, hígado, pulmón, músculo y cerebro se sometieron al análisis de inmunotransferencia western en condiciones de gel no reductor (panel superior) o reductor (panel inferior) y se analizaron con un anticuerpo de PTX3. **C,** Las muestras de plasma de ratones C57Bl6 de control o de ratones después de la sepsis inducida por LPS se les eliminó la albúmina y se analizaron para determinar el contenido de la proteína PTX3 y el estado de oxidación mediante el uso de análisis de inmunotransferencia western en condiciones no reductoras. La inmunotransferencia western representativa muestra los resultados de 4 ratones por grupo.

La Figura 3 muestra la asociación de la oxidación de la PTX3 con la supervivencia. **A,** Se analizaron las muestras de suero de 31 pacientes sépticos después del ingreso a la ICU (día 0) durante un período de tiempo de 11 días para determinar los niveles de PTX3 en plasma después de la eliminación de la albúmina. Las inmunotransferencias western son ejemplos representativos del desarrollo del estado de oxidación de la PTX3 con el tiempo después del ingreso en un paciente con sepsis no sobreviviente (panel superior) en comparación con un paciente con sepsis sobreviviente (panel inferior). **B,** Los niveles de PTX3 monomérica, tetramérica y octamérica se cuantificaron para cada paciente y punto de tiempo mediante el uso del análisis de inmunotransferencia western realizado en condiciones no reductoras. * denota diferencia estadística significativa entre los pacientes que murieron y los que sobrevivieron durante el seguimiento; P <0,05. C, Comparación de los niveles de oxidación de la PTX3 entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes en el día 2 posterior al ingreso a la ICU.

La Figura 4 muestra la asociación de la oxidación de la PTX3 con los marcadores de daño cardíaco. **A,** Correlación de los niveles de octámero, tetrámero y monómero de la PTX3 con NT-proBNP (panel superior), hsTnT (panel central) y hsTnI (panel inferior). **B,** Comparación de los niveles de NT-proBNP, hsTnT y hsTnI entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes en el día 2 posterior al ingreso a la ICU.

La figura 5 muestra la asociación de la oxidación de la pentraxina-3 (PTX3) con la supervivencia. **A,** Inmunotransferencias representativas del desarrollo del estado de oxidación de la PTX3 con el tiempo después del ingreso en un paciente con sepsis no sobreviviente (panel superior) en comparación con un paciente con sepsis sobreviviente (panel inferior). **B,** Los niveles de PTX3 monomérica, tetramérica y octamérica se cuantificaron para cada paciente y punto de tiempo mediante el uso del análisis de inmunotransferencia western realizado en condiciones no reductoras. * denota diferencia estadística significativa de los niveles de referencia en el día 0; P <0,05. C, Comparación de los niveles de oxidación de la PTX3 entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes en el día 2 posterior al ingreso a la ICU.

La figura 6 muestra los anticuerpos que reconocen específicamente la PTX3 oxidada o reducida. La secuencia objetivo contiene las dos cisteínas (Cys) que unen las cadenas por un disulfuro doble: La Cys 317 en un monómero de PTX3 se une con la Cys 318 en otro, y esto ocurre dos veces para formar un doble enlace disulfuro. Los péptidos ya se han sintetizado y un puente de prueba ha tenido éxito. Una vez que el financiamiento esté en su lugar, la síntesis de péptidos se ampliará para la inmunización. Planeamos generar primero anticuerpos policlonales, luego monoclonales.

La figura 7 muestra las curvas ROC de las mediciones de PTX3 en comparación con el NT-proBNP. A) Poder discriminatorio de la relación de la PTX3 oxidada a reducida. El área bajo la curva fue de 0,92 (CI del 95 %, 0,82 a 1,00) para la medición combinada de isoformas de la PTX (octámero y monómero) y 0,69 (0,49 a 0,88) para el péptido natriurético de tipo pro-B N-terminal (NT-proBNP), un marcador de disfunción ventricular izquierda que con frecuencia aumenta en el SS. Valor de P para la diferencia = 0,02 **B**) Poder discriminatorio de la PTX3 octamérica solamente. **C**) Características del resultado de la PTX3 octamérica cuantificado por inmunotransferencias en condiciones no reductoras.

EJEMPLOS

Aunque los ejemplos de la invención ilustrativos se describen en detalle en la presente descripción, con referencia a los dibujos que se acompañan, se entiende que la invención no se limita a las modalidades precisas descritas y que un experto en la técnica puede realizar diversos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Información General

Hemos aplicado un enfoque global de proteómica basada en los tejidos para el descubrimiento de biomarcadores en un modelo de sepsis en ratones. Entre las proteínas expresadas más diferencialmente en el tejido cardíaco se encontraba la pentraxina 3 larga (PTX3), una proteína de la fase aguda que se sabe que está asociada con una mayor mortalidad en pacientes sépticos. Curiosamente, la PTX3 se acumuló como un octámero debido a la formación de enlaces disulfuro, sobre todo en corazones, aortas, riñones y pulmones. Los restos octaméricos y tetraméricos de la PTX3 también fueron detectables en el plasma. Por primera vez, los niveles circulantes de monómeros, tetrámeros y octámeros de PTX3 se cuantificaron en pacientes sépticos (n=31).

Por lo tanto, para validar nuestros hallazgos, proporcionamos un ejemplo de la invención practicada en pacientes sépticos en cuidados intensivos (ICU). Al ingreso a la unidad de cuidados intensivos, se determinaron los niveles de PTX3 octamérica, tetramérica y monomérica en todos los pacientes. Durante un período de tiempo de 11 días, se supervisó la reducción de la PTX3 octamérica a su forma monomérica y se encontró que estaba asociada con una mayor supervivencia después de 28 días de seguimiento. Por ejemplo, en el día 2 posterior al ingreso, la PTX3 octamérica era indetectable en los sobrevivientes, pero aún constituía más de la mitad de la PTX3 total en los no sobrevivientes ($P<0,001$). Los niveles de PTX3 tetramérica fueron similares en los dos grupos. La PTX3 monomérica se asoció inversamente con marcadores de daño cardíaco como el NT-proBNP, la troponina I y T de alta sensibilidad.

Por lo tanto, demostramos que, en comparación con la medición convencional de la PTX3 total en la técnica, la evaluación del estado de oxidación de la PTX3 proporciona un predictor superior del resultado de la enfermedad en pacientes sépticos.

Materiales y métodos

Materiales

Los anticuerpos que reconocen la pentraxina 3 (PTX3) provenían de Epitomics, la proteína Lim del músculo (MLP) fue un obsequio de la Dra. Elisabeth Ehler del King's College London, la proteína 72 que contiene un motivo tripartito (TRIM72) fue de Aviva Systems Biology, la proteína de repetición de la anquirina cardíaca (CARP) era de Novus Biologicals, la repetición de anquirina y la proteína 2 de caja SOCS (ASB2) era de Abcam, la α-actinina era de Sigma, la proteína de unión a la miosina cardíaca C (cMyBP-C) fue un regalo amable del profesor Mathias Gautel del King's College Londres, la teletonina era de Santa Cruz Biotechnology, el GAPDH conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) era de Abcam. Todos los demás productos químicos fueron de Calbiochem, Invitrogen, Sigma-Aldrich o VWR International, a menos que se indique de cualquier otra manera. Se obtuvieron ratones machos C57BL/6J de B&K Universal Ltd.

Modelos animales

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las regulaciones del Ministerio del Interior del Reino Unido y la investigación se ajusta a la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Publicación NIH Núm. 85-23 revisada en 1996). Los ratones C57/BL6 fueron inyectados con 9 mg/kg del lipopolisacárido bacteriano de *Escherichia coli* (LPS; serotipo 0.11:B4, Sigma Aldrich, Reino Unido) o un volumen equivalente de solución salina y sacrificado 6-8 horas más tarde.

Preparación de homogeneizados de tejidos.

Los corazones control y sépticos u otros tejidos (aorta, riñón, bazo, hígado, pulmón, músculo, cerebro) se extirparon y se lavaron brevemente en solución de Tyrode helada (pH 7,4) que contiene 130 mmol/l de NaCl, 5,4 mmol/l de KCl, 1,4 mmol/l de $MgCl_2$, 0,4 mmol/l de NaH_2PO_4, 4,2 mmol/l de HEPES para eliminar la sangre. El tejido se congeló rápidamente en nitrógeno líquido, antes de la homogeneización mediante el uso de una cuchilla accionada por motor 'sobre hielo' en un tampón de homogeneización basado en Tris (pH 7,4) que contiene 100 mmol/l de Tris/HCl, 100 mmol/l de EDTA, 100 mmol/l de maleimida e inhibidores de proteasa (Roche), en una relación de 100 mg/ml (10 %). Se añadió tampón de muestra Laemmli con 10 % de β-mercaptoetanol (reductor) o 100 mmol/l de maleimida (no reductor) a los homogeneizados de tejido y las muestras se pasaron a través de una aguja de calibre estrecho para cortar el ADN.

Subfraccionamiento de corazones de ratón

Los homogeneizados de corazón de ratón se subfraccionaron en fracciones solubles en Tritón e insolubles en Tritón. Brevemente, se añadió Triton X-100 al 1 % (v/v) a los homogeneizados de corazón de ratón y se incubó durante 15 minutos en una plataforma de agitación a 4 °C y se centrifugó a 13 000 g durante 5 minutos (4 °C). La fracción soluble en Tritón se separó de la fracción insoluble en Tritón, y se añadió tampón de muestra de Laemmli no reductor.

Análisis de proteómica

Después de la separación por SDS-PAGE, se usó la tinción de plata para la banda. Para garantizar una carga equitativa en cada experimento de LC-MS/MS, se extirpó todo el carril de gel y se sometió a digestión en gel con tripsina mediante el uso de un sistema de digestión robótica Investigator ProGest (Genomic Solutions). Los péptidos trípticos se separaron en un sistema LC nanoflujo y se eluyeron con un gradiente de 80 minutos (10-25 % de B en 35 minutos, 25-40 % de B en 5 minutos, 90 % de B en 10 minutos y 2 % de B en 30 minutos donde A=2 % de ACN, 0,1 % de ácido fórmico en HPLC H_2O y B = 90 % de ACN, 0,1 % de ácido fórmico en HPLC H_2O). La columna se acopló a una fuente de nanopulverización (Picoview). Los espectros se recogieron de un analizador de masas con trampa de iones (LTQ Orbitrap XL, ThermoFisher Scientific) mediante el uso del modo completo de exploración de iones en el intervalo de masa a carga (m/z) de 450-1600. La MS/MS se realizó en los seis iones superiores en cada exploración de MS mediante el uso del modo de adquisición dependiente de datos con la exclusión dinámica habilitada. Las listas

de picos de MS/MS se generaron por extract_msn.exe y se combinaron con la base de datos del ratón (UniProtKB/Swiss-Prot) mediante el uso del SEQUEST v.28 (rev. 13), (Bioworks Browser 3.3.1 SP1, ThermoFisher Scientific) y X! Tándem, (Versión 2007.01.01.2). La carboxiamidometilación de la cisteína se eligió como modificación fija y la oxidación de la metionina como modificación variable. La tolerancia de masa se estableció en 1,5 AMU para los iones precursores y en 1,0 AMU para los iones fragmentados. Se permitieron dos cortes perdidos.

La SDS-PAGE y el análisis de inmunotransferencia

La SDS-PAGE y el análisis de inmunotransferencia se llevaron a cabo como se describió previamente (Haworth y otros 2000), mediante el uso de anticuerpos para proteínas totales, como se indica. Brevemente, las muestras de proteínas de homogeneizados de tejidos, los homogeneizados fraccionados o muestras de plasma en tampón de muestra Laemmli reductor o no reductor se separaron por SDS-PAGE al 7,5, 10 o 15 %, se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y se sometieron a inmunotransferencia. Los anticuerpos primarios se detectaron mediante anticuerpos secundarios de burro anti-conejo u oveja anti-ratón vinculados a la peroxidasa de rábano picante (HRP; GE Healthcare). Se detectaron bandas de proteínas específicas mediante la quimioluminiscencia mejorada (GE Healthcare) y se cuantificaron en un densitómetro calibrado (GS-800, BioRad) mediante el uso del software de análisis en 1-D Quantity One® (v-4.5.1).

La expresión y actividad de la proteína quinasa D/la proteína quinasa C mu en el miocardio: evidencia de regulación mediada por el receptor alfa1-adrenérgico y la proteína quinasa C.

Haworth RS, Goss MW, Rozengurt E, Avkiran M. J Mol Cell Cardiol. 2000 Jun;32(6):1013-23.

Preparación de muestras de plasma de ratón con EDTA.

El plasma en EDTA se recogió de ratones control o tratados con LPS. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 15 minutos a 2000 g a 4 °C para eliminar las células. El sobrenadante resultante es plasma. Se añadió tampón de muestra Laemmli no reductor.

