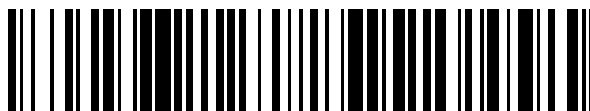


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 060**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2022** **PCT/EP2022/057048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2022** **WO22195037**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2022** **E 22716862 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024** **EP 4308932**

54 Título: **Método para el diagnóstico de una infección por coronavirus**

30 Prioridad:

**18.03.2021 EP 21382219**

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

**21.03.2025**

73 Titular/es:

**GERENCIA REGIONAL DE SALUD DE CASTILLA Y LEÓN (32.00%)**

**Paseo de Zorrilla, 1**

**47007 Valladolid, ES;**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (44.00%);**

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE ESTUDIOS CIENCIAS DE LA SALUD DE CASTILLA Y LEÓN (IECSCYL-IBSAL) (12.00%) y**

**INSTITUTO DE ESTUDIOS DE CIENCIAS DE LA SALUD DE CASTILLA Y LEÓN (IECSCYL) (12.00%)**

72 Inventor/es:

**TAMAYO GÓMEZ, EDUARDO;**

**GÓMEZ SÁNCHEZ, ESTHER;**

**TAMAYO VELASCO, ÁLVARO;**

**MARTÍNEZ DE PAZ, PEDRO JOSÉ;**

**FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, ITZIAR;**

**BERNARDO ORDIZ, DAVID;**

**HEREDIA RODRÍGUEZ, MARÍA y**

**GONZALO BENITO, HUGO**

74 Agente/Representante:

**MARTÍNEZ, Miguel Ángel**

ES 3 008 060 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico de una infección por coronavirus

## 5 Campo de la invención

La presente invención puede incluirse en el campo médico. En particular, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de una infección por coronavirus que se lleva a cabo preferiblemente mediante el uso de muestras biológicas mínimamente invasivas obtenidas del sujeto, lo más preferiblemente muestras de plasma.

## Estado de la técnica

En diciembre de 2019 se reconoció en China una nueva cepa de coronavirus, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2). Desde entonces, se han notificado más de 66 millones de casos en 184 países, provocando más de 1.500.000 muertes. El tiempo de incubación es de aproximadamente 5 días. La presentación clínica es amplia. Los síntomas más comunes incluyen fiebre, tos y fatiga. Sin embargo, también puede presentarse desde una infección totalmente asintomática hasta un síndrome de dificultad respiratoria aguda con disfunción multiorgánica.

Los pacientes hospitalizados presentan habitualmente enfermedad respiratoria moderada o grave con fiebre alta y neumonía. Determinados biomarcadores se han relacionado con esta situación, así como con alteraciones radiológicas. Sin embargo, las características clínicas, radiológicas y de laboratorio no pueden distinguirse fácilmente de la neumonía inducida por otras infecciones víricas o bacterianas.

El diagnóstico preciso y temprano es, por tanto, la piedra angular para la prevención y el tratamiento óptimos, especialmente en hospitales. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la prueba principal, pero su sensibilidad es variable y, en algunos informes, alcanza el 71%. Es necesaria la correcta recogida de muestras, lo que requiere la realización de nuevas pruebas de PCR si el resultado es negativo y existe una alta probabilidad de infección. Todo ello provoca un retraso en el diagnóstico y la optimización del tratamiento, tan necesarios no sólo en la supervivencia de cada paciente sino también en la cuarentena preventiva y la organización hospitalaria.

HORSPOOL ALEXANDER M *et al*: "Interplay of Antibody and Cytokine Production Reveals CXCL13 as a Potential Novel Biomarker of Lethal SARS-CoV-2 Infection", MSPHERE, vol. 6, n.º 1, enero de 2021 (01-2021-01) da a conocer que IP-10 estaba elevado en comparación con controles sanos y que los niveles de IL-4 estaban significativamente disminuidos en pacientes que sucumbieron a la infección.

BÜLOW ANDERBERG SARA *et al*: "Increased levels of plasma cytokines and correlations to organ failure and 30-day mortality in critically ill Covid-19 patients", CYTOKINE, ACADEMIC PRESS LTD, FILADELFIA, PA, EE. UU., vol. 138, 14 de diciembre de 2020 (14-12-2020) da a conocer que los niveles altos de IL-4 a menudo están fuertemente correlacionados con la insuficiencia respiratoria en pacientes con Covid-19.

Por tanto, existe una necesidad médica no satisfecha de encontrar nuevas herramientas para mejorar el diagnóstico de la infección por coronavirus. La presente invención se centra, por tanto, en resolver este problema y, en consecuencia, se presenta en el presente documento una huella de biomarcador que contribuye de manera eficaz al diagnóstico apropiado de la infección por coronavirus.

## Descripción de la invención

### Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de una infección por coronavirus que se lleva a cabo preferiblemente mediante el uso de muestras biológicas mínimamente invasivas obtenidas del sujeto, lo más preferiblemente muestras de plasma.

Los inventores de la presente invención consideran que el perfil de citocinas desempeña un papel importante en la patogenia de los pacientes hospitalizados y, en consecuencia, encontrar un perfil de citocinas específico podría ser de suma importancia para realizar un diagnóstico temprano de la infección por coronavirus, dando lugar así a la posibilidad de administrar tratamientos dirigidos en una etapa temprana de la enfermedad.

Por tanto, los inventores de la presente invención han identificado una huella de citocinas que permite un diagnóstico temprano de COVID-19. También es importante observar que la presente invención se implementa mediante el uso de muestras biológicas mínimamente invasivas obtenidas del sujeto, preferiblemente muestras de plasma.

En particular, los ejemplos y figuras proporcionados a continuación muestran resultados estadísticos contundentes con respecto a tres citocinas específicas, en concreto: proteína inducida por interferón gamma 10 (IP-10), factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGFBB) e interleucina 4 (IL4). Según la presente invención, cualquiera de estas citocinas muestra un resultado estadístico relevante (IP10 muestra AUC = 0,92, PDGFBB muestra AUC = 0,86 e IL4 muestra AUC = 0,67) y puede contribuir independientemente al diagnóstico de una infección por coronavirus. Además, cuando se combinaron las tres citocinas en un modelo, se obtuvo un AUC de 0,9557 con un 99,07 % de sensibilidad y un 96,43 % de especificidad.

Así, la presente invención describe la huella molecular de citocinas y quimiocinas que definen la infección por COVID-19 y que por tanto podrían tener un impacto clínico como biomarcadores de diagnóstico novedosos complementarios a la PCR o las pruebas antigénicas. En particular, niveles altos de IP10 y PDGF-BB junto con niveles bajos de IL-4 pueden predecir la infección por COVID-19. Este modelo se validó internamente revelando una exactitud del 99,07 %. Además, otra validación en otra cohorte de pacientes, la externa, confirmó los resultados.

En resumen, los inventores de la presente invención han desarrollado y validado un sencillo modelo logístico de predicción para la enfermedad de COVID-19 basado en la determinación de sólo 3 citocinas en sangre: IL4, IP10 y PDGFBB. Su implementación en la rutina sería fácil y rápida, asociando extraordinarias capacidades de exactitud, sensibilidad y especificidad en pacientes ingresados en el hospital. Puede usarse como herramienta complementaria para ayudar a la toma de decisiones clínicas.

