



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 903**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04764908 .2**

96 Fecha de presentación : **07.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1664789**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico de enfermedades mediante la determinación de apolipoproteína C-I.**

30 Prioridad: **22.09.2003 DE 103 43 815**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2011

73 Titular/es: **B.R.A.H.M.S GmbH**
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE

72 Inventor/es: **Bergmann, Andreas**

74 Agente: **Mir Plaja, Mireia**

ES 2 358 903 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

La presente invención se refiere a los procedimientos para el diagnóstico, la detección precoz, la valoración del riesgo y el control de la evolución de enfermedades en los que se determina en muestras de suero o plasma de pacientes humanos como biomarcador la proteína apolipoproteína C-I.

5 Hay que señalar como premisa que cuando en la siguiente descripción se habla en general de “procedimientos diagnósticos”, este concepto representa por regla general y para simplificar a los procedimientos para el diagnóstico, la detección precoz, la valoración del riesgo y el control de la evolución, incluyendo a un control de la evolución como acompañamiento a la terapia, de enfermedades, a no ser que se desprenda del contexto en concreto que se haga en ese sitio referencia tan sólo a mediciones que persigan específicos objetivos limitados.

10 Además hay que observar que en el contexto de la presente solicitud el concepto de “enfermedades” se usa para enfermedades por regla general severas y crónicas y en particular agudas, y no se refiere a trastornos del lipometabolismo como los que se consideran como factores de riesgo para el desarrollo de una aterosclerosis. Son de destacar como “enfermedades” las enfermedades cancerosas.

15 Se califican de “apolipoproteínas” las proteínas que forman las lipoproteínas junto con lípidos (triglicéridos, colesterol, fosfolípidos). Una función importante de las apolipoproteínas es la de permitir el transporte de los lípidos hidrosolubles en el suero y el plasma. Las lipoproteínas se clasifican sobre la base de su comportamiento de migración en el gradiente de densidad de una ultracentrífuga en cuatro distintas clases de densidad: los quilomicrones, las VLDL (de: very low-density lipoproteins = lipoproteínas de muy baja densidad), las LDL (de: low-density lipoproteins = lipoproteínas de baja densidad) y las HDL (de: high-density lipoproteins = lipoproteínas de alta densidad). Adicionalmente se distingue un grupo denominado lipoproteína (a). La porción de lípidos de las lipoproteínas es tanto más baja cuanto más alta es su densidad. Las lipoproteínas de las distintas clases de densidad no se diferencian sobre la base de la cantidad de la porción de lípidos total existente, sino también considerando su composición. Además pueden asignarse a las respectivas clases de densidad también típicos perfiles de apolipoproteínas.

25 Las apolipoproteínas son proteínas de distinta longitud y composición de aminoácidos que se asignan a grupos denominados con las letras mayúsculas A-H, distinguiéndose de nuevo dentro de los distintos grupos entre distintas proteínas que se caracterizan mediante un número añadido. En lugar de la designación completa de p. ej. apolipoproteína A-I ha adquirido carta de naturaleza también hablar sencillamente tan sólo de apo A-I. Las estructuras primarias (las secuencias de aminoácidos) de las distintas apolipoproteínas son conocidas, y para una serie de las distintas apolipoproteínas existen también datos o ideas concretas sobre su estructura espacial, en particular en asociación con lípidos. Pueden sacarse datos más concretos de la correspondiente literatura científica.

30 Es conocida la técnica de determinar también selectivamente apolipoproteínas en relación con la obtención de datos de medición sobre el lipometabolismo de un paciente, en particular para la detección precoz de un riesgo de aterosclerosis o bien para el control de la terapia en el tratamiento de un paciente con medicamentos lipidorreductores. Al hacer esto se aprovecha la circunstancia de que determinadas apolipoproteínas surgen exclusivamente o al menos preponderantemente en lipoproteínas de las distintas clases de densidad de lipoproteínas anteriormente mencionadas y determinan su especificidad, con lo cual mediante una determinación de la porción de apolipoproteína de las lipoproteínas también puede determinarse la porción de éstas últimas en un suero o plasma de un paciente.