Estudio de diseño y ajuste

Este estudio de cohorte observacional se realizó en 88 camas de una unidad de cuidados intensivos médico-quirúrgicos (ICU) del hospital general universitario. El protocolo del estudio recibió la aprobación ética y se obtuvo el consentimiento informado por escrito del paciente, si era mentalmente competente, o de sus familiares y el procedimiento de consentimiento se completó con el consentimiento retrospectivo. El manejo clínico del paciente fue a discreción de los médicos tratantes. Se incluyeron pacientes consecutivos que cumplieron con la definición de sepsis grave dentro de las primeras 12 horas posteriores al ingreso en la ICU entre mayo y octubre de 2011. La sepsis grave se definió como evidencia de dos o más criterios del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), con infección comprobada o sospechada y al menos una disfunción del sistema de órganos (cardiovascular, respiratorio, renal, hematológico o metabólico). Los criterios de exclusión incluyeron los pacientes menores de 18 años, aquellos con hipogammaglobulinemia congénita, las enteropatías conocidas de pérdida de proteínas, el síndrome nefrótico, las enfermedades hematológicas neoplásicas o proliferativas, aquellos que recibieron la terapia con IgIV en los últimos 3 meses, aquellos que recibieron la terapia con esteroides en dosis altas, que recibieron otras disfunciones inmunes en curso definidas por las comorbilidades APACHE II, pérdida de sangre en curso (definida por requerimiento de transfusión de sangre > 2 unidades/24 períodos) y la enfermedad retroviral. Se obtuvieron muestras de sangre para las mediciones de Ig y FLC diariamente desde el día 1 (ingreso en la ICU) hasta el día 7.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. Crit Care Med. 2003;31:1250-1256

Preparación de las muestras de suero humano.

Se recogió sangre completa de pacientes sépticos en el punto de tiempo indicado. Se permitió que la sangre coagulara dejándola intacta a temperatura ambiente durante 15-30 minutos. El coágulo se eliminó mediante centrifugación a 2000 g durante 10 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación, el suero se transfirió inmediatamente a un tubo de polipropileno limpio y se almacenó a -80 °C.

Eliminación de la albúmina sérica del suero humano

Las muestras de suero se incubaron con Blue Sepharose® CL-6B (50 µl por 200 µl de suero) a 4 °C durante 1 hora en una plataforma de agitación para eliminar la albúmina del suero. Las muestras se centrifugaron a 1000 g durante 1 minuto a 4 °C para eliminar las perlas de Blue Sepharose® CL-6B, se añadió tampón de muestra Laemmli no reductor y se realizó un análisis de inmunotransferencia western.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

El NT-proBNP y el hsTnT se determinaron mediante el inmunoensayo de electroquimioluminiscencia sandwich ECLIA en un sistema Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Alemania) en muestras de suero de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El intervalo de ensayo para el NT-proBNP fue de 5-35 000 pg/ml, el intervalo de ensayo para el hsTnT fue de 3-10 000 pg/ml.

el hsTnI se determinó mediante un ensayo de la troponina cardíaca (inmunoensayo de troponina I altamente sensible ARCHITEKT STAT, Abbott Diagnostics, Estados Unidos, ARCHITECT i2000SR). El límite de detección establecido (LoD) para el análisis varía de 0,8 a 1,9 con una mediana de 1,5 pg/ml y un intervalo de análisis de 0-50 000 pg/ml.

Estadística

Los niveles de PTX3 monomérica, tetramérica y octamérica en los pacientes ingresados en la ICU no se distribuyeron normalmente. Por lo tanto, usamos la mediana y el rango intercuartil para resumir sus distribuciones y se usó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para evaluar formalmente las diferencias entre los participantes que sobrevivieron al período de seguimiento de 28 días y los que no lo hicieron. Se usaron métodos análogos para los biomarcadores NT-proBNP hsTnT y hsTnI. Los análisis se realizaron mediante el uso de la versión 12.1 de Stata (StataCorp, College Station, Texas). Las pruebas estadísticas fueron de dos lados y usaron un nivel de significancia de $P < 0,05$.

Ejemplo 1: Análisis de proteómica en un modelo de ratón de sepsis.

Como un tejido susceptible a la disfunción inducida por la sepsis, se aislaron los corazones de ratones control o sépticos 6-8 horas después de la inyección de la solución salina como vehículo o el lipopolisacárido (LPS; 9 mg/kg ip). Las secciones de los tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina. Una imagen microscópica representativa se muestra en **la Figura 1A (Panel superior).** La infiltración de macrófagos se detectó mediante la inmunotinción dentro de las 6-8 horas posteriores a la inyección (**panel inferior**). El proteoma cardíaco (n=4 por grupo) se subfraccionó en función de la solubilidad de la proteína en Tritón al 1 %. La fracción insoluble en Tritón se separó por SDS-PAGE; todo el carril se dividió en una serie de bandas de gel; y el análisis proteómico se realizó en cada uno de ellos con un espectrómetro de masas en tándem de alta precisión de masa (LTQ Orbitrap XL, ThermoFisher Scientific). Las proteínas expresadas diferencialmente se destacan en la **Tabla 1.**

Tabla 1. Expresión diferencial de proteínas en corazones sépticos. Los corazones de ratones C57Bl6 control o tratados con LPS se fraccionaron mediante el uso de Triton X-100 al 1 %, se separaron en un gel 1D y se identificaron por LC-MS/MS. La abundancia se estimó en función del conteo del espectro normalizado. Se usó un límite de corte un enriquecimiento de 1,5 veces o una reducción de -1,5 veces (ver Figura 1B).

Uniprot	Localización	logFC	PromExpr	t	Valor de p
Regulado positivamente					
PTX3_RATÓN	Pentraxina 3	9,063029	1,921067	12,24959	6,03E-08
ITIH2_RATÓN	Inhibidor de la alfa-tripsina de cadena pesada H2	4,28346	1,380459	4,180585	0,001398
IIGP1_RATÓN	GTPasa 1 inducible por interferón	4,141988	2,945678	4,629279	0,00065
ABRA_RATÓN	Proteína activadora Rho que se une a la actina	3,320944	1,196867	3,208899	0,007899
RT34_RATÓN	Proteína S34 ribosomal 28S, mitocondrial	3,316714	1,58304	5,213508	0,00025
GBP5_RATÓN	Proteína 5 de unión a guanilato	3,275107	1,405463	3,299435	0,006701
SPA3N_RATÓN	Inhibidor A3N de la serino proteasa	3,113453	1,150328	2,870257	0,014639
RALB_RATÓN	Proteína Ral-B relacionada con Ras	3,10062	1,147349	3,447412	0,005127
SLFN5_RATÓN	Miembro 5 de la familia Schlafen	3,084478	1,240669	6,422555	4,02E-05
ICAM1_RATÓN	Molécula de adhesión intercelular 1	2,864525	1,090218	4,216975	0,001313
GBP2_RATÓN	Proteína 2 de unión a guanilato inducida por interferón	2,775832	2,204718	3,742521	0,00302
IBP7_RATÓN	Proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	2,757344	1,256881	3,169481	0,008486
PPIB_RATÓN	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B	2,713455	1,346745	2,967725	0,012255
PYGB_RATÓN	Glicógeno fosforilasa, forma cerebral	2,673938	3,139724	3,315755	0,006506
PDIA3_RATÓN	Proteína disulfuro-isomerasa A3	2,647987	3,211363	5,075254	0,000312

PERM_RATÓN	Mieloperoxidasa	2,572686	1,206879	2,809469	0,016354
CRIP2_RATÓN	Proteína 2 rica en cisteína	2,528019	2,666509	3,143685	0,008894
HBB1_RATÓN	Subunidad beta-1 de hemoglobina	2,40557	3,221641	3,65205	0,003549
SYWC_RATÓN	Triptófano--ARNt ligasa, citoplasmática	2,372679	1,717561	2,656368	0,021608
DDX3Y_RATÓN	ARN-dependiente de ATP helicasa DDX3Y	2,350304	2,446327	2,456994	0,031001
DNJC7_RATÓN	Miembro 7 de la subfamilia C homóloga a DnaJ	2,292453	1,633601	3,159826	0,008636
SFRS3_RATÓN	Factor 3 de empalme rico en serina/arginina	2,26317	2,322341	3,422948	0,005359
C560_RATÓN	Subunidad b560 del citocromo succinato deshidrogenasa, mitocondrial	2,219717	2,305071	3,443866	0,00516
GLGB_RATÓN	Enzima ramificante 1,4-alfa-glucano	2,169217	1,317813	2,977512	0,012038
GSTP1_RATÓN	Glutatión S-transferasa P1	2,13899	1,093613	2,597789	0,024033
PPAC_RATÓN	Fosfotirosina proteína fosfatasa de bajo peso molecular	2,112521	0,870553	2,838255	0,015518
TPPC9_RATÓN	Subunidad 9 del complejo de proteína de tráfico de partículas	2,079614	0,956314	2,393772	0,034736
GDIA_RATÓN	Inhibidor alfa de disociación Rab GDP	2,022528	1,463353	2,672549	0,020982
PLSB_RATÓN	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 1, mitocondrial	2,008347	1,048152	2,573757	0,025103
TBB2A_RATÓN	Cadena 2A de la tubulina beta	1,986439	1,547451	3,064915	0,010265
BAT3_RATÓN	Proteína grande rica en prolina BAG6	1,973305	1,13254	2,492477	0,029079
SIRT2_RATÓN	Proteína sirtuina 2 desacetilasa dependiente de NAD	1,968192	1,920829	3,285651	0,006871
ANKR1_RATÓN	Proteína 1 que contiene el dominio de repetición de anquirina	1,914626	4,458796	3,068766	0,010194
CC90A_RATÓN	Proteína 90A que contiene el dominio de bobina en espiral, mitocondrial	1,905284	2,543981	2,224303	0,047014
RAD_RATÓN	Proteína RAD de unión a GTP	1,887582	2,355275	2,74624	0,01835
TRI72_RATÓN	Proteína 72 que contiene un motivo tripartito	1,883336	4,389895	2,631353	0,022613
PYGM_RATÓN	Glicógeno fosforilasa, forma muscular	1,851731	3,856654	3,039272	0,010757
MVP_RATÓN	Proteína de bóveda principal	1,802701	2,639078	2,540931	0,02664
RALA_RATÓN	Proteína Ral-A relacionada con Ras	1,794168	1,359501	2,252158	0,044744
LEG1_RATÓN	Galectina-1	1,794033	2,895016	2,700122	0,019956
CSRP3_RATÓN	Proteína 3 rica en cisteína y glicina	1,752936	3,495756	3,279577	0,006947
HNRDL_RATÓN	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea tipo D	1,74135	1,857464	2,442683	0,031811
ATPB_RATÓN	Subunidad beta de la ATP sintasa, mitocondrial	1,715768	7,570634	3,631231	0,003684
ATPO_RATÓN	Subunidad O de la ATP sintasa, mitocondrial	1,699623	5,352927	3,697727	0,003271
THIO_RATÓN	Componente E2 del complejo alfa-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada	1,688882	1,724717	2,294025	0,041528

ODB2_RATÓN	Componente lipoamida aciltransferasa del complejo alfa-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, mitocondrial	1,661322	3,602847	2,821139	0,01601
PP1B_RATÓN	Subunidad catalítica PPi-beta de la proteína fosfatasa serina/treonina	1,658211	3,791152	2,193562	0,049646
RAB2A_RATÓN	Proteína Rab-2A relacionada con Ras	1,648191	2,781973	2,47408	0,03006
RU2A_RATÓN	Ribonucleoproteína A' nuclear pequeña U2	1,647417	2,387071	2,293241	0,041586
CH60_RATÓN	Proteína de shock térmico de 60 kDa, mitocondrial	1,644238	4,490451	3,30482	0,006636
CC001_RATÓN	Proteína 1 translocasa que contiene el dominio de la membrana mitocondrial interna	1,642665	2,576589	2,528974	0,027222
ELAV1_RATÓN	Proteína 1 tipo ELAV	1,62906	3,386151	2,405814	0,033993
RL36_RATÓN	Proteína L36 ribosomal 60S	1,625145	2,176585	2,568856	0,025327
AAKG1_RATÓN	Subunidad gamma 1 de la proteína quinasa activada por AMP 5'	1,620434	2,57841	2,301968	0,040944
HSPB1_RATÓN	Proteína de shock térmico beta-1	1,608841	3,561607	2,359591	0,036933
EHD2_RATÓN	Proteína 2 que contiene el dominio EH	1,584704	3,329925	2,777656	0,01733
TMM65_RATÓN	Proteína 65 de transmembrana	1,562512	2,428869	2,563244	0,025585
RRFM_RATÓN	Factor de reciclaje de ribosomas, mitocondrial	1,544207	2,059405	2,219951	0,047378
DCTN4_RATÓN	Subunidad 4 de dinactina	1,535688	2,547558	2,43364	0,032333
ODO2_RATÓN	Componente E2 del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa	1,522302	4,143902	2,244968	0,04532
TBA1B_RATÓN (+1)	Cadena alfa-iB de la tubulina	1,51676	3,803447	2,200976	0,048999
Regulado negativamente					
HCC1_RATÓN	Ribonucleoproteína que contiene el dominio SAP	-1,54265	2,859529	-2,62194	0,023002
RLA2_RATÓN	Proteína P2 acídica ribosomal 6oS	-1,58225	3,870575	-2,98175	0,011946
AKAP1_RATÓN	Proteína 1 de anclaje a la quinasa A, mitocondrial	-1,60944	3,02377	-2,30987	0,04037
KAPo_RATÓN	subunidad reguladora de la proteína quinasa tipo I-alfa dependiente de AMPc	-1,61537	3,340021	-2,19376	0,049629
PURA_RATÓN	Proteína Pur-alfa activadora de la transcripción	-1,61727	2,080311	-2,54321	0,02653
RS17_RATÓN	Proteína S17 ribosomal 4oS	-1,62322	3,544121	-3,16273	0,008591
YBOX1_RATÓN	Proteína 1 de unión a elementos sensible a la nucleasa	-1,65283	4,09328	-3,05528	0,010447
COFA1_RATÓN	Cadena alfa-i(XV) de colágeno	-1,66057	4,313515	-2,72665	0,019016
PRDBP_RATÓN	Proteína de unión a la proteína quinasa C delta	-1,66488	2,765078	-2,60061	0,02391
SRPK2_RATÓN	Proteína quinasa 2 SRSF	-1,66611	2,428824	-2,79548	0,016776