Así, la primera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de una infección por coronavirus (a continuación en el presente documento, el método de la invención) en un sujeto que comprende: a) medir el nivel de IP10 en una muestra biológica mínimamente invasiva obtenida del sujeto, y b) en el que si se identifica una desviación o variación del nivel de IP10, en comparación con un nivel de referencia preestablecido medido en sujetos de control sanos, es indicativo de que el sujeto padece infección por coronavirus.

En una realización preferida, el método de la invención comprende además: a) medir el nivel de PDGFBB o IL4 en una muestra biológica mínimamente invasiva obtenida del sujeto, y b) en el que si se identifica una desviación o variación del nivel de PDGFBB o IL4, en comparación con un nivel de referencia preestablecido medido en sujetos de control sanos, es indicativo de que el sujeto padece infección por coronavirus.

En una realización preferida, el método de la invención comprende: a) medir el nivel de [IP10, PDGFBB e IL4] en una muestra biológica mínimamente invasiva obtenida del sujeto, y b) en el que si se identifica una desviación o variación del nivel de [IP10, PDGFBB e IL4], en comparación con un nivel de referencia preestablecido medido en sujetos de control sanos, es indicativo de que el sujeto padece infección por coronavirus.

En una realización preferida, el método de la invención se lleva a cabo en muestras de plasma, suero o sangre obtenidas del sujeto.

En una realización preferida, el método de la invención comprende: a) medir el nivel de [IP10, PDGFBB e IL4] en muestras de plasma obtenidas del sujeto, y b) en el que si se identifica una desviación o variación del nivel de [IP10, PDGFBB e IL4], en comparación con un nivel de referencia preestablecido medido en sujetos de control sanos, esto es indicativo de que el sujeto padece infección por coronavirus.

En una realización preferida, si el nivel de los biomarcadores o el valor de la puntuación de riesgo medido en el sujeto es estadísticamente mayor o menor en comparación con el nivel medido en sujetos de control sanos, esto es indicativo de que el sujeto padece infección por coronavirus. Así, según el método de la invención, después de medir el nivel de las citocinas, se obtiene un valor de puntuación para la firma y este valor de puntuación se compara con un valor umbral que define la regla de diagnóstico. Si este valor de puntuación es mayor/menor que el umbral, entonces la muestra correspondiente se clasifica como una muestra positiva, lo que es una indicación de que el paciente podría estar padeciendo una infección por coronavirus. El valor umbral se ha definido para optimizar los valores de sensibilidad y especificidad. En consecuencia, en una realización preferida, el método de la invención comprende: a) medir el nivel de la combinación de citocinas citada anteriormente en una muestra biológica obtenida del sujeto, b) procesar, usando por ejemplo una unidad de procesador, los valores de concentración para obtener una puntuación de riesgo y c) en el que si se identifica una desviación o variación del valor de puntuación de riesgo obtenido para cualquiera de las combinaciones de biomarcadores citadas anteriormente, en comparación con un valor de referencia, esto es indicativo de que el sujeto padece una infección por coronavirus.

En este contexto, puede usarse un ordenador que comprende una unidad de procesamiento, que está configurada para:

- Recibir el nivel de las citocinas que se miden,
- Procesar la información recibida para encontrar una variación o desviación sustancial del nivel de las citocinas, y
- Proporcionar una salida a través de una visualización en terminal de la variación o desviación del nivel de citocinas, en el que dicha variación o desviación indica que el sujeto podría estar padeciendo de una infección

por coronavirus.

En una realización preferida, el método de la invención se centra en el diagnóstico de una infección por coronavirus provocada por SARS-CoV-2.

En una realización preferida, el resultado obtenido con el método de la invención se confirma mediante una técnica de imagen, por ejemplo (lista no exhaustiva): ecografía, exploración de TC o exploración por tomografía computarizada (exploración de TAC) u obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM); o PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

También se da a conocer el uso *in vitro* de IP10, [IP10 y PDGFBB], o [IP10, PDGFBB e IL4] para el diagnóstico de una infección por coronavirus en un sujeto, a partir de una muestra biológica mínimamente invasiva obtenida del sujeto.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de IP10, [IP10 y PDGFBB], o [IP10, PDGFBB e IL4] para el diagnóstico de una infección por coronavirus provocada por SARS-CoV-2 en un sujeto a partir de una muestra biológica mínimamente invasiva obtenida del sujeto.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de [IP10, PDGFBB e IL4] para el diagnóstico de una infección por coronavirus a partir de muestras de plasma, suero o sangre obtenidas del sujeto.

También se da a conocer un kit configurado para implementar el método de la invención que comprende: a) reactivos para obtener una muestra de plasma del sujeto, y b) reactivos para determinar el nivel de [IP10, PDGFBB e IL4].

También se da a conocer el uso del kit para el diagnóstico de una infección por coronavirus, preferiblemente una infección por coronavirus provocada por SARS-CoV-2.

También se da a conocer una composición antiviral para su uso en el tratamiento de una infección por coronavirus que se ha diagnosticado después de realizar el método de la invención. Alternativamente, la presente divulgación se refiere a un método (no reivindicado) para tratar pacientes que pueden estar padeciendo o que padecen infección por coronavirus y que se han diagnosticado con el método de la invención, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición antiviral. En una realización preferida, el tratamiento antiviral se selecciona de los tratamientos divulgados en [Evans, Laura *et al.*, 2021. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. Critical Care Medicine: Noviembre de 2021 - Volumen 49 – Número 11 - pe1063-e1143 doi: 10.1097/CCM.0000000000005337].

Para el fin de la presente invención se definen los siguientes términos:

- La expresión “muestra biológica mínimamente invasiva” se refiere a cualquier muestra que se tome del cuerpo del paciente sin necesidad de usar instrumentos nocivos, distintos de las agujas finas usadas para extraer la sangre del paciente, y en consecuencia sin ser perjudicial para el paciente. Específicamente, muestra biológica mínimamente invasiva se refiere en la presente invención a: muestras de sangre, suero o plasma.
- La expresión “nivel de referencia preestablecido” se refiere al nivel medido en sujetos de control sanos. Si se determina una desviación del nivel de las citocinas con respecto a este “nivel de referencia preestablecido”, es una indicación de la infección por coronavirus.
- La expresión “puntuación de riesgo” se refiere a un valor de riesgo obtenido después de procesar uno o más valores en un único valor (o valor de riesgo), que representa la probabilidad de enfermedad para el individuo. Este valor de riesgo se comparará con un valor de referencia para evaluar si el paciente pudiera estar padeciendo infección por coronavirus.
- Un “valor de referencia” puede ser un valor umbral o un valor de punto de corte. Normalmente, un “valor umbral” o “valor de punto de corte” puede determinarse de manera experimental, empírica o teórica. Un valor umbral también puede seleccionarse de manera arbitraria basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, tal como reconocería un experto habitual en la técnica. El valor umbral debe determinarse para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas según la función de la prueba y el equilibrio beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falsos positivos y falsos negativos). Normalmente, la sensibilidad y especificidad óptimas (y por tanto el valor umbral) pueden determinarse usando una curva de eficacia diagnóstica (Receiver Operating Characteristic, ROC) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar los niveles de los biomarcadores en un grupo de referencia, puede usarse análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de las concentraciones medidas de biomarcadores en las muestras biológicas que van a analizarse, y obtener así un patrón de clasificación que tenga significación para la clasificación de las muestras. La curva ROC se usa principalmente para pruebas de diagnóstico bioquímico clínico. La curva ROC es un indicador exhaustivo que