35 Es también sabido que en determinados pacientes y debido a considerables influencias que influyen la formación de las apolipoproteínas o de las enzimas que las disocian, o que se manifiestan como defectos de los receptores, se encuentran perfiles de lipoproteínas y apolipoproteínas que se desvían de los normales. Es además sabido que también como acompañamiento a otras enfermedades pueden producirse trastornos del lipometabolismo (dislipoproteinemias secundarias) que son de naturaleza temporal y tras la curación de la enfermedad desaparecen de nuevo (véase (20), páginas 186-189; las referencias a la literatura en forma de números entre paréntesis se refieren a la bibliografía adjunta). En la medida en que las modificaciones del lipometabolismo se manifiestan también como modificaciones de las composiciones de apolipoproteínas, en la literatura científica están documentadas en primera línea aquellas modificaciones que afectan a las apolipoproteínas A-I y A-II y que por regla general reflejan formas y concentraciones anormales de las HDL. Las apolipoproteínas no desempeñan sin embargo papel práctico digno de mención alguno como biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades para las que es sabido que van también acompañadas de trastornos del lipometabolismo.

40 En el marco de la presente solicitud se trata de la determinación de la apolipoproteína C-I a efectos diagnósticos. La apolipoproteína C-I pertenece a un grupo de apolipoproteínas con un peso molecular comparativamente bajo, que se denominan apolipoproteínas apo C-I, apo C-II y apo C-III. Las estructuras primarias de estas tres proteínas son conocidas (véanse (1), (2) y, con respecto a la apolipoproteína C-I, en particular (3)). Sobre la función de las apolipoproteínas C-I y C-III se sabe relativamente poco, y sobre las modificaciones de las cantidades y las formas y las formas de asociación de la apolipoproteína C-I en el suero o el plasma humano en dependencia de determinados estados de enfermedad no hay conocimientos documentados de tipo alguno. Son representativas de las publicaciones de la literatura científica que se refieren a las apolipoproteínas del grupo C o a la apolipoproteína C-I publicaciones según (1) a (18), proporcionando en particular el trabajo según (11) una buena visión de conjunto de lo que es sabido sobre el papel que desempeñan las apolipoproteínas C en el metabolismo de las lipoproteínas. Pertenecen a los efectos

biológicos descritos para la apolipoproteína C-I en primera línea la inhibición de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), la amortiguación de la proteína (LRP) relacionada con el receptor de las LDL (LDLR) y del propio LDLR y del receptor de las VLDL (VLDLR), así como la activación de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT).

5 Del contenido de las publicaciones anteriormente mencionadas no son deducibles conocimientos que pudiesen permitir una determinación de apolipoproteína C-I como biomarcador para el diagnóstico de enfermedades tales como p. ej. la sepsis o el cáncer, o que pudiesen sugerir la conveniencia de una determinación de apolipoproteína C-I en los contextos diagnósticos anteriormente mencionados.

10 La presente invención es el resultado de sistemáticos trabajos de investigación de la solicitante que tienen como objetivo investigar las modificaciones de la composición de proteínas de pacientes con sepsis y hacer selectivamente uso de los resultados obtenidos de la investigación para la diagnosis de sepsis y de inflamaciones.

15 Fue punto de partida de estas investigaciones la constatación de que en la sepsis la prohormona procalcitonina está drásticamente incrementada y de que la determinación de procalcitonina como biomarcador para sepsis para el diagnóstico y para el control evolutivo como acompañamiento a la terapia es de alto valor práctico (véase p. ej. la EP 656 121 B1). Conocimientos de mayor alcance sobre la modificación de la composición de proteínas en el suero o plasma de pacientes de sepsis, que fueron obtenidos por la solicitante partiendo de distintos planteamientos de investigación, se encuentran por ejemplo en la publicación de solicitud de patente EP 1 121 600 A2, así como en
20 adicionales publicaciones de solicitudes de patente de fecha anterior, tales como los documentos WO 02/085937, WO 03/005035, WO 03/002600, EP 1 355 158 A1, EP 1 318 406 A1, EP 1 318 407 A1 y EP 1 355 159 A1, y en adicionales solicitudes de patente aún no publicadas de la solicitante sobre este tema. Se hace referencia al contenido de las mencionadas solicitudes de patente en particular con respecto a las aclaraciones sobre la moderna comprensión del concepto de sepsis y a la importancia de la determinación de biomarcadores en caso de sepsis.