DNJA4_RATÓN	Miembro 4 de la subfamilia A homóloga a DnaJ	-1,67244	2,993511	-2,55846	0,025808
MLRA_RATÓN	Cadena ligera 2 reguladora de miosina, isoforma auricular	-1,68896	3,041863	-2,41781	0,033267
CHCH6_RATÓN	Proteína 6 que contiene el dominio helicoidal-enrollado en espiral-helicoidal enrollado en espiral, mitocondrial	-1,71979	2,264609	-2,40108	0,034283
HXK2_RATÓN	Hexoquinasa 2	-1,74597	4,863042	-2,74344	0,018444
PGM2_RATÓN	Fosfoglucomutasa-2	-1,75201	2,171081	-2,46438	0,030591
DNJA2_RATÓN	Miembro 2 de la subfamilia A homóloga a DnaJ	-1,77878	2,470372	-2,42178	0,033031
PRS7_RATÓN	Subunidad 7 reguladora de proteasa 26S	-1,80484	2,23257	-2,2631	0,043881
MLF1_RATÓN	Factor 1 de leucemia mieloide	-1,83893	1,953055	-2,32926	0,038995
RS26_RATÓN	Proteína S26 ribosomal 40S	-1,85861	2,687074	-3,24474	0,007401
DUS28_RATÓN	Fosfatasa 28 de especificidad dual	-1,8606	1,927575	-2,60552	0,023698
DAG1_RATÓN	Distroglicano	-1,86378	2,593578	-2,19671	0,04937
CDIPT_RATÓN	CDP-diacilglicerol--inositol 3-fosfatidiltransferasa	-1,87217	1,750954	-3,28279	0,006907
NDUV3_RATÓN	Flavoproteína 3 NADH deshidrogenasa [ubiquinona], mitocondrial	-1,88956	2,536157	-2,50173	0,028597
ACAP2_RATÓN	Proteína 2 Arf-GAP con espiral enrollada que contiene el dominio PH y la repetición de ANK	-1,96254	1,178296	-2,27197	0,043193
SNX2_RATÓN	Nexina 2 de clasificación	-1,97113	2,207351	-2,7913	0,016904
ZN294_RATÓN	Proteína listerina ligasa de ubiquitina E3	-1,97605	1,634662	-2,72192	0,01918
TM201_RATÓN	Proteína 201 de transmembrana	-1,98226	2,204376	-2,74916	0,018253
TOP3B_RATÓN	Topoisomerasa 3-beta-1 de ADN	-1,98359	1,526997	-2,31034	0,040336
SMTN_RATÓN	Smoothelin	-1,98701	2,778145	-2,2469	0,045164
TXLNB_RATÓN	Taxilina beta	-2,00704	2,889618	-2,64548	0,02204
DAAM1_RATÓN	Activador 1 de la morfogénesis asociado al desorden	-2,03408	1,57191	-2,6175	0,023189
DYHC1_RATÓN	Dineína 1 citoplasmática de cadena pesada 1	-2,0515	1,136713	-2,44338	0,031771
PLAP_RATÓN	Proteína de activación de la fosfolipasa A-2	-2,09866	1,11626	-2,96048	0,012418
K0774_RATÓN	Homólogo del candidato 2 supresor tumoral asociado a microtúbulos	-2,11729	1,940026	-2,43367	0,032331
Proteína BZW2_RATÓN	Proteína 2 que contiene el dominio de cremallera de leucina básica y W2	-2,13847	2,000364	-3,31545	0,00651
ARP2_RATÓN	Proteína 2 relacionada con actina	-2,14339	3,164004	-3,18823	0,008201
EFTS_RATÓN	Factor de elongación Ts, mitocondrial	-2,18372	0,950261	-3,1338	0,009055
VWA1_RATÓN	proteína 1 que contiene el dominio del factor A de von Willebrand	-2,21693	2,279927	-3,52397	0,004466
MTA1_RATÓN	Proteína MTA1 asociada a metástasis	-2,21815	2,377727	-2,34397	0,037982
EIF3I_RATÓN	Factor 3 de iniciación de la traducción eucariota subunidad I	-2,22458	2,134371	-2,6169	0,023214
THOP1_RATÓN	Oligopeptidasa Thimet	-2,22799	2,42128	-2,20749	0,048436

DRG1_RATÓN	Proteína 1 de unión a GTP regulada por el desarrollo	-2,28186	2,996228	-4,211	0,001326
PKHA6_RATÓN	Miembro 6 de la familia A que contiene el dominio de homología de Pleckstrina	-2,33883	2,720331	-2,59509	0,02415
CA077_RATÓN	Amigo de la proteína PRMT1	-2,35968	1,618213	-2,50869	0,028239
RHEB_RATÓN	Proteína Rheb de unión a GTP	-2,45239	1,861274	-3,09452	0,009726
EEPD1_RATÓN	Proteína 1 que contiene el dominio de la familia de endonucleasa/exonucleasa/fosfatasa	-2,76507	0,906446	-4,05579	0,001737
MTUS1_RATÓN	Homólogo de supresor tumoral 1 asociado a microtúbulos	-2,85345	2,091359	-4,07352	0,001684
ASB2_RATÓN	Proteína 2 de caja SOCS y de repetición de anquirina	-3,02373	1,919678	-3,61828	0,00377
5NTD_RATÓN	nucleotidasa-5'	-3,41014	2,035405	-3,22299	0,007699

El cambio más pronunciado después de la inyección de LPS se observó para la pentraxina 3 larga **(Figura 1B,** la PTX3; cambio de pliegue 9,06, valor p= 6,03E-08), una glicoproteína de la fase aguda, secretada por una variedad de células y tejidos en respuesta a las citocinas proinflamatorias,[8] seguido del inhibidor de alfa-tripsina de cadena pesada H2 (ITIH2_RATÓN; cambio de pliegue 4,28; valor de p=0,001), un ligando conocido de la PTX3.

Ejemplo 2: Validación por inmunotransferencia.

Se realizó inmunotransferencia para la confirmación independiente de los datos de proteómica **(Figura 1C**). Las transferencias Western demostraron un aumento marcado de la PTX3 en los extractos de corazón de ratón insolubles en Triton en condiciones sépticas **(Figura 1D).** Además, se confirmaron las diferencias de las proteínas intracelulares, tal como la proteína Lim del músculo (MLP), la proteína 72 que contiene un motivo tripartito (TRIM72) y la proteína de repetición de la anquirina cardíaca (CARP). La carga equitativa de proteína se demostró mediante la inmunotransferencia para la α-actinina y la proteína C de unión a la miosina cardíaca (cMyBP-C) y la tinción de Coomassie.

Ejemplo 3: Estado de oxidación de la PTX3.

La identificación de la PTX3 en la fracción insoluble en Tritón fue inesperada. Las proteínas extracelulares deben solubilizarse en Tritón al 1 %. Por lo tanto, fue muy sorprendente cuando se hizo esta observación.

La PTX3 pertenece a la superfamilia de pentraxina. La PTX3 secretada puede unirse a patógenos para inducir la activación clásica del complemento. En particular, la oligomerización de la PTX3 en complejos tetraméricos y octaméricos a través de la formación de enlaces disulfuro interproteínas a través de los residuos de cisteína adyacentes en las subunidades monoméricas de la PTX3 se describió como un requisito previo para su actividad biológica.[9]

Para investigar más a fondo el enriquecimiento de la PTX3 en el proteoma cardíaco, se compararon las fracciones solubles en Tritón e insolubles en Tritón (n=3 por grupo) de corazones cosechados 6-8 horas después de la inyección de LPS en condiciones reductoras y no reductoras. La efectividad del procedimiento de subfraccionamiento con Tritón al 1 % se confirmó mediante inmunotransferencia para marcadores seleccionados de diferentes compartimientos de cardiomiocitos, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; citosólico) y la teletonina (partículas/miofilamento) **(Figura 2A**). En condiciones reductoras, la PTX3 era claramente detectable como un resto de 45 kDa en corazones con sepsis. La glicosilación ligada a N representa un desplazamiento de 5 kDa de la PTX3 con una masa molecular pronosticada para la proteína reducida de 40 kDa.[10]

El análisis de inmunotransferencia realizado en condiciones no desnaturalizantes reveló que la PTX3 forma complejos de alto peso molecular que resultan en la formación de tetrámeros (180 kDa) y octámeros (360 kDa) (**Figura 2A**).

Mientras tanto el tetrámero como el octámero estaban presentes en la fracción soluble en Tritón, solo se detectó el octámero en la fracción insoluble en Tritón de los corazones con sepsis.

Ejemplo 4: Distribución de la PTX3 oxidada en el tejido.

Se tomaron muestras de homogeneizados de tejido de aorta, riñón, bazo, hígado, pulmón, músculo y cerebro de ratones control o sépticos en condiciones reductoras o no reductoras (**Figura 2B**). Los niveles aumentados de

octámero de PTX3 fueron detectables en el corazón, aorta, pulmón y riñón de ratones sépticos. Los restos de PTX3 de alto peso molecular se convirtieron en monómeros en condiciones reductoras. Por el contrario, no se detectó la proteína PTX3 en homogeneizados de tejido de ratones de control.

En particular, los restos tetraméricos y octaméricos de la PTX3 también fueron detectables en el plasma de ratones sépticos (**Figura 2C**). Esto demuestra que las muestras que comprenden o se derivan de la sangre (suero), tales como las muestras que comprenden plasma, son útiles en la operación de la invención.

Ejemplo 5: PTX3 oxidada circulante en pacientes con sepsis.

Los niveles de PTX3 octamérica, tetramérica y monomérica se cuantificaron en pacientes de sala sépticos en deterioro (n=31) remitidos a los equipos de extensión de la ICU, sin la AOF establecida. Sus características clínicas se muestran en **la Tabla 2**.

Tabla 2. Características clínicas de pacientes con sepsis

Variable	Estudio completo de cohorte (n=31)	Sobrevivientes de 28 días (n=23)	No sobrevivientes de 28 días (n=8)	valor de p
Edad (años)	67,4 (11,9)	66,0 (12,2)	71,0 (12,8)	0,29
Macho: Hembra	19:12 (61,3 %:38,3 %)	15:8 (65,3 %:34,7 %)	4:4 (50,0 %:50,0 %)	0,45
Puntaje APACHE II	20,6 (6,0)	19,3 (6,1)	24,4 (3,7)	0,03
Médico: Quirúrgico	26:5 (83,8 %:16,1 %)	18:5 (78,3 %:21,7 %)	8 (100 %)	0,20
Conteo de WCC	13,5 (1,3, 49,1)	11,3 (1,3, 25,8)	17,8 (11,8, 49,1)	0,04
Conteo de Neutrófilos	11,8 (1,1, 45,2)	9,8 (1,1, 23,3)	16,3 (9,8, 45,2)	0,03
Recuento de linfocitos	0,55 (0,1, 3,9)	0,7 (0,1, 3,9)	0,45 (0,2, 1,5)	0,15
CRP	130 (8,429)	143 (8,429)	115 (29,148)	0,13
SOFA respiratorio	3 (2,4)	3 (2,4)	4(3,4)	0,03
SOFA CVS	4 (0,4)	4 (0,4)	4 (0,4)	0,47
SOFA renal	1 (0,4)	1 (0,4)	0 (0,4)	0,50
SOFA hepático	0 (0,2)	0 (0,2)	0 (0,0)	0,33
SOFA DE COAGULACIÓN	0 (0,4)	0(0,4)	0(0,3)	0,51
SOFA neurológico	0 (0,3)	0(0,3)	0(0,0)	0,55
puntaje t-SOFA	8 (4,12)	8 (2,14)	8 (3,13)	0,98
LOS ICU (días)	9,9 (5,7)	9,5 (6,3)	11 (3,5)	0,23
LOS Hospital (días)	23 (4,216)	30 (7,216)	11 (4,18)	0,001

Se tomaron muestras de suero de manera longitudinal en 8 puntos de tiempo diferentes: el día del ingreso a la ICU (día 0), los días 1 a 6 y el día 11.

El análisis de inmunotransferencia se realizó en condiciones no reductoras.

Los niveles de los diferentes restos de PTX3 oxidados se correlacionaron con la supervivencia de los pacientes (**Figura 3A**). En el día 0, no hubo diferencia en los niveles de PTX3 octamérica, tetramérica y monomérica entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes. Sin embargo, en el transcurso del tiempo de 11 días, una reducción de la PTX3 octamérica a monomérica se asoció con una mayor supervivencia durante el seguimiento de 28 días (**Figura 3B**). Para el día 2 después del ingreso, la oxidación de la PTX3 predijo un resultado clínico adverso: La PTX3 octamérica fue indetectable en los sobrevivientes, pero constituyó más del 50 % del total de PTX3 en los no sobrevivientes (p <0,001, **Figura 3C**). Por otro lado, la PTX3 monomérica constituía el 90 % del total de la PTX3 en los sobrevivientes, pero solo el 20 % en los no sobrevivientes (p<0,013).

No hubo diferencias significativas en la PTX3 tetramérica entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes.

Los niveles de monómero de la PTX3 se correlacionaron inversamente con los marcadores de daño cardíaco de alta sensibilidad troponina I (p=0,001), alta sensibilidad troponina T (p=0,067) y NT-proBNP (p=0,066) (**Figura 4A**).

En comparación, a diferencia de la PTX3 octamérica y monomérica, los marcadores de daño cardíaco no distinguían a los sobrevivientes y a los no sobrevivientes (**Figura 4B**).