refleja las variables continuas de la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y la tasa de falsos positivos (1-especificidad). Revela la relación entre la sensibilidad y la especificidad con el método de composición de imágenes. Se establecen como variables continuas una serie de diferentes valores de puntos de corte (valores umbrales o críticos, valores límite entre los resultados normales y anómalos de la prueba de diagnóstico) para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. A continuación, se usa la sensibilidad como coordenada vertical y se usa la especificidad como coordenada horizontal para trazar una curva. Cuanto mayor sea el área bajo la curva (AUC), mayor será la exactitud del diagnóstico/pronóstico. En la curva ROC, el punto más cercano al extremo superior izquierdo del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene tanto valores de alta sensibilidad como de alta especificidad. El valor de AUC de la curva ROC es de entre 1,0 y 0,5. Cuando  $AUC > 0,5$ , el resultado del diagnóstico es cada vez mejor a medida que el AUC se aproxima a 1. Cuando el AUC es de entre 0,5 y 0,7, la exactitud es baja. Cuando el AUC es de entre 0,7 y 0,9, la exactitud es buena. Cuando el AUC es mayor de 0,9, la exactitud es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. Para el trazado de la curva ROC puede usarse software o sistemas existentes en la técnica.

- Por “que comprende” se entiende que incluye, pero no se limita a, lo que sigue a la expresión “que comprende”. Por tanto, el uso de la expresión “que comprende” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.
- Por “que consiste en” se entiende “que incluye, y se limita a”, lo que sigue a la expresión “que consiste en”. Por tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.
- Por “dosis o cantidad terapéuticamente eficaz” se entiende una cantidad que, cuando se administra tal como se describe en el presente documento, produce una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que padece una infección por coronavirus. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que esté tratándose, el modo de administración y similares.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Modelos de regresión logística individual en cada citocina.

Figura 2. Probabilidad de infección cuando se midieron las citocinas A) IL4, B) IP10 o C) PDGFBB.

Figura 3. Gráfico que muestra el AUC de IP10 = 0,92.

Figura 4. Gráfico que muestra el AUC de PDGFBB = 0,86.

Figura 5. Gráfico que muestra el AUC de IL4 = 0,67.

### Descripción detallada de la invención

#### Ejemplo 1. MATERIAL Y MÉTODOS

##### Ejemplo 1.1. Selección de pacientes

Estudio prospectivo que incluye 108 casos y 28 controles. Los casos fueron pacientes de más de 18 años de edad a los que se diagnosticó COVID-19 y se ingresaron en el Hospital Clínico Universitario (Valladolid, España) entre los días 24 de marzo y 11 de abril de 2020. El resultado positivo en infección por coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2) se confirmó mediante pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una muestra nasofaríngea. Los pacientes con otras infecciones y/o cualquier enfermedad terminal crónica se excluyeron del estudio. Los controles estuvieron representados por 28 voluntarios sanos de la misma edad y sexo para la normalización de los datos analíticos de las citocinas. Se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los participantes del estudio siguiendo el enfoque ético del Comité de Ética Clínica del Hospital (PI 20-1717).

##### Ejemplo 1.2. Muestras biológicas

Se recogieron muestras de sangre de los pacientes después de su primera noche en el hospital y a las 09:00 h usando tubos de citrato de sodio al 3,2 % y centrifugándolos a 2000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas del plasma y se crioconservaron a 80 °C hasta su uso.

##### Ejemplo 1.3. Análisis de citocinas y quimiocinas

Se usaron las alícuotas de plasma para la cuantificación de mediadores solubles mediante el kit 45-plex Human XL

Cytokine Luminex Performance Panel (R&D). Se realizó un análisis por duplicado en cada muestra.

Las citocinas o quimiocinas incluidas en el panel fueron BDNF, EGF, eotaxina (también conocida como CCL11), FGF-2, GM-CSF, GRO- $\alpha$  (CXCL1), HGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A (CTLA-18), IL-18, IL-1RA, IL-2, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (también conocida como CXCL8), IL-9, IP-1 beta (CCL4), IP-10 (CXCL10), LIF, MCP-1 (CCL2), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), NGF- $\beta$ , PDGF-BB, PIGF-1, RANTES (CCL5), SCF, SDF-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , VEGF-A, VEGF-D.

#### Ejemplo 1.4. Variables

Se registraron los datos demográficos, clínicos y analíticos (leucocitos, linfocitos, neutrófilos, plaquetas, proteína C reactiva, ferritina y dímero D) de cada paciente para describir el fenotipo clínico.

#### Ejemplo 1.5. Tratamiento de protocolo hospitalario

El protocolo hospitalario para el tratamiento de la neumonía por COVID-19 en marzo y abril de 2020 incluía: disolución de lopinavir/ritonavir (Kalera®. Abbott), 200/50 mg/ml, dos veces al día. Hidroxicloroquina (Dolquine®. Rubió), 400 mg, dos veces al día. Según criterios inflamatorios, el tratamiento también añadiría 0,25 mg de interferón 1 $\beta$  (Betaferon®. Bayer) cada 48 horas, 240 mg de corticosteroides cada día durante tres días, Tocilizumab (RoActemra®. Roche), Baricitinib (Olumiant®. Lilly) o Anakinra (Kineret®. Amgen). En caso de sospecha de superinfección bacteriana, se necesitó tratamiento con antibióticos. Se administró soporte de oxígeno (cánula nasal, cánula nasal de alto flujo y ventilación mecánica no invasiva o invasiva) a los pacientes en función de la gravedad de la hipoxemia.

#### Ejemplo 1.6. Análisis estadístico

Las características demográficas y clínicas se evaluaron usando la prueba de la Chi cuadrado para las variables categóricas y la prueba de la U de Mann-Whitney para las variables continuas cuando resultó apropiado. Se usaron los valores medios y los intervalos de confianza del 95 % (IC del 95 %) para describir las variables cuantitativas, mientras que se usaron los valores medios y el intervalo intercuartílico (IR) para las ordinales.

Se aplicaron modelos de regresión logística individuales, en los que la exponencial de los coeficientes puede interpretarse directamente como un cociente de probabilidades. El modelo multivariante usó todos aquellos marcadores que mostraron un determinado grado de asociación con la enfermedad. Se necesitó un punto de corte < 0,1 en el valor de p en el modelo individual. Cuando hay un gran número de variables que se incluyen en el modelo multivariante, especialmente cuando el tamaño de la muestra es pequeño, surge el problema de seleccionar un buen subconjunto de variables que intervienen en el modelo multivariante. Para superar esto, se usó un algoritmo que enumera todos los conjuntos posibles de biomarcadores, dejando el mejor modelo. La elección del modelo se realizó usando el criterio de información de Akaike (AIC).

La validación interna trató de determinar la capacidad de discriminación del modelo y su capacidad para clasificar nuevos individuos correctamente. Como medida global, se usó el área bajo la curva ROC (AUC), sabiendo que un modelo es un clasificador perfecto cuando el AUC es 1.