25 Puesto que algunas de las investigaciones habían puesto de manifiesto que en caso de sepsis están también significativamente incrementados los de una serie de biomarcadores que tradicionalmente habían venido siendo considerados tan sólo como típicos marcadores de cáncer (véanse los documentos EP 1 318 402 A1, EP 1 318 403 A1, EP 1 318 404 A1 y EP 1 318 405 A1), fueron de manera creciente y paralelamente al análisis de muestras de pacientes de sepsis también tomadas en consideración muestras de plasma y suero de pacientes que padecían de distintas enfermedades tumorales malignas. En muchos de los casos investigados se puso de manifiesto que distintos biomarcadores que se encuentran incrementados en caso de sepsis están también significativamente incrementados en
30 pacientes de cáncer. En numerosos casos quedaron sin embargo también de manifiesto claras diferencias que impiden tratar según un enfoque simplista y en general como básicamente análogas a las enfermedades de sepsis y a las enfermedades tumorales malignas.

35 La invención que se describe en la presente solicitud es resultado de otro planteamiento de investigación para la determinación de proteínas que son potencialmente adecuadas como biomarcadores a efectos diagnósticos, porque sus cantidades mensurables en pacientes de sepsis y dado el caso en pacientes que padecen de otras enfermedades graves, y en particular de enfermedades inflamatorias o de enfermedades cancerosas, están significativamente incrementadas en comparación con las personas sanas. Se compararon para ello perfiles de HPLC (HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución) de fracciones de suero y plasma de pacientes de sepsis con los de personas normales aparentemente sanas, y las significantes modificaciones de los perfiles de cromatografía HPLC fueron sometidas a un más detenido examen. Estas investigaciones proporcionaron los resultados que pasaron a
40 constituir la base de la presente invención, concretamente en el sentido de que son detectables significantes modificaciones de los perfiles de elución por HPLC de muestras de suero o plasma de pacientes, cuando estas muestras fueron previamente fraccionadas por medio de una columna con un material cromatográfico que está en condiciones de entrar en interacción con componentes hidrofóbicos y lipofílicos de la muestra y de fijar selectivamente tales componentes ("cromatografía de interacción hidrofóbica"). Si a continuación se eluyen de manera adecuada los
45 componentes de la muestra que se ha presentado que han quedado fijados al material cromatográfico, se obtiene una subfracción de la muestra de suero o plasma original en la que hay un selectivo enriquecimiento en componentes, y en particular también en los de naturaleza proteínica, que están en condiciones de entrar en interacción con superficies hidrofóbicas. Está descrita en (19) una variante de un procedimiento de este tipo en aplicación a lipoproteínas.

50 En la US 2001/0005714 A1 se propone aprovechar el hecho de que las apolipoproteínas presentan en su estructura segmentos anfipáticos para inhibir la absorción de colesterol y otros lípidos desde el intestino, usando como medicamentos apolipoproteínas u otras moléculas con estructuras antipáticas que se asemejan a las apolipoproteínas. Para el aislamiento de apolipoproteínas a partir de fuentes naturales se usa la cromatografía de interacción hidrofóbica.

55 La solicitud WO 03/076594 publica métodos para diagnosticar y tratar enfermedades cancerosas detectando y eventualmente reactivando genes (supresores tumorales) epigenéticamente desactivados. Uno de los 58 genes (supresores tumorales) epigenéticamente desactivados identificados es el de la apo C-I. La WO 03/076594 (párrafos 55-57) correlaciona a las de una serie de distintas enfermedades cancerosas con tales genes (supresores tumorales) epigenéticamente desactivados, entre los cuales está también el gen de la apo C-I.

La separación de tales fracciones de plasmas y sueros de pacientes con sepsis y otras enfermedades mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) proporcionó el sorprendente conocimiento en el que se basa la

5 presente invención y que consiste en que en los sueros de pacientes con sepsis y de otros pacientes determinados está
 10 marcadamente