Resumen de los Ejemplos.

La AOF en la sepsis es común, asociada con alta mortalidad, morbilidad a corto plazo y enfermedad crónica significativa. Se han identificado muchos biomarcadores, pero carecen de especificidad o sensibilidad. Nuestro enfoque de proteómica basada en los tejidos reveló la PTX3 como la proteína de mayor expresión diferencial. De manera importante, que hicimos la observación novedosa de que la PTX3 circulante estaba presente en su forma octamérica oxidada y que su estado de oxidación podría ser un biomarcador de pronóstico mejor en la sepsis que la PTX $total_3$.

La PTX3 oxidada como biomarcador novedoso.

Junto con la proteína C reactiva (CRP) y la proteína amiloide sérica (SAP), la PTX3 pertenece a la familia de las pentraxinas. Aunque la CRP frecuentemente se usa como marcador de pronóstico en las enfermedades inflamatorias, su valor pronóstico en la sepsis es pobre.[11] Por el contrario, los niveles altos de PTX3 en plasma se correlacionan con la gravedad de la infección en pacientes con sepsis o shock séptico.[12, 13] la PTX3 es apenas detectable en el plasma de individuos sanos (<2 ng/ml). Las personas afectadas muestran 2 ng/ml o más, con aumentos de hasta 200 ng/ml en la sepsis en dependencia de la gravedad de la enfermedad[14]. Por primera vez, cuantificamos los niveles circulantes de la PTX3 monomérica, tetramérica y octamérica en pacientes sépticos. Al ingresar a la ICU, no hubo diferencia entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes. Sin embargo, en el día 2, una reducción de la PTX3 octamérica a la forma monomérica se asoció con mejores posibilidades de supervivencia hasta los 28 días de seguimiento.

Función de la PTX3 oxidada.

La PTX3 juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune innata al contribuir a la opsonización).[15] En ratones, la sobreexpresión de la PTX3 confiere resistencia a los efectos letales de LPS.[16] La inyección de LPS provoca la secreción de varias citocinas, que incluyen la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral alfa, dos potentes inductores de la PTX3. A diferencia de las pentraxinas clásicas la CRP y la SAP, la PTX3 no se une a la fosfoetanolamina ni a la fosfocolina sino al C1q similar al colágeno, el primer componente de la vía clásica de activación del complemento. Su capacidad para unirse a C1q está mediada por el dominio de pentraxina y requiere la formación de multímeros.[10] Como se esperaba sobre la base de la unión de C1q, la PTX3 alta puede causar el consumo de C4 y de la actividad hemolítica del complemento total en suero.[10] Curiosamente, hubo una preponderancia de la forma oxidada frente a la forma reducida de PTX3 con la PTX3 oxidada acumulándose en el corazón, aorta, riñón y pulmón, órganos que se sabe que son susceptibles a las complicaciones sépticas. Se retuvo la PTX3 menos oxidada en el bazo y el hígado. Esto es consistente con informes anteriores de que LPS induce la PTX3 *in vivo* en corazón y pulmón pero no en hígado.[17, 18] A diferencia de las clásicas pentraxinas la CRP y la SAP, la PTX3 no tiene la inducibilidad hepática restringida pero puede ser expresada por una variedad de células en respuesta a los lipopolisacáridos y las citocinas inflamatorias.[19, 20]

Aplicaciones Terapéuticas.

Los mecanismos causales de la AOF no se comprenden bien y no hay disponibles terapias dirigidas a mediadores efectivos de la AOF establecida.[21] Numerosos estudios han probado terapias novedosas que intentan bloquear las etapas clave en los procesos inflamatorios asociados con la AOF. Desafortunadamente, todas estas intervenciones han fallado cuando se probaron en ensayos rigurosos.[22] En consecuencia, a excepción de los antibióticos y el control de la fuente de infección, el manejo actual de la AOF es de apoyo. Actualmente no hay terapias preventivas efectivas disponibles. Las intervenciones antiinflamatorias previas se dirigieron principalmente a las células inflamatorias circulantes o los mediadores inflamatorios, es decir, por diálisis. Esto puede ser insuficiente si la inflamación reside dentro del tejido. La retención observada de la PTX3 oxidada en la fracción insoluble en Tritón y la correlación inversa de la PTX3 monomérica en plasma con marcadores de daño cardíaco apoyan el concepto de que la inflamación y el daño del tejido pueden perpetuarse localmente. Por lo tanto, además de dirigirse a los mediadores circulantes de la inflamación, resolver la inflamación dentro de los tejidos puede ser una estrategia alternativa en la prevención de la AOF.

Por lo tanto, las pruebas de la técnica anterior miden la PTX3 total, mientras que mostramos que el estado de oxidación de la PTX3 es más importante.

Tradujimos con éxito los resultados proteómicos en un modelo de sepsis en ratones a estudios de biomarcadores en pacientes humanos ingresados en la ICU. Proporcionamos una prueba de principio de que los cambios en el estado de oxidación de la PTX3 permiten la identificación de pacientes en riesgo y/o ayuda al pronóstico/predicción del resultado clínico, particularmente el resultado clínico adverso.

Otro beneficio de la invención es que los pacientes con sepsis en riesgo de desarrollar la AOF pueden identificarse temprano, lo que puede ayudar a "personalizar" la medicina de cuidados críticos.

REFERENCIAS

1. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. Nature reviews. Inmunology 2008;8:776-787

2. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. Mol Cell Proteom ics. 2002;1:845-867

3. Anderson L, Hunter CL. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. Mol Cell Proteom ics. 2006;5:573-588

4. Jacquet S, Yin X, Sicard P, Clark J, Kanaganayagam GS, Mayr M, Marber MS. Identification of cardiac myosin-binding protein c as a candidate biomarker of myocardial infarction by proteomics analysis. Mol Cell Proteom ics. 2009;8:2687-2699

5. Mayr M, Zhang J, Greene AS, Gutterman D, Perloff J, Ping P. Proteomics-based development of biomarkers in cardiovascular disease: Mechanistic, clinical, and therapeutic insights. Mol Cell Proteom ics. 2006;5:1853-1864

6. Mayr M, Zampetaki A, Willeit P, Willeit J, Kiechl S. Micrornas within the continuum of postgenomics biomarker discovery. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33:206-214

7. Didangelos A, Stegemann C, Mayr M. The -omics era: Proteomics and lipidomics in vascular research. Atherosclerosis. 2012;221:12-17

8. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: Pentraxins as a paradigm. Annual review of immunology. 2010;28:157-183

9. Inforzato A, Rivieccio V, Morreale AP, Bastone A, Salustri A, Scarchilli L, Verdoliva A, Vincenti S, Gallo G, Chiapparino C, Pacello L, Nucera E, Serlupi-Crescenzi O, Day AJ, Bottazzi B, Mantovani A, De Santis R, Salvatori G. Structural characterization of ptx3 disulfide bond network and its multimeric status in cumulus matrix organization. The Journal of biological chemistry. 2008;283:10147-10161

10. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, Spreafico F, Pausa M, D'Ettorre C, Gianazza E, Tagliabue A, Salmona M, Tedesco F, Introna M, Mantovani A. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin ptx3. Similarities and differences with the short pentraxins c-reactive protein and serum amyloid p component. J Biol Chem. 1997;272:32817-32823

11. Silvestre J, Povoa P, Coelho L, Almeida E, Moreira P, Fernandes A, Mealha R, Sabino H. Is c-reactive protein a good prognostic marker in septic patients? Intensive care medicine. 2009;35:909-913

12. Huttunen R, Aittoniemi J. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and treatment of bacteremia and sepsis. The Journal of infection. 2011;63:407-419

13. Mauri T, Bellani G, Patroniti N, Coppadoro A, Peri G, Cuccovillo I, Cugno M, Iapichino G, Gattinoni L, Pesenti A, Mantovani A. Persisting high levels of plasma pentraxin 3 over the first days after severe sepsis and septic shock onset are associated with mortality. Intensive care medicine. 2010;36:621-629

14. Daigo K, Yamaguchi N, Kawamura T, Matsubara K, Jiang S, Ohashi R, Sudou Y, Kodama T, Naito M, Inoue K, Hamakubo T. The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (ptx3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps. Mol Cell Proteom ics. 2012;11:M111 015073

15. Bottazzi B, Garlanda C, Cotena A, Moalli F, Jaillon S, Deban L, Mantovani A. The long pentraxin ptx3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: Interplay with cellular innate immunity. Immunological reviews. 2009;227:9-18

16. Dias AA, Goodman AR, Dos Santos JL, Gomes RN, Altmeyer A, Bozza PT, Horta MF, Vilcek J, Reis LF. Tsg-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to clp-induced sepsis. Journal of leukocyte biology. 2001;69:928-936

17. Lee GW, Goodman AR, Lee TH, Vilcek J. Relationship of tsg-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins. J Immunol. 1994;153:3700-3707

18. Introna M, Alles VV, Castellano M, Picardi G, De Gioia L, Bottazzai B, Peri G, Breviario F, Salmona M, De Gregorio L, Dragani TA, Srinivasan N, Blundell TL, Hamilton TA, Mantovani A. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. Blood. 1996;87:1862-1872

19. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, Saccone S, Marzella R, Predazzi V, Rocchi M, y otros. Interleukin-i-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to c-reactive protein and serum amyloid p component. The Journal of biological chemistry. 1992;267:22190-22197

20. Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. Inducible expression of ptx3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. Blood. 1994;84:3483-3493

21. Marshall JC. Such stuff as dreams are made on: Mediator-directed therapy in sepsis. Nature reviews. Drug discovery. 2003;2:391-405

22. Sweeney DA, Danner RL, Eichacker PQ, Natanson C. Once is not enough: Clinical trials in sepsis. Intensive care medicine. 2008;34:1955-1960

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro de recopilación de información útil para predecir el resultado clínico en un sujeto, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, el método que comprende proporcionar una muestra de dicho sujeto y determinar el nivel de PTX3 octamérica en dicha muestra, en donde determinar el nivel de la PTX3 octamérica comprende medir la cantidad total de PTX3 presente, y medir la cantidad de PTX3 octamérica presente, y calcular la proporción de PTX3 total que está presente como octámero, en donde si la proporción de PTX3 octamérica es mayor al 50 %, el sujeto se identifica como un posible no sobreviviente.

2. Un método in vitro de recopilación de información útil para predecir el resultado clínico en un sujeto, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, el método que comprende proporcionar una muestra de dicho sujeto y determinar el nivel de PTX3 octamérica en dicha muestra, en donde un nivel elevado de PTX3 octamérica comparado con un nivel de referencia indica una posibilidad reducida de supervivencia.

3. Un método in vitro de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde se determina la relación de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica.

4. Un método in vitro de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde las cantidades de PTX3 monomérica y de PTX3 octamérica se determinan mediante las etapas de a) separar las proteínas en la muestra en condiciones no reductoras; b) determinar las cantidades de PTX3 monomérica y de PTX3 octamérica al cuantificar las cantidades de esas formas de PTX3 como se separan en la etapa (a).

5. Un método in vitro de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la etapa (b) comprende transferir las proteínas separadas a una membrana y cuantificar las cantidades de esas formas de PTX3 en dicha membrana.

6. Un método in vitro de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las cantidades de PTX3 monomérica y de PTX3 octamérica se determinan por espectrometría de masas.

7. Un método in vitro de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha enfermedad inflamatoria es la sepsis, la enfermedad cardiovascular o una enfermedad reumatoide.

8. Un método in vitro de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7 en donde dicho sujeto está experimentando estrés oxidativo en dicha enfermedad inflamatoria.

9. Un método in vitro de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la muestra comprende sangre, suero o plasma.

10. Un método in vitro de acuerdo con la reivindicación 9 en donde la muestra comprende plasma.

11. Un método in vitro de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la medición se repite en un intervalo de tiempo predeterminado.

12. Un método in vitro de acuerdo con la reivindicación 11 en donde dicho intervalo de tiempo es diario.

13. Un método in vitro para supervisar la respuesta de un sujeto al tratamiento, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, que comprende realizar el método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en al menos dos puntos temporales diferentes y comparar los niveles de PTX3 octamérica en esos al menos dos puntos temporales diferentes, en donde observar un nivel decreciente de PTX3 octamérica, o una relación decreciente de PTX3 octamérica a PTX3 monomérica, en el(los) punto(s) temporal(es) posterior(es) indica una respuesta positiva al tratamiento.

14. Un método in vitro de recopilación de información útil para predecir el resultado clínico en un sujeto, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad inflamatoria, el método que comprende proporcionar una muestra de dicho sujeto y determinar el nivel de PTX 3 monomérica en dicha muestra, en donde determinar el nivel de PTX3 monomérica comprende medir la cantidad total de PTX3 presente, y medir la cantidad de PTX3 monomérica presente, y calcular la proporción de PTX3 total que está presente como monómero, en donde si la proporción de PTX3 monomérica es mayor del 90 %, el sujeto se identifica como un probable sobreviviente.

15. Un método in vitro de acuerdo con la reivindicación 14, en donde si la proporción de PTX 3 monomérica es inferior al 20 %, el sujeto se identifica como un probable no sobreviviente.