Para el análisis de citocinas, con el fin de imputar valores de citocinas por debajo del límite de detección, se usó una regresión robusta sobre estadísticos de orden: este método realiza una regresión para imputar valores bajos asumiendo cuantiles logarítmicos normales para muestras con una tasa de detección de al menos el 30 %, después de comprobar que los datos siguen una distribución logarítmica normal. Para lograr esto, se usó el paquete R de análisis de datos y no detección (NADA). Las moléculas detectadas en menos del 30 % de las muestras ya no siguieron analizándose estadísticamente. Los datos de expresión de citocinas se transformaron usando la escala logarítmica de base 2. También se calcularon las razones de citocinas proinflamatorias/antiinflamatorias.

El análisis estadístico lo realizó un estadístico licenciado doctorado (coautor IF) usando el paquete estadístico R versión 3.1.1 (R Core Team; Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria; URL: <https://www.R-project.org/>). La significación estadística se fijó en  $P \leq 0,05$ .

## Ejemplo 2. RESULTADOS

### Ejemplo 2.1. Resultados estadísticos

No hubo diferencias estadísticas en el sexo y edad entre los casos y controles (tabla 1). La mediana de la edad fue de 69 años en el grupo de COVID-19, con un 55,3 % de hombres, mientras que la mediana de la edad del grupo de control fue de 71 años, representando los hombres un 57,1 %. Las principales comorbilidades en los casos fueron hipertensión (46,3 %), diabetes (17,6 %), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (16,8 %) y coronariopatía (13 %). En referencia a las variables de laboratorio, hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, ya que los pacientes con COVID tenían niveles más bajos de leucocitos, linfocitos y plaquetas y niveles más altos de

neutrófilos. Los pacientes se hospitalizaron durante una mediana de 12 días, que aumentó hasta 19 días en aquellos que requerían ingreso en las unidades de cuidados intensivos. Finalmente, la tasa de muerte de los pacientes con COVID-19 fue del 22,22 % (24 pacientes en total).

5

Tabla 1

	Casos (N = 108)	Control (N = 28)	Valor de P
Edad [años, mediana (IQR)]	69 (20)	71 (37)	
Hombres [% (n)]	55,3 % (73)	57,1 % (16)	NS
-Comorbilidades, [% (n)]			
Uso de tabaco	8,3 % (9)	10,7 % (3)	NS
Uso de alcohol	2,8 % (3)	7,14 % (2)	NS
Enfermedad cardíaca	13,0 % (14)	21,42% (6)	NS
Diabetes	17,6 % (19)	14,28 % (4)	NS
Accidente cerebrovascular	2,8 % (3)	3,57 % (1)	NS
Hipertensión	46,3 % (50)	50 % (14)	NS
Enfermedad hepática	1,9 % (2)	0 % (0)	NS
Obesidad	9,3 % (10)	3,57 % (1)	NS
EPOC	16,8 % (18)	10,7 % (3)	NS
Enfermedad renal	2,8 % (3)	0 % (0)	NS
- Laboratorio, [mediana (IQR)]			
Recuento de glóbulos blancos (n.º/ml)	6680 (3135)	6870 (2155)	<0,001
Recuento de linfocitos (n.º/ml)	1090 (905)	2255 (940)	<0,001
Recuento de neutrófilos (n.º/ml)	4465 (3225)	3760 (1340)	<0,001
Recuento de plaquetas (células/mm <sup>3</sup> )	218500 (108500)	250000 (58000)	0,005
Dímero D (ng/ml)	758 (1230)		
Proteína C reactiva (mg/l)	81 (112)		
-Contadores hospitalarios, [mediana (IQR)]			
Duración de la estancia en el hospital	12 (13)		
Duración de la estancia en la UCI	19 (15)		
- Mortalidad, [% (n)]			
Fallecimiento a los 28 días	18,5 % (20)		
Fallecimiento	22,2 % (24)		

*Características clínicas. Las variables continuas se representan como [mediana, (intervalo intercuartílico, IQR)]; las variables categóricas se representan como [% (n)]. EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica.*

10

De las 45 citocinas totales estudiadas (véase la tabla 2 que muestra el nivel de citocinas comparando casos y control), 8 de ellas tuvieron que excluirse (FGF-2, IL-12, IL-21, IL-23, IL-31, IL-9, NGFβ y TNFβ) ya que no pudieron detectarse en al menos el 70 % de los pacientes. De las 37 citocinas restantes, 24 mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes y los controles (tabla 2). La mayoría de estas citocinas estaban aumentadas en los pacientes (BDNF, HGF, IL-1α, IL-1β, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-7, IP1b, IP10, MCP1, PDGF-BB, RANTES, VEGFA y VEGFB). Cabe destacar que IL-1RA y PDGFβ se expandieron más de 10 veces en los pacientes referidos al grupo de control. Por otro lado, un total de 6 citocinas (eotaxina, IFNγ, IL-22, IL-27, IL-4 y SDF1α) estaban disminuidas en los pacientes con COVID-19.

15

20

Tabla 2

Citocina	Control N = 28		Casos N = 108		Valor de P
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
BDNF	39,01	115,95	58,67	132,52	<u>0,024</u>
EGF	3,78	1,48	2,15	7,4	0,171
Eotaxina	23,82	12,66	13,85	9,6	<u>&lt;0,001</u>
GM-CSF	15,07	6,19	11,38	25,39	0,733
GROα	4,26	1,83	2,99	4,17	0,190
HGF	71,45	53,6	163,75	251,66	<u>&lt;0,001</u>
IFNα	0,74	0,37	0,48	1,63	0,499
IFNγ	12,56	3,4	8,81	6,7	<u>0,005</u>
IL-1α	0,58	0,56	2,5	7,76	<u>0,012</u>
IL-1β	2,49	0,96	6,62	10,47	<u>&lt;0,001</u>
IL-10	1,81	0,5	1,69	2,54	0,611
IL-13	3,17	1,5	2,06	2,86	0,093
IL-15	4,41	2,96	13,32	17,99	<u>&lt;0,001</u>

IL-17A	2,03	0,61	7,03	14,73	<0,001
IL-18	14,53	18,43	47,2	51,74	<0,001
IL-1RA	72,51	38,73	604,75	1007,92	<0,001
IL-2	7,59	1,61	13,39	19,64	<0,001
IL-22	18,15	22,33	3,57	20,89	0,015
IL-27	38,87	18,2	18,06	34,08	0,023
IL-4	10,37	4,52	5,59	6,98	0,04
IL-5	9,42	4,88	5,12	17,34	0,394
IL-6	8,69	3,56	13,07	22,73	0,01
IL-7	0,72	0,31	1,67	2,88	<0,001
IL-8	3,25	1,69	2	3,81	0,079
IP1b	29,95	22,42	48,6	44,16	0,007
IP10	5,56	4,2	45,67	40,46	<0,001
LIF	12,18	2,46	14,9	16,81	0,105
MCP1	16,78	14,57	37,88	31,55	<0,001
MIP1a	2,91	1,12	3,39	11,38	0,607
PDGF-BB	31,8	39,64	303,42	656,93	<0,001
PIGF1	5,82	5,16	5,45	60,52	0,807
RANTES	17,62	8,36	22,77	18,9	0,001
SCF	9,52	12,13	6,51	7,49	0,199
SDF1a	951,75	412,62	669,5	607,62	0,011
TNF $\alpha$	6,46	3,29	6,02	10,91	0,541
VEGFA	47,8	98,36	122,65	188,12	0,001
VEGFD	6,55	10,74	12,65	13,28	0,005

Nivel de citocinas comparando casos y control

5 Los modelos de regresión logística individual, que ajustan los resultados para la edad y el sexo, mostraron una sobreexpresión estadísticamente significativa de varias citocinas (BDNF, HGF, IL-1 $\beta$ , IL-15, IL-17A, IL-18, IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-7, IP1b, IP10, MCP1, PDGFB, VEGFA, VEGFD, RANTES) mientras que IFN $\gamma$ , IL-22, IL-4 y SCF estaban subexpresadas (figura 1).