Figura 1

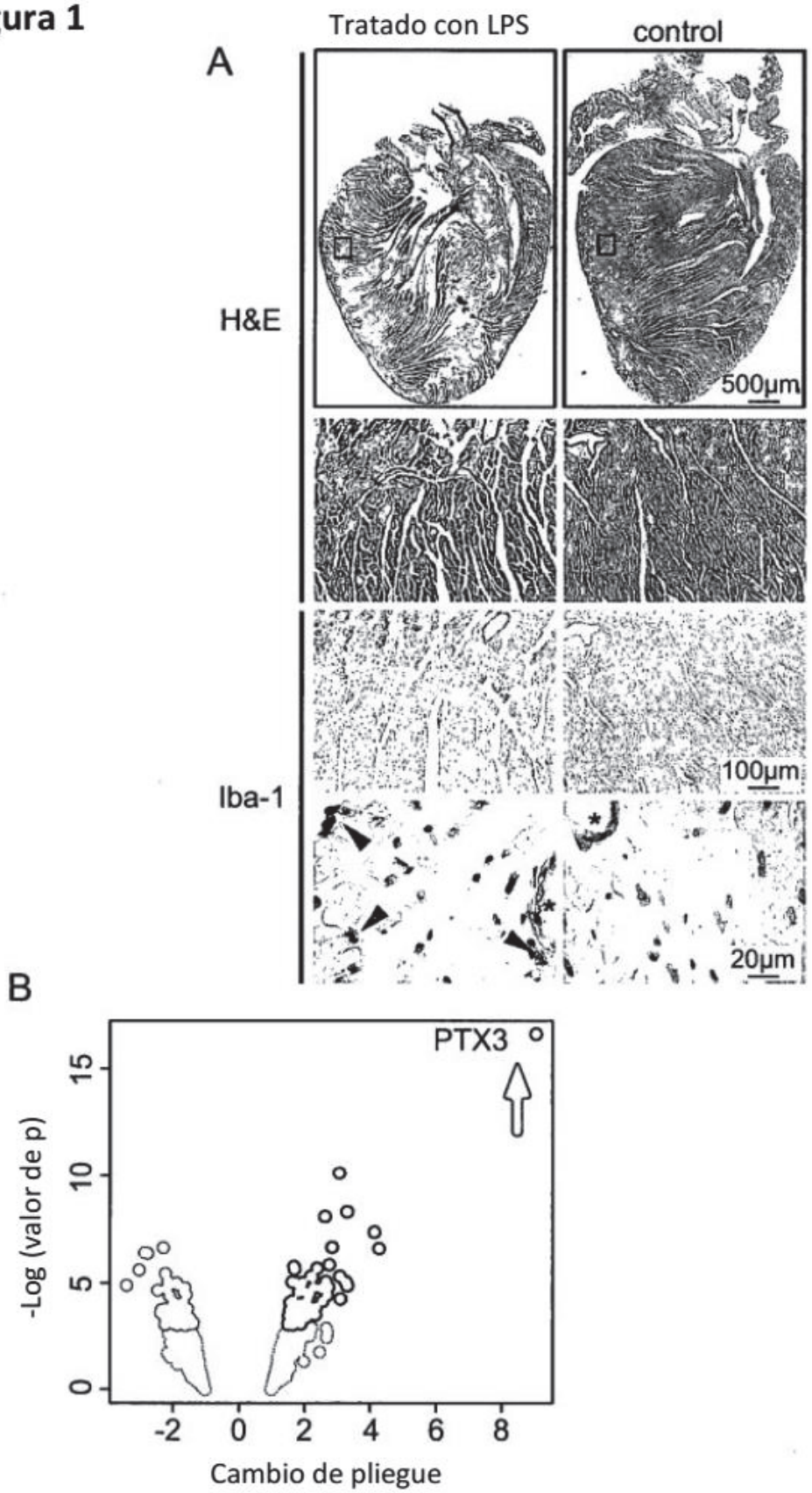

Tratado con LPS
control
A
H&E
500µm
Iba-1
100µm
20µm
B
PTX3
-Log (valor de p)
0
5
10
15
-2
0
2
4
6
8
Cambio de pliegue

Figura 1 continuación

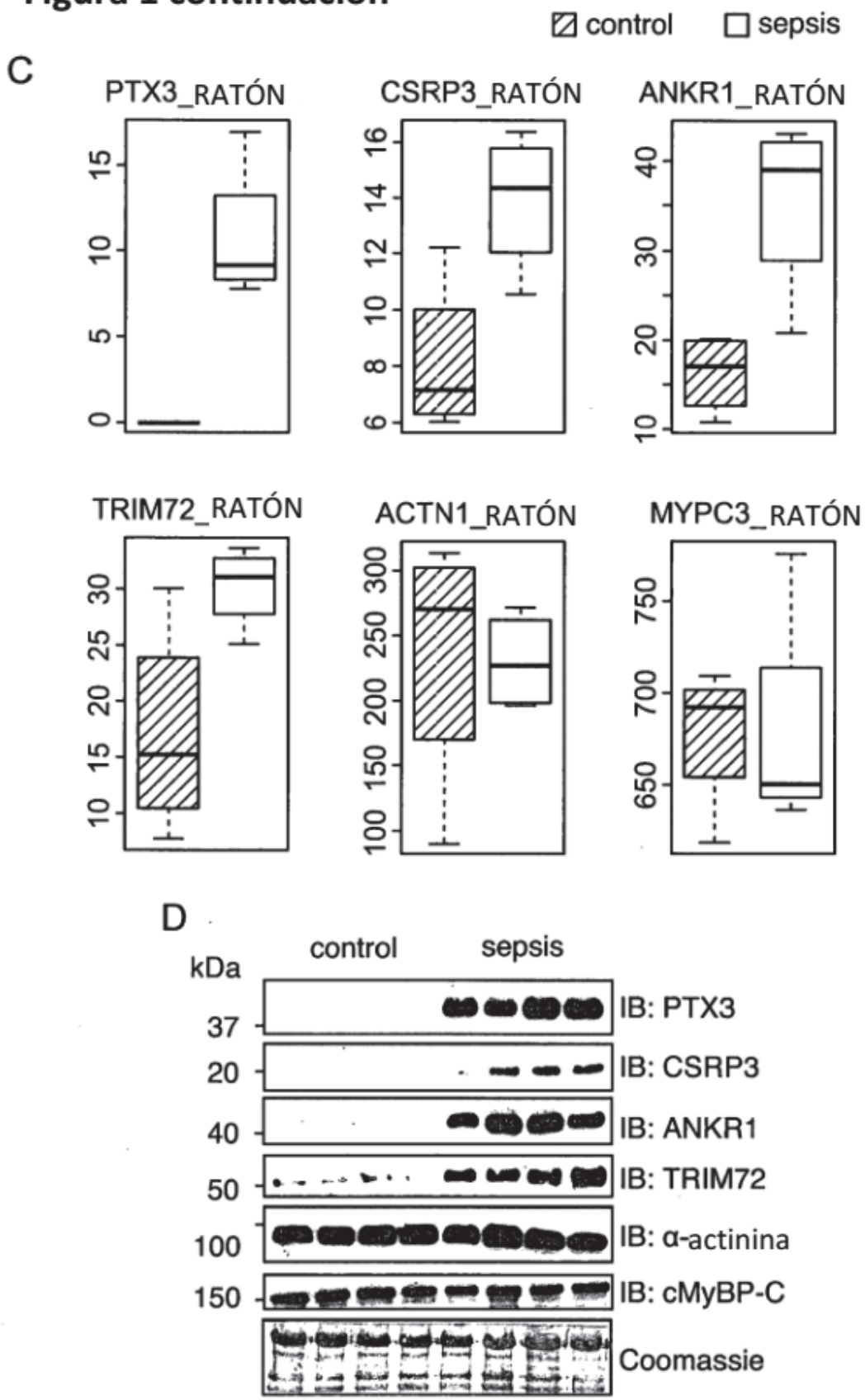


Figura 2

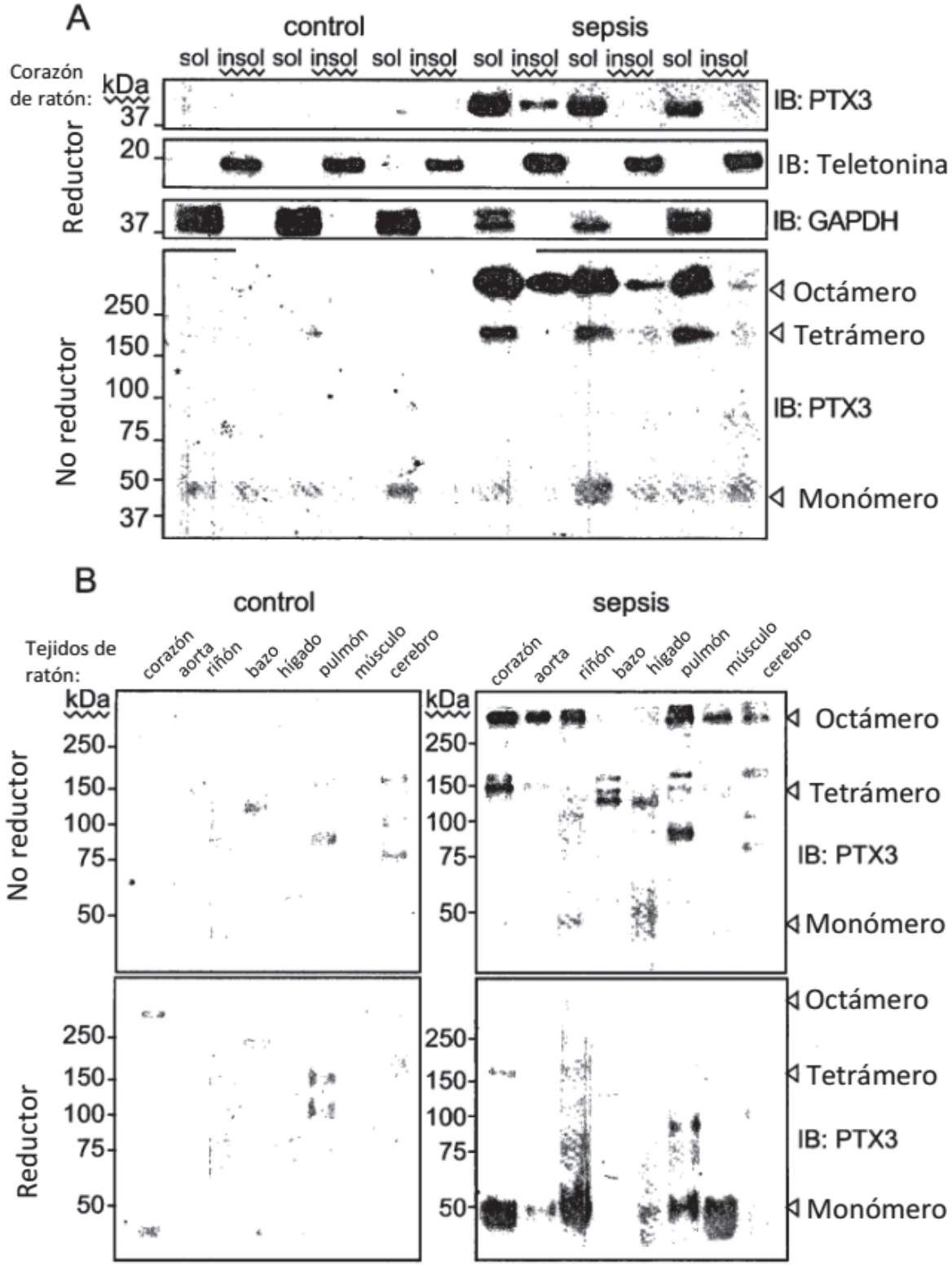

A
control
sepsis
sol insol sol insol sol insol sol insol sol insol sol insol
Corazón de ratón:
kDa
Reductor
37
20
37
IB: PTX3
IB: Teletonina
IB: GAPDH
No reductor
250
150
100
75
50
37
Octámero
Tetrámero
IB: PTX3
Monómero
B
control
sepsis
Tejidos de ratón:
corazón aorta riñón bazo hígado pulmón músculo cerebro
kDa
No reductor
Reductor
250
150
100
75
50
Octámero
Tetrámero
IB: PTX3
Monómero

Figura 2 continuación

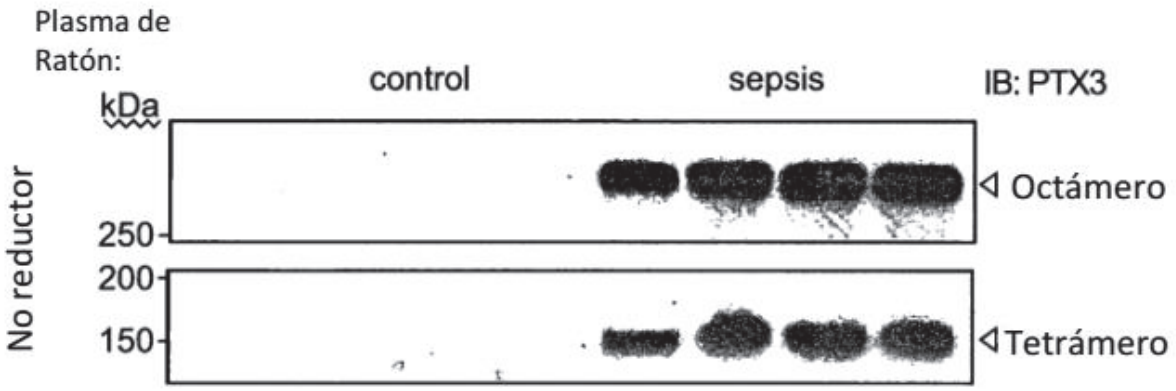


Figura 3

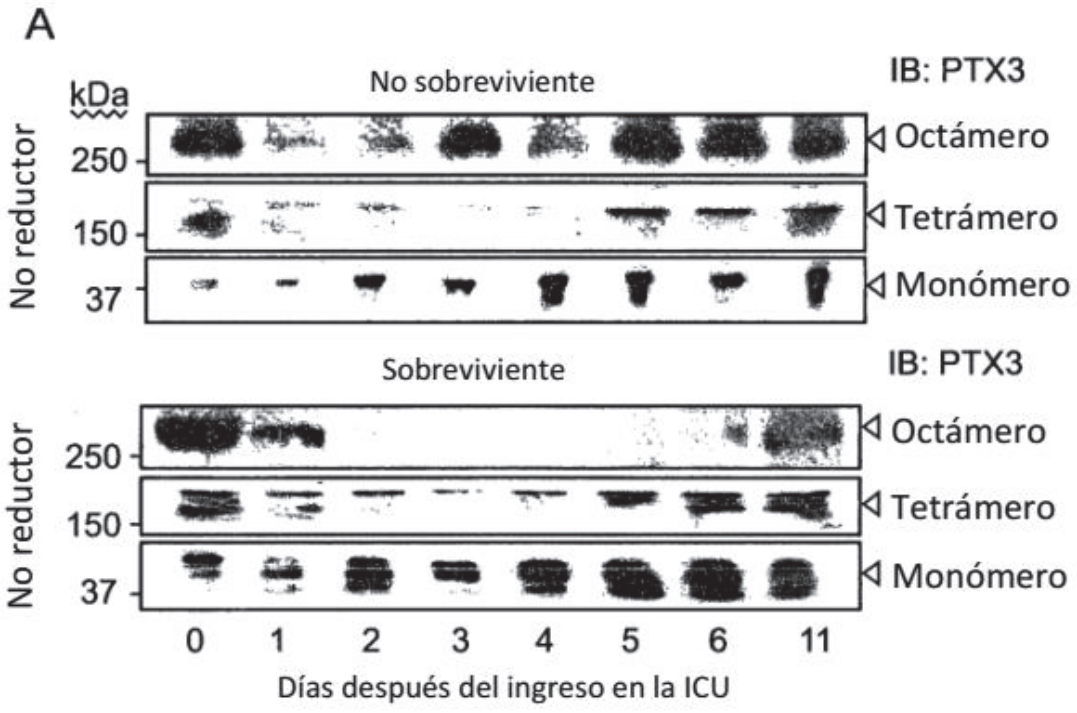


Figura 3 continuación

B

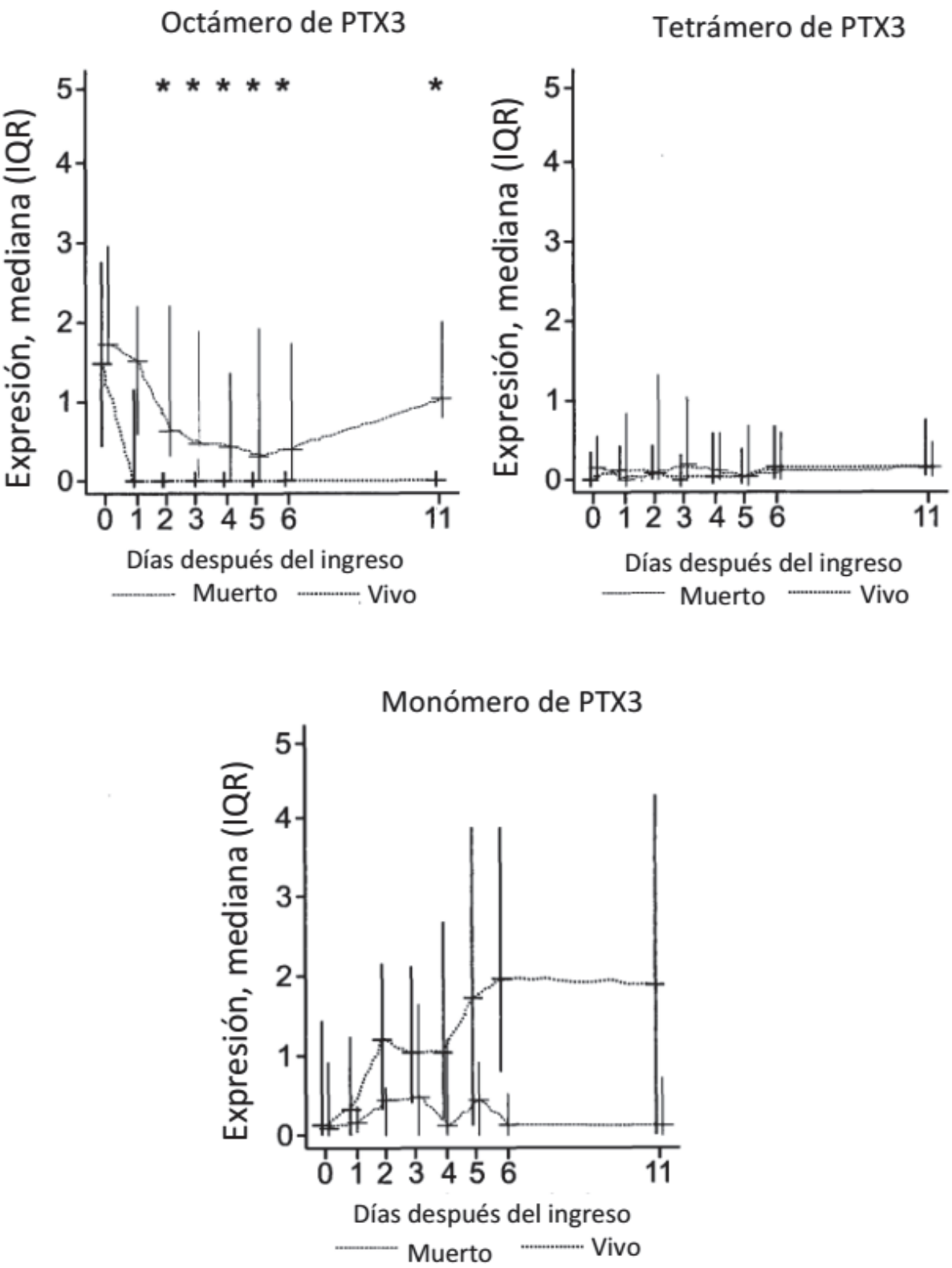
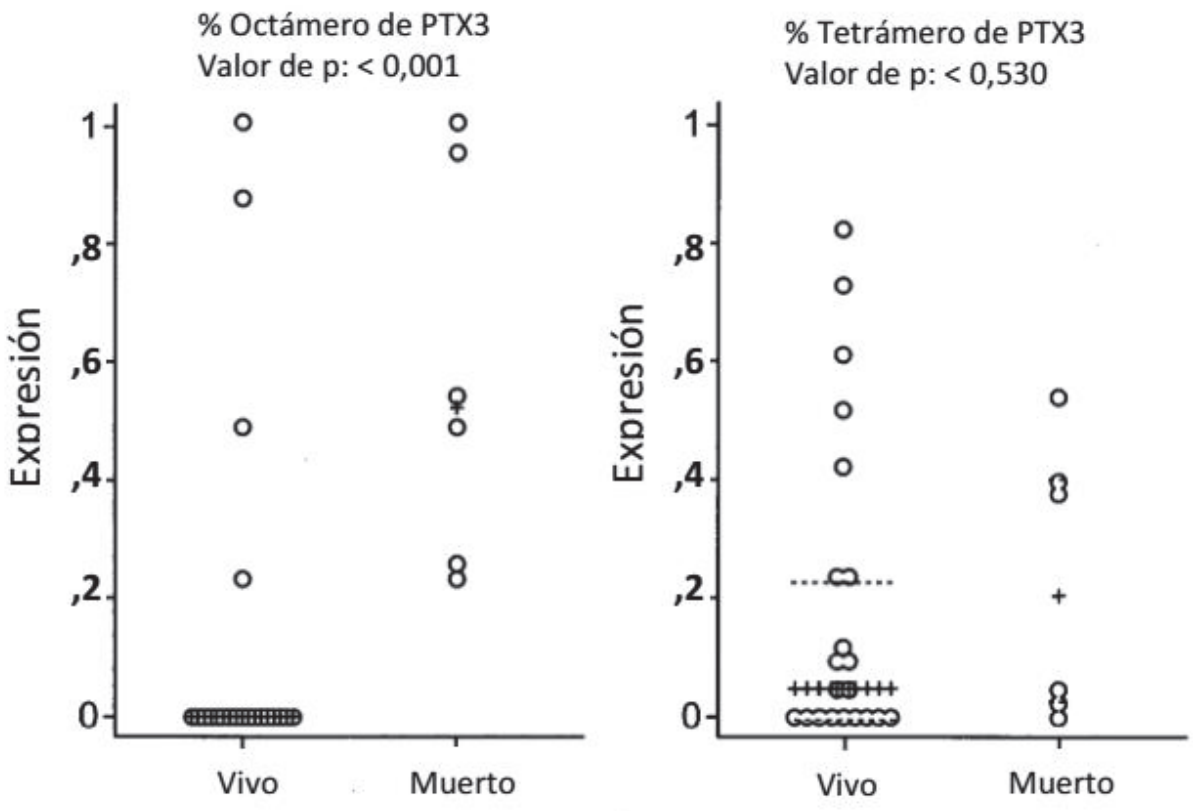


Figura 3 continuación

C



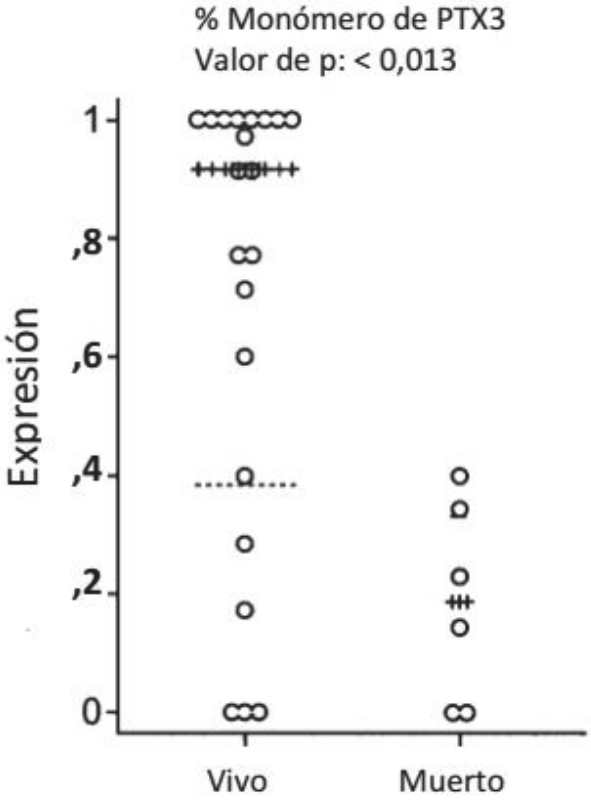


Figura 4

A

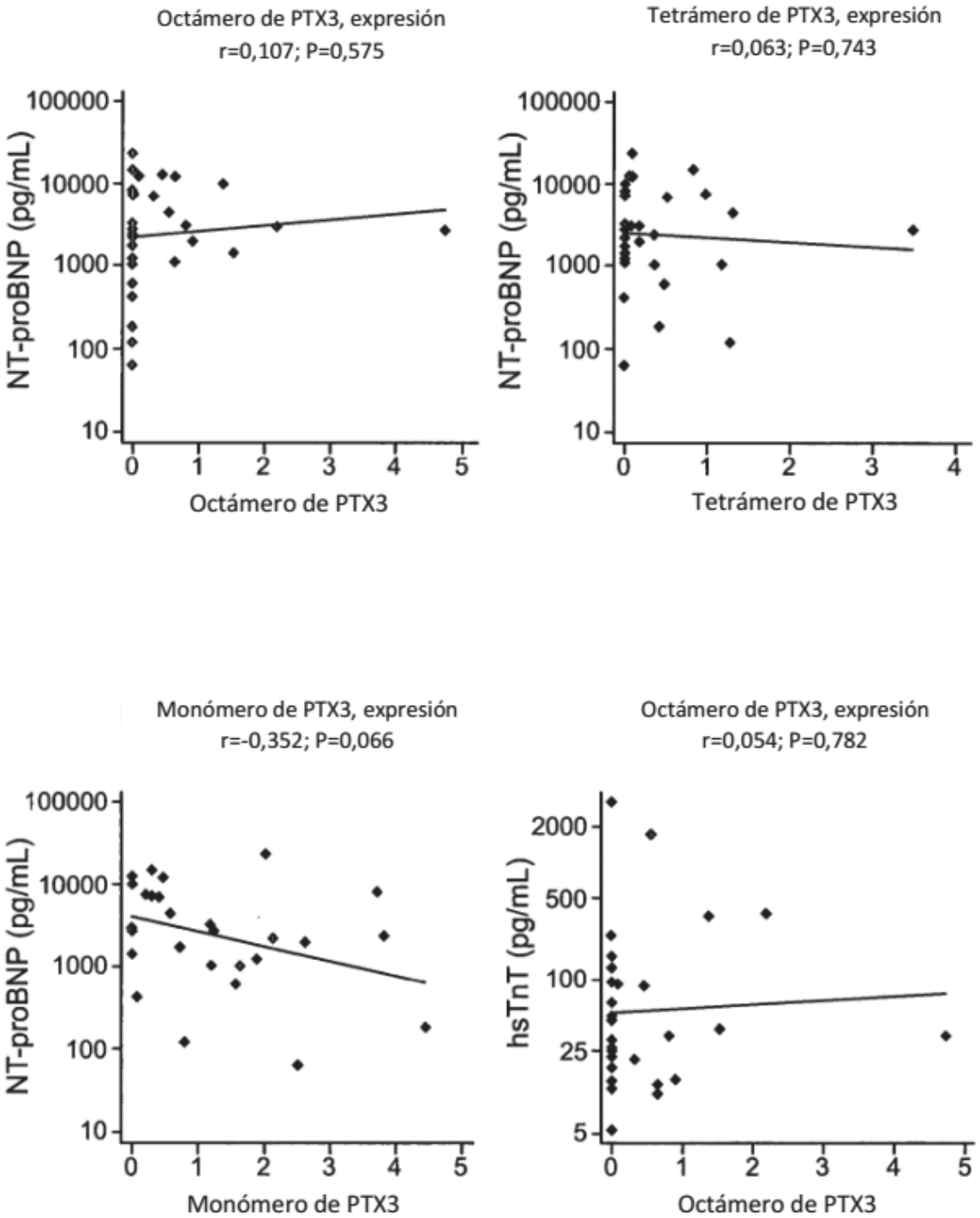

Octámero de PTX3, expresión
r=0,107; P=0,575
NT-proBNP (pg/mL)
100000
10000
1000
100
10
0
1
2
3
4
5
Octámero de PTX3
Tetrámero de PTX3, expresión
r=0,063; P=0,743
NT-proBNP (pg/mL)
100000
10000
1000
100
10
0
1
2
3
4
Tetrámero de PTX3
Monómero de PTX3, expresión
r=-0,352; P=0,066
NT-proBNP (pg/mL)
100000
10000
1000
100
10
0
1
2
3
4
5
Monómero de PTX3
Octámero de PTX3, expresión
r=0,054; P=0,782
hsTnT (pg/mL)
2000
500
100
25
5
0
1
2
3
4
5
Octámero de PTX3