10 Se eligió el mejor modelo multivariable, el que tenía el AIC más bajo. Después de M3 no fue posible encontrar modelos válidos. En este caso, se eligió el modelo 3 (AIC = 25,12) que incluía 3 citocinas: IL-4, IP10 y PDGF-BB. Véase la tabla 3 en la que se identifica el mejor modelo multivariable después de AIC ("criterio de información de Akaike").

Tabla 3

	M0	M1	M2	M3
Intercepción	✓	✓	✓	✓
Edad	✓	✓	✓	✓
Sexo	✓	✓	✓	✓
BDNF				
Eotaxina				
HGF				
IFN $\gamma$				
IL1b				
IL15				
IL17a				
IL18				
IL1RA				
IL2				
IL22				
IL4				✓
IL6				
IL7				
IP1b				
IP10		✓	✓	✓
MCP1				
PDGF				
BB			✓	✓
RANT				
ES				
SCF				



VEGF A				
VEGF D				
AIC	139,59	60,17	38,06	25,12

*Mejor modelo multivariante que sigue AIC ("criterio de información de Akaike")*

Este modelo multivariante mostró una clara asociación entre los niveles de estas 3 citocinas y la alta probabilidad de infección por COVID-19 (véase la tabla 4 que muestra el modelo multivariante y la asociación entre los niveles de citoquinas y el riesgo de infección por Covid. IC, intervalo de confianza; OR, cociente de probabilidades). Los niveles altos de IP10 [OR 55,53, IC del 95 % (2,49-1027,43),  $p = 0,011$ ] y PDGF-BB [OR 22,49, IC del 95 % (1,22-412,76),  $p = 0,036$ ] aumentaron el riesgo de infección, alcanzando 50 y 22 veces más riesgo si los valores se duplicaban. Los niveles bajos de IL-4 [OR 0,04, IC del 95 % (0,016-0,973),  $p = 0,048$ ] también aumentaron el riesgo debido a su subexpresión en los pacientes. Según el nivel de cada citocina, la figura 2 representa la probabilidad de infección.

Tabla 4

Efecto	Coeficiente	Error estándar	Valor de P	OR	IC del 95 %	
					Bajo	Alto
(Intercepción)	-24,919	14,346	0,0824			
Edad	0,002	0,082	0,9811	1,0019	0,8531	1,1767
Sexo (mujer)	0,348	1,493	0,8155	1,4169	0,0759	26,4554
IL4	-3,225	1,632	0,0481	0,0397	0,0016	0,9733
IP10	3,923	1,537	0,0107	50,5349	2,4856	1027,4291
PDGFBB	3,113	1,485	0,036	22,485	1,2249	412,7552

*Modelo multivariante y la asociación entre los niveles de citocina y el riesgo de infección por Covid. IC, intervalo de confianza; OR, cociente de probabilidades*

La validación interna mostró un AUC de 0,9557. La tabla 5 muestra la validación interna usando el AUC (área bajo la curva) y el IC (intervalo de confianza). Por tanto, el modelo es especialmente sensible para identificar pacientes con COVID-19, con un 99,07 % de sensibilidad, un 96,43 % de especificidad y un 98,53 % de exactitud.

Tabla 5

	Umbral: 0,6572972		
	Valor	IC del 95 %	
		Bajo	Alto
AUC	0,9557	0,8848	1
Sensibilidad (%)	99,07	97,27	100
Especificidad (%)	96,43	89,55	100
Exactitud (%)	98,53	96,51	100

*Validación interna usando el AUC (área bajo la curva) y el IC (intervalo de confianza)*

# REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el diagnóstico de la infección por coronavirus en pacientes hospitalizados que comprende: a) medir el nivel de IP10, PDGFBB e IL4 en una muestra biológica mínimamente invasiva obtenida del paciente hospitalizado, y b) en el que la identificación de niveles más altos de IP10 y PDGFBB junto con niveles bajos de IL-4, en comparación con un nivel de referencia preestablecido medido en sujetos de control sanos, es indicativo de que el paciente hospitalizado padece infección por coronavirus.  
5
2. Método *in vitro* para el diagnóstico de la infección por coronavirus en pacientes hospitalizados, según la reivindicación 1, que comprende: a) medir el nivel de un grupo de citocinas que consiste en: IP10, PDGFBB e IL4 en una muestra biológica mínimamente invasiva obtenida del paciente hospitalizado, y b) en el que la identificación de niveles más altos de IP10 y PDGFBB junto con niveles bajos de IL-4, en comparación con un nivel de referencia preestablecido medido en sujetos de control sanos, es indicativo de que el paciente hospitalizado padece infección por coronavirus.  
10  
15
3. Método *in vitro* para el diagnóstico de la infección por coronavirus en pacientes hospitalizados, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en muestras de plasma, suero o sangre obtenidas del paciente hospitalizado.  
20
4. Método *in vitro* para el diagnóstico de la infección por coronavirus en pacientes hospitalizados, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende: a) medir el nivel de un grupo de citocinas que consiste en: IP10, PDGFBB e IL4 en muestras de plasma obtenidas del paciente hospitalizado, y b) en el que la identificación de niveles más altos de IP10 y PDGFBB junto con niveles bajos de IL-4, en comparación con un nivel de referencia preestablecido medido en sujetos de control sanos, es indicativo de que el paciente hospitalizado padece infección por coronavirus.  
25
5. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el diagnóstico de una infección por coronavirus provocada por SARS-CoV-2.
6. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el diagnóstico se confirma mediante una técnica de imagen o PCR.  
30