Figura 4 continuación

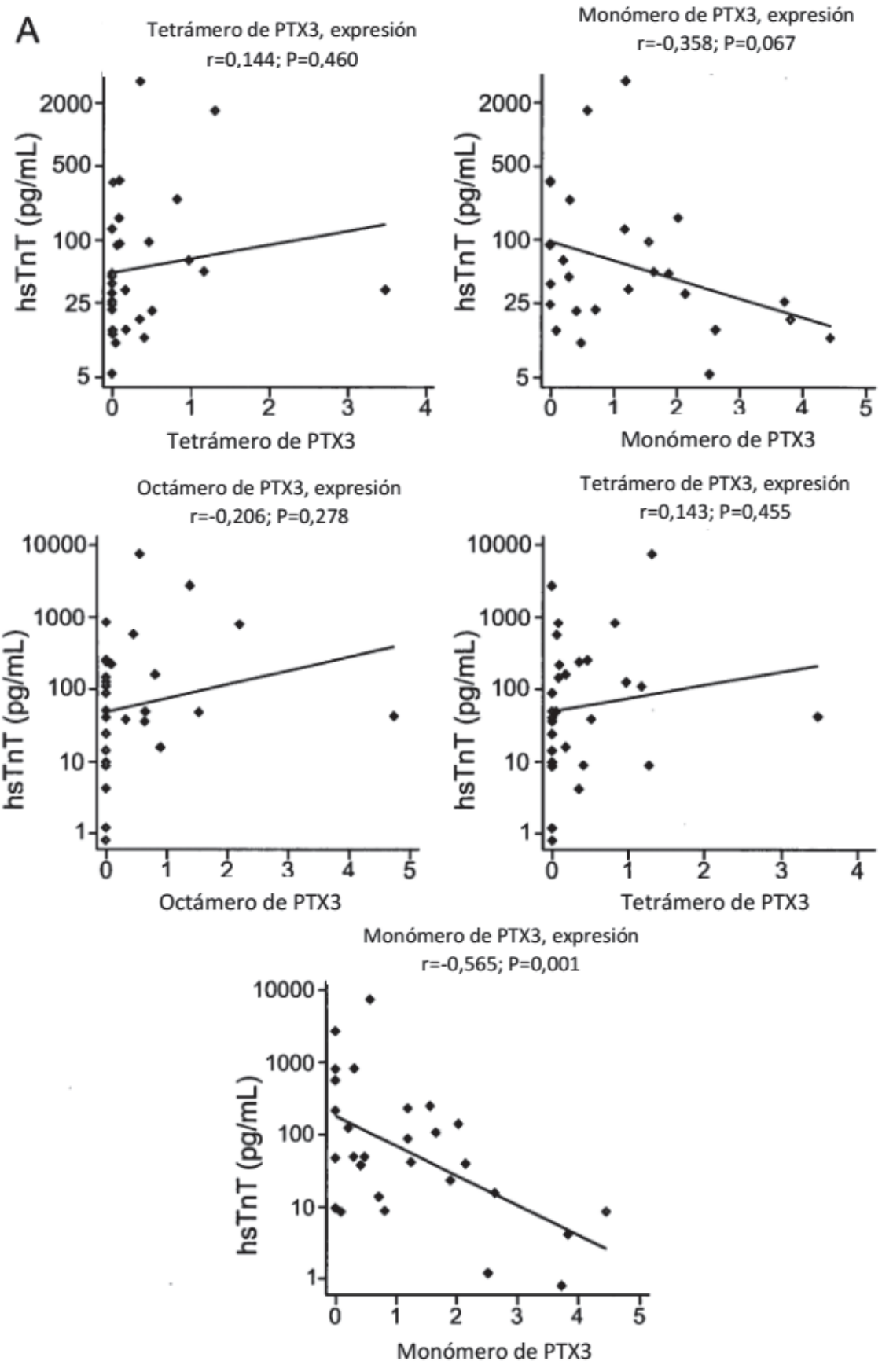
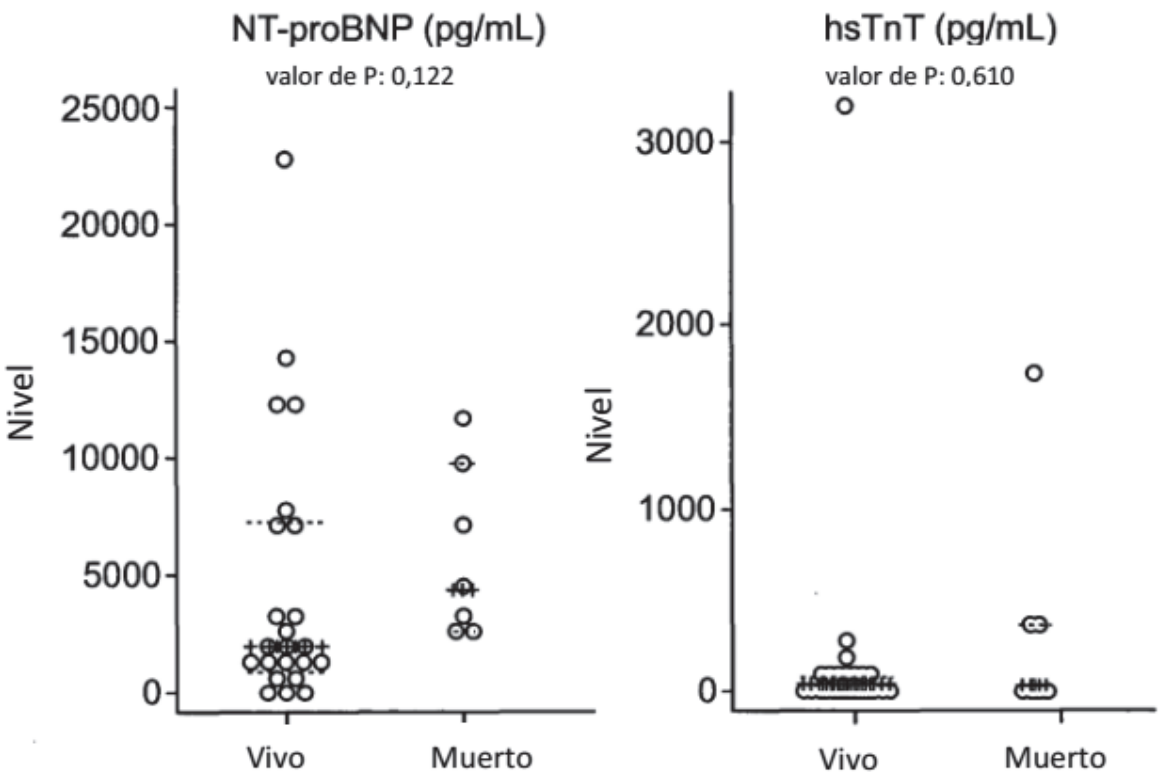


Figura 4 continuación

B



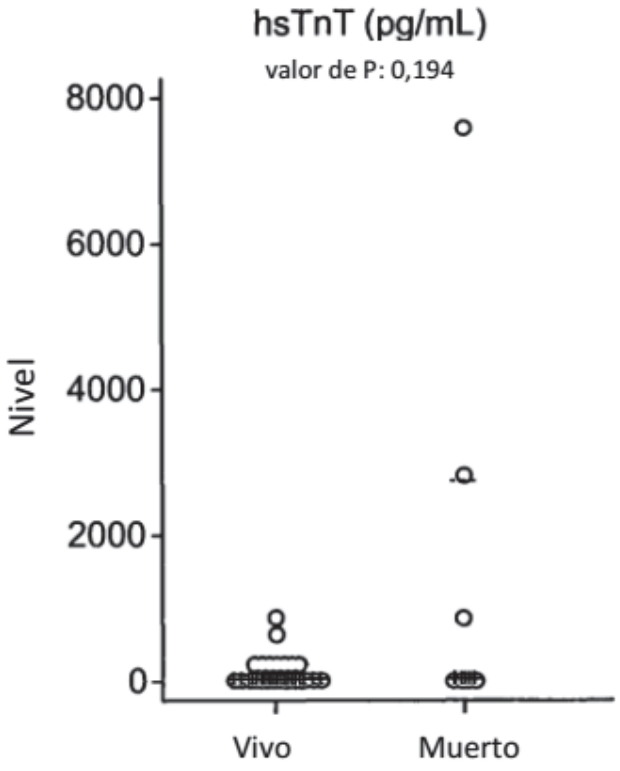


Figura 5

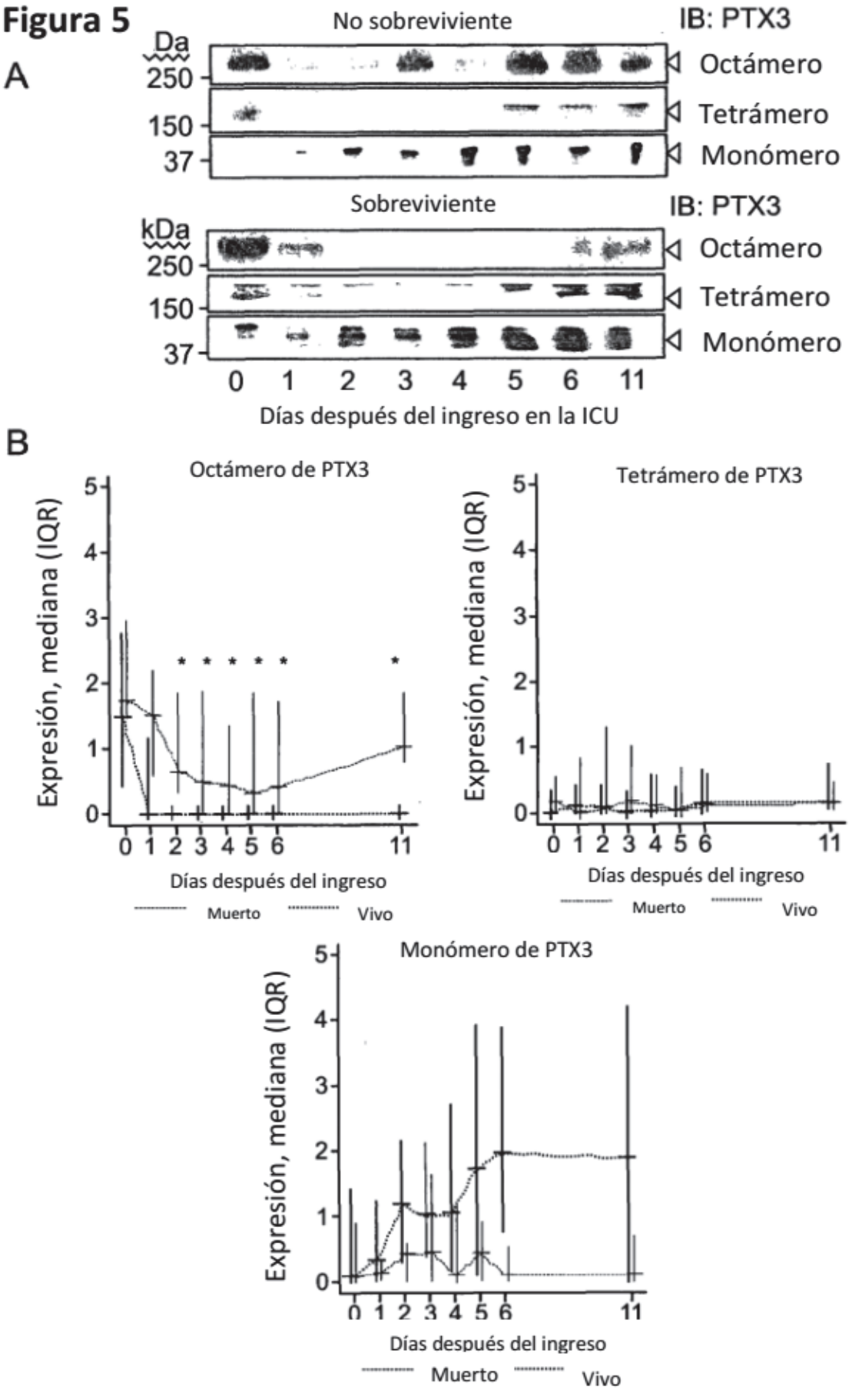
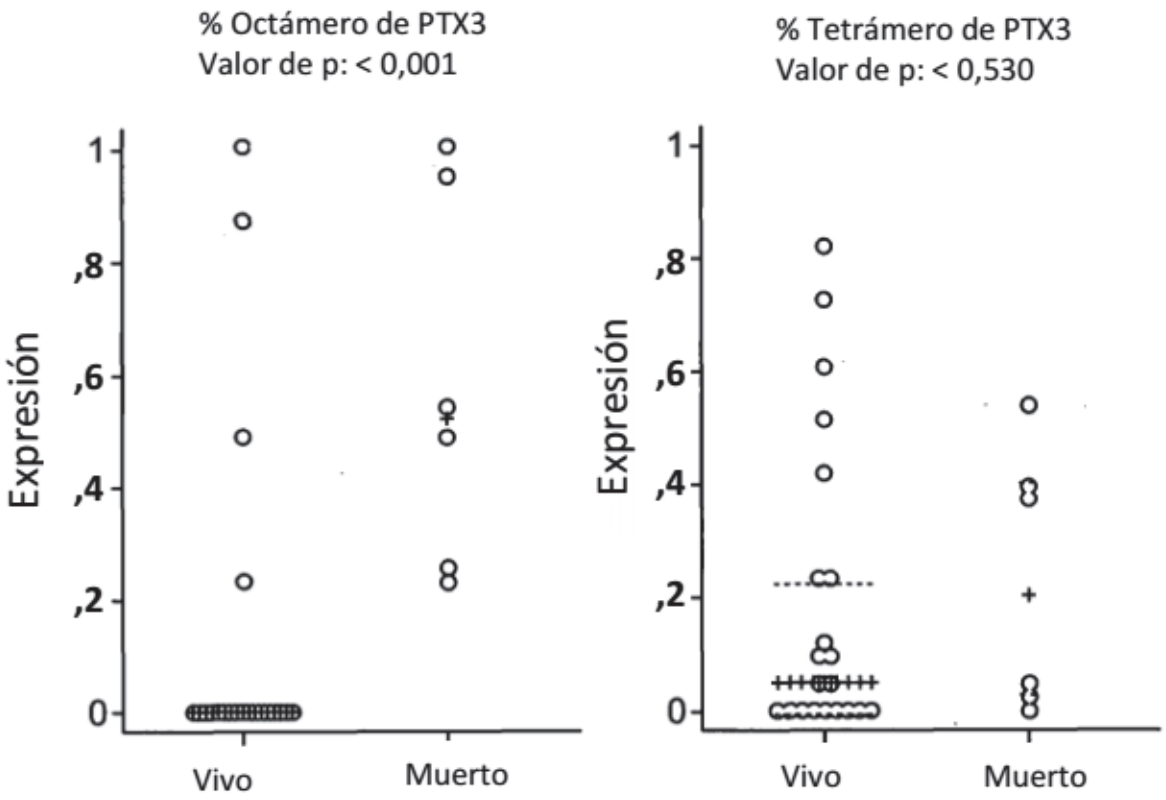