Figura 1

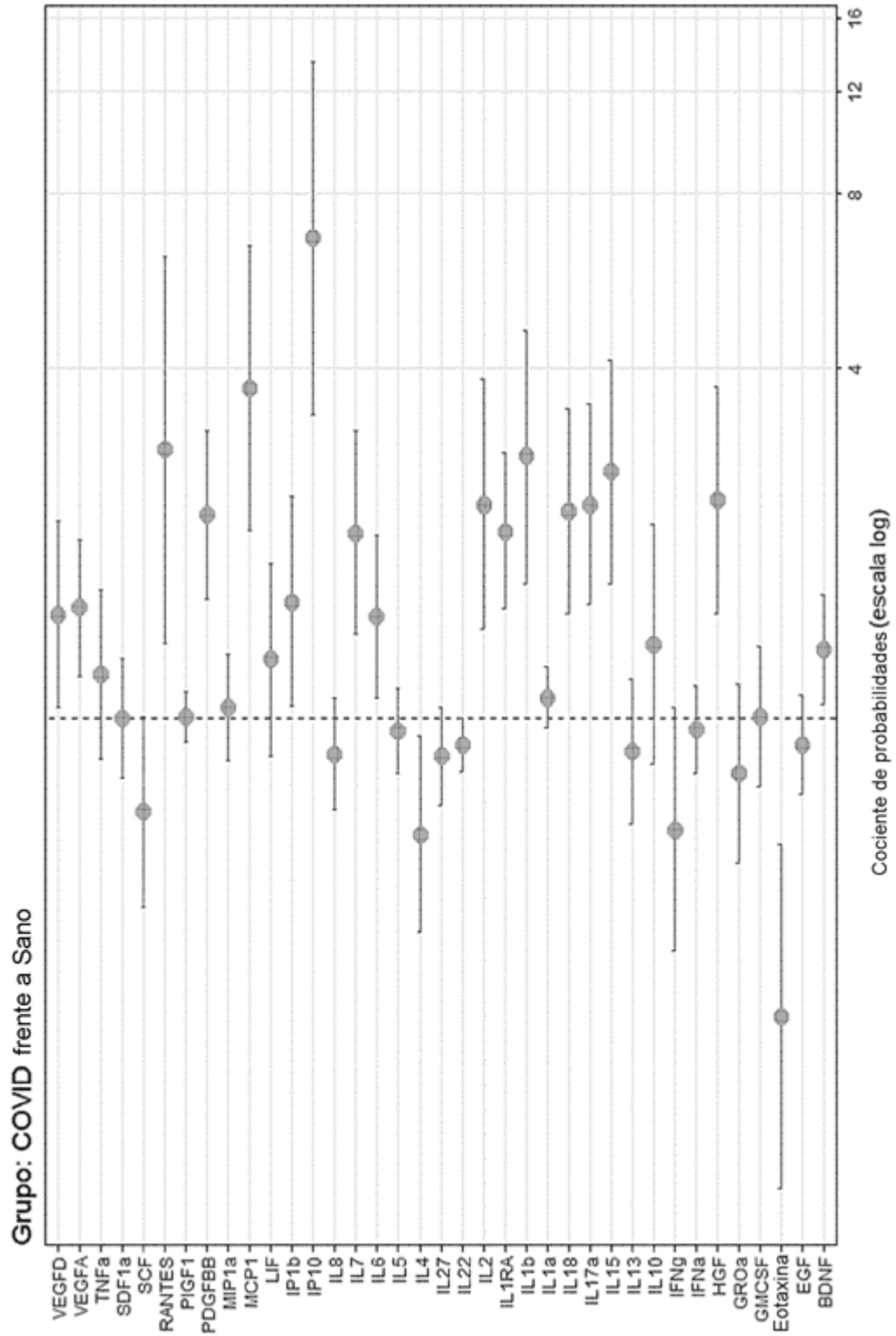


Figura 2

A)

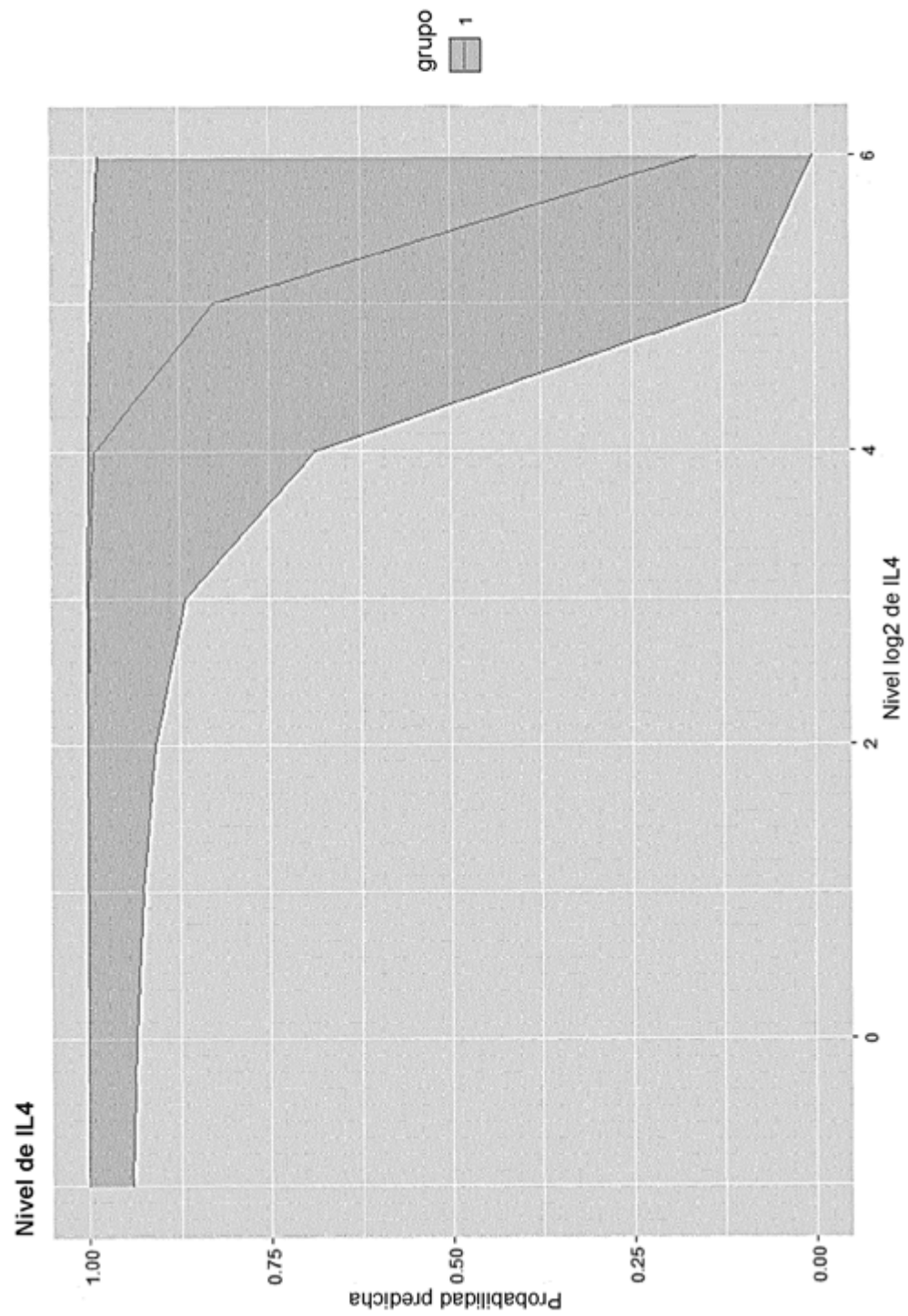


Figura 2 (cont.)

B)

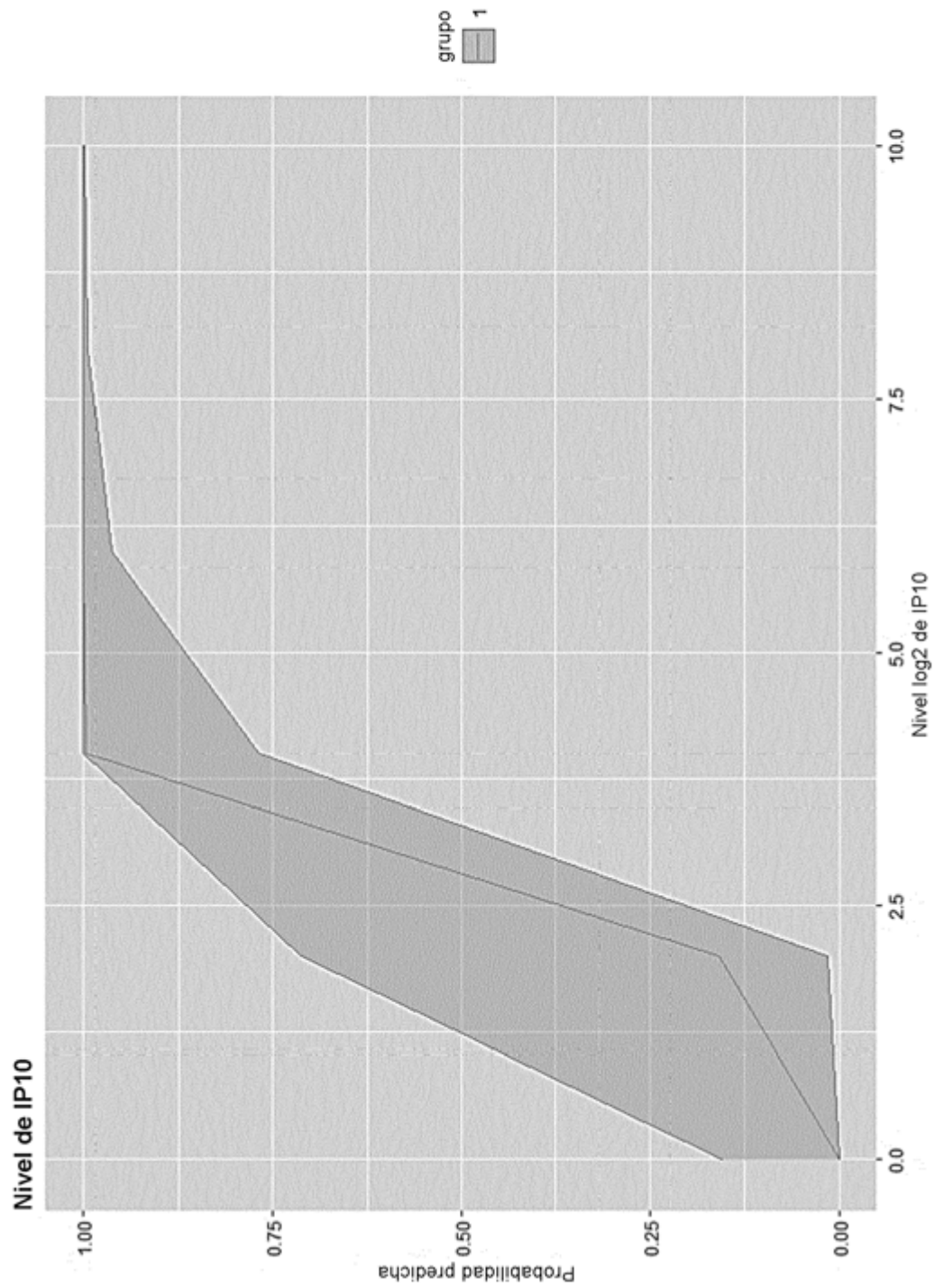


Figura 2 (cont.)

C)