A
No sobreviviente
IB: PTX3
Da
250
150
37
Octámero
Tetrámero
Monómero
Sobreviviente
IB: PTX3
kDa
250
150
37
Octámero
Tetrámero
Monómero
0 1 2 3 4 5 6 11
Días después del ingreso en la ICU
B
Octámero de PTX3
Expresión, mediana (IQR)
Días después del ingreso
Muerto
Vivo
Tetrámero de PTX3
Expresión, mediana (IQR)
Días después del ingreso
Muerto
Vivo
Monómero de PTX3
Expresión, mediana (IQR)
Días después del ingreso
Muerto
Vivo

Figura 5 continuación

C



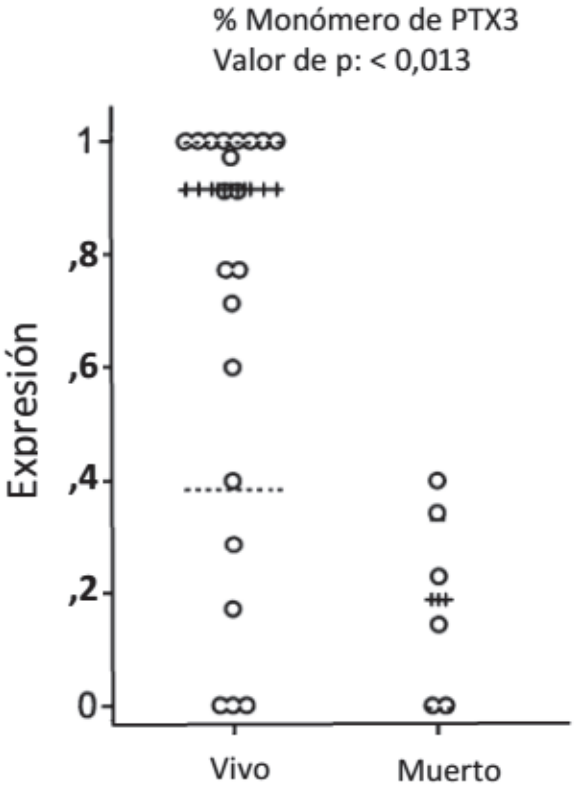


Figura 6

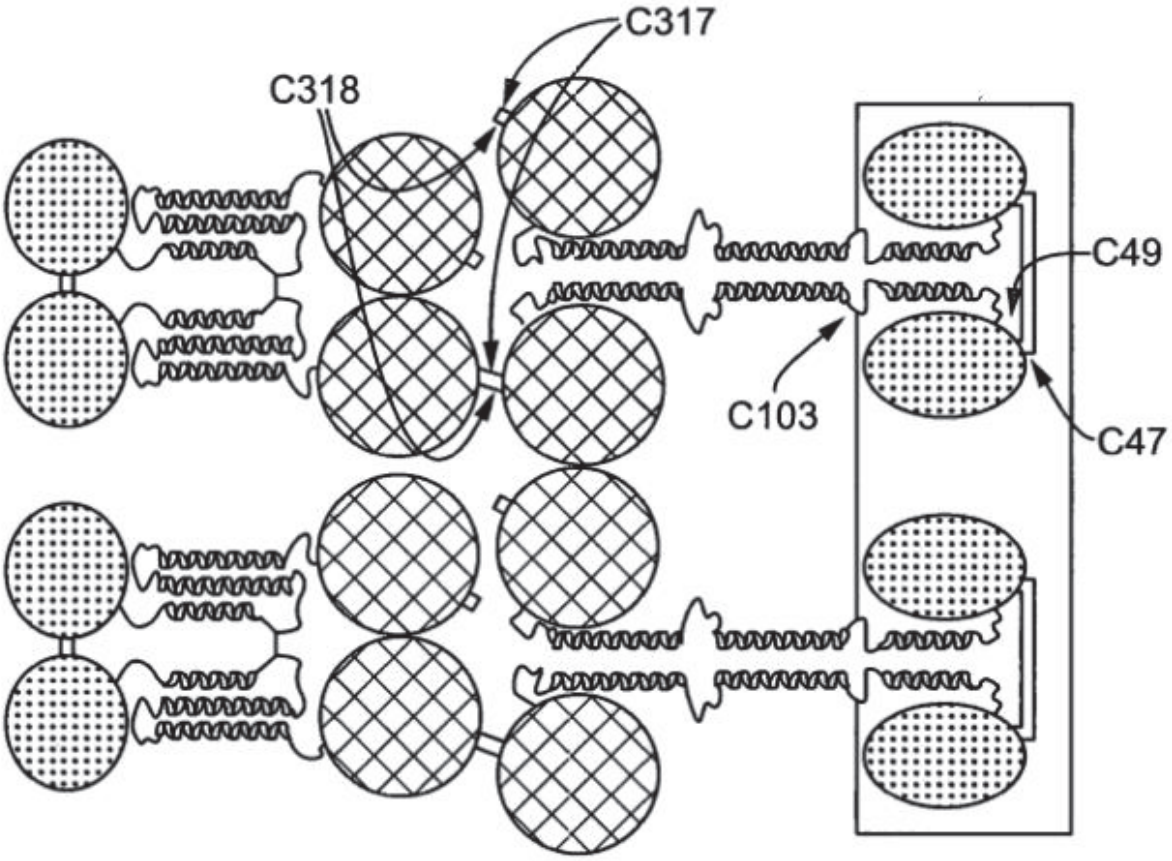
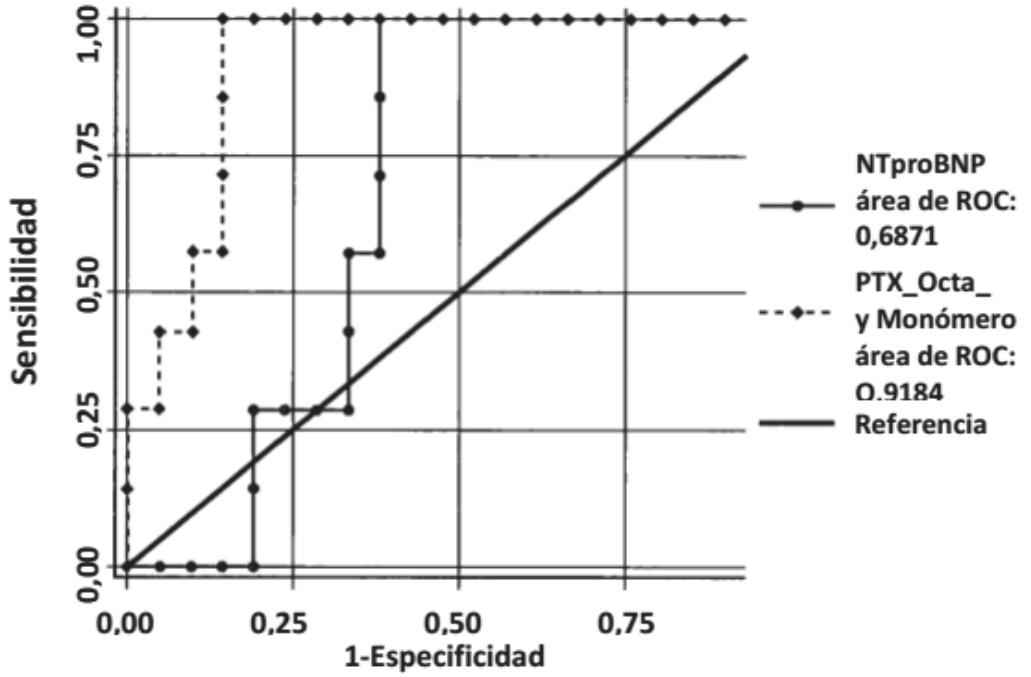
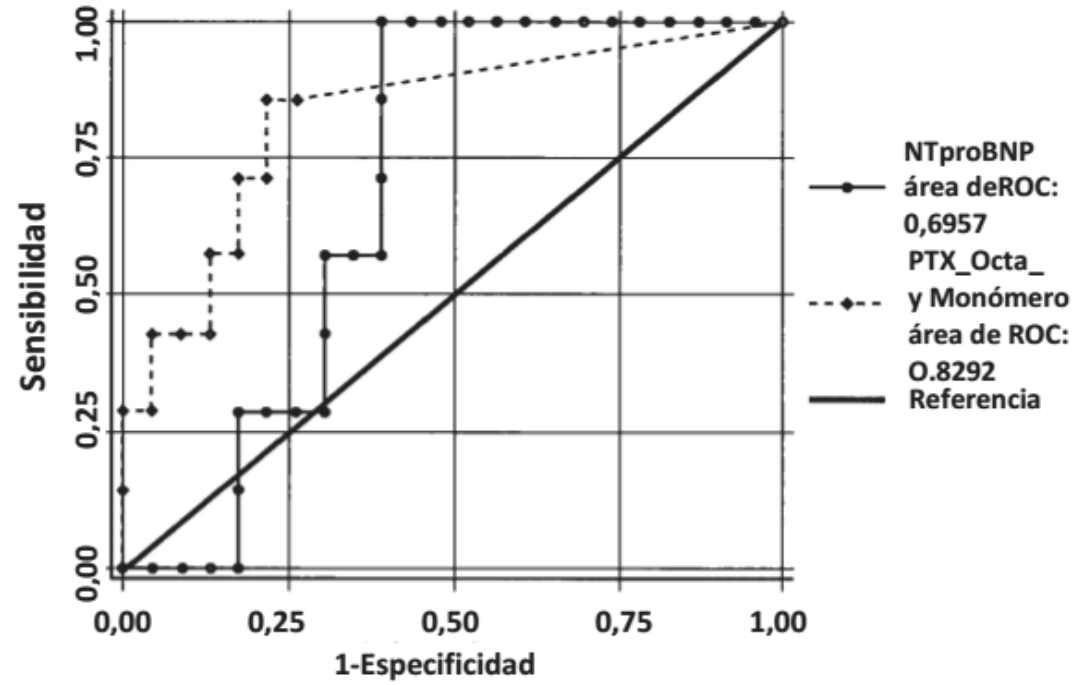


Figura 7

A



B



C

Límite de corte	0,1	0
Sensibilidad	0,75	0,86
Especificidad	0,82	0,74
NPV	0,9	0,94
PPV	0,6	0,5