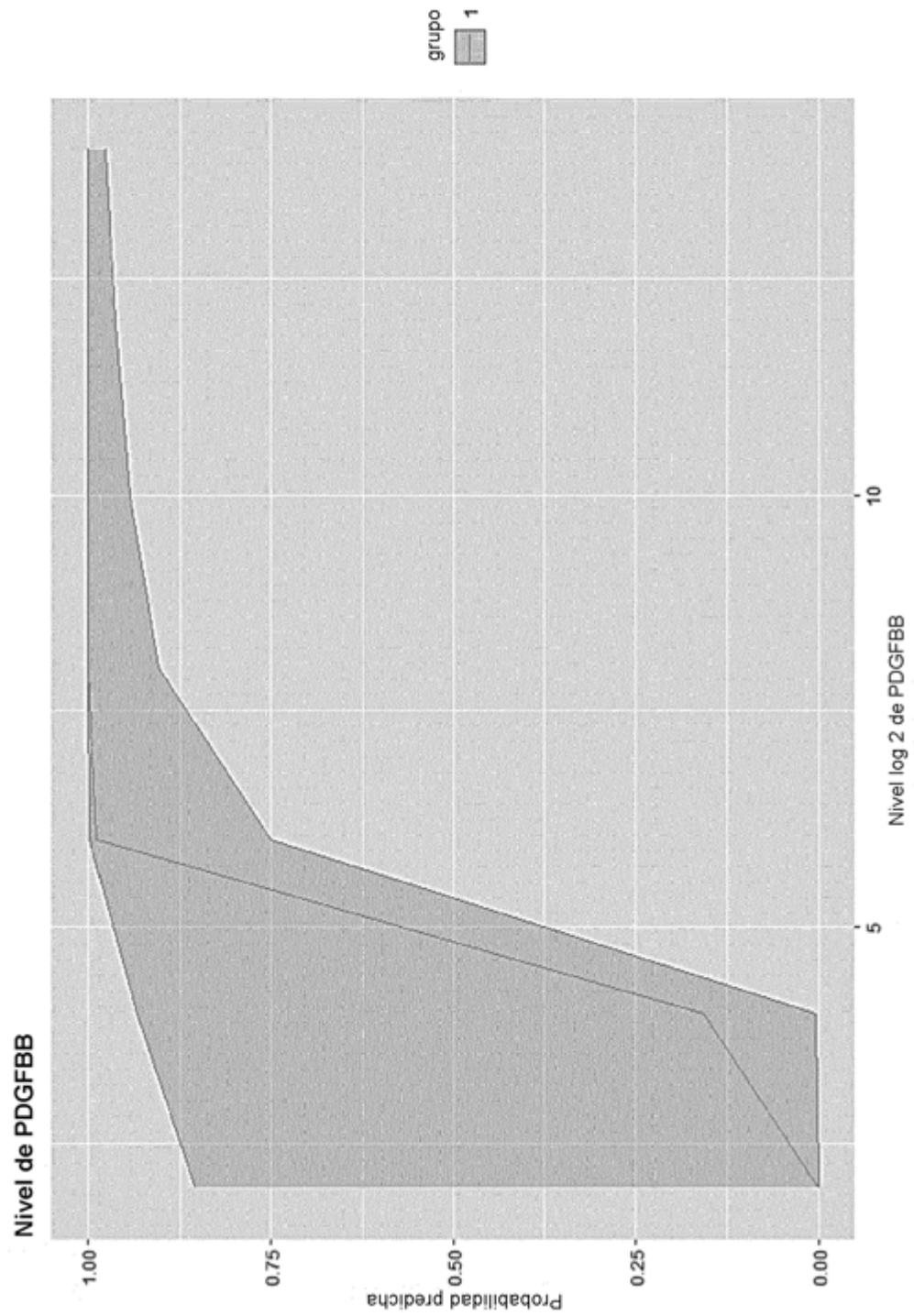


Figura 3

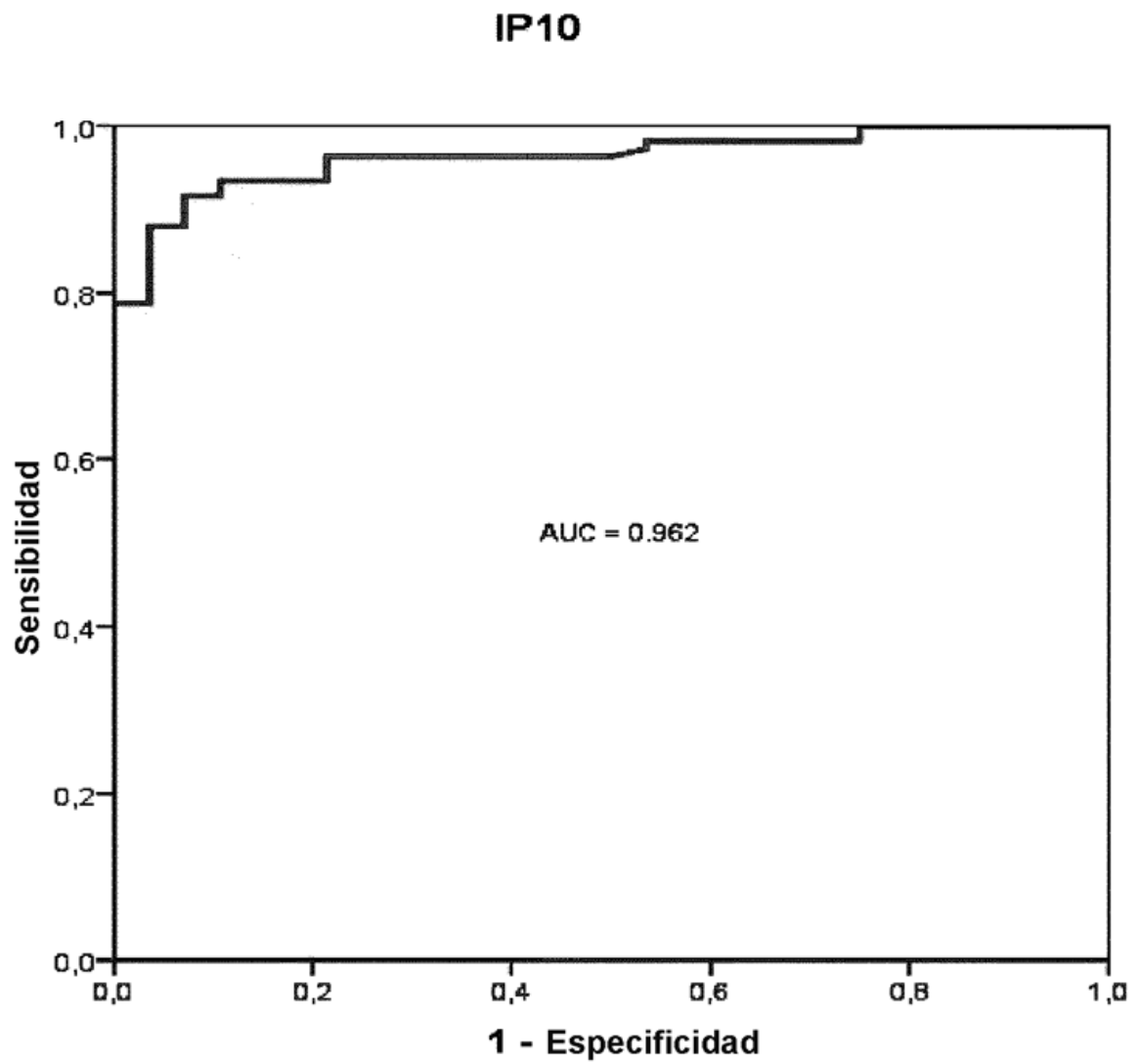


Figura 4

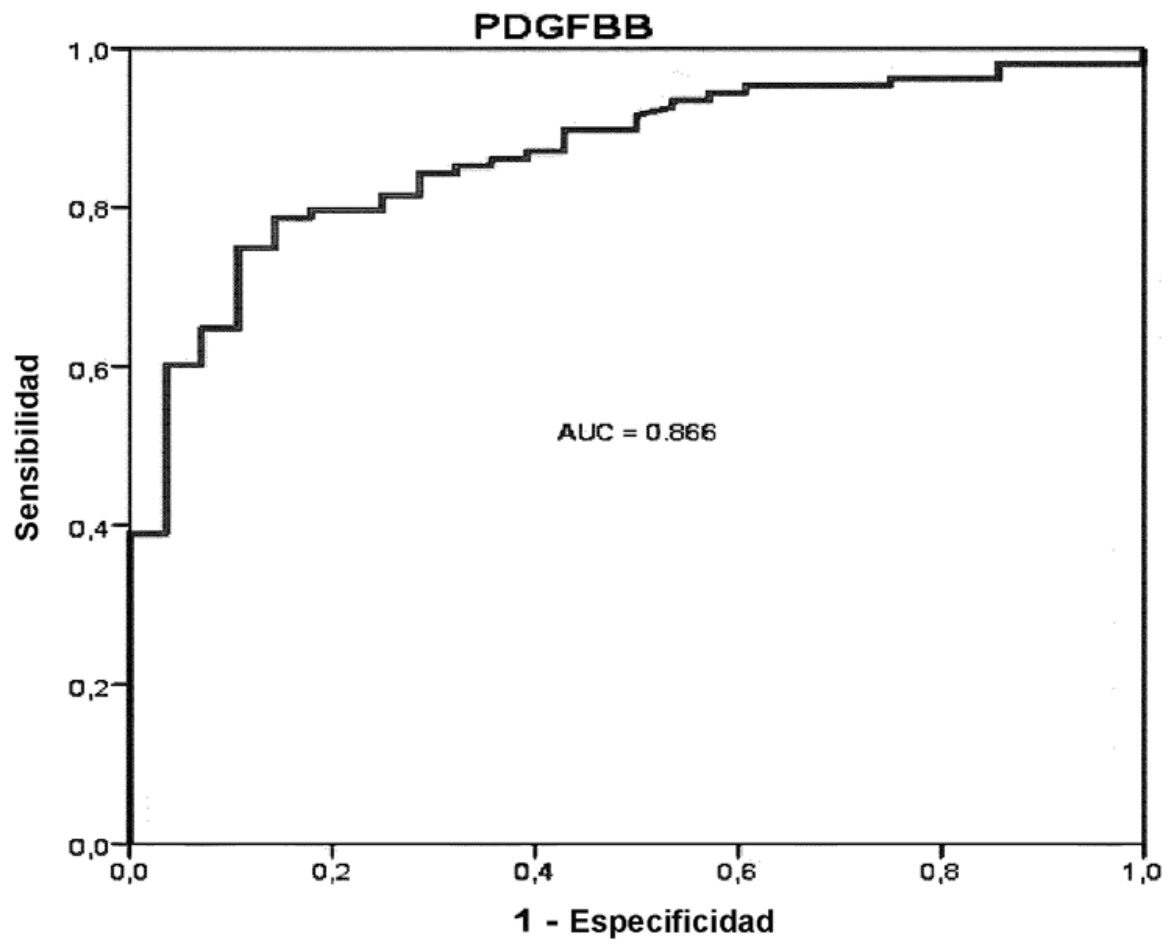




Figura 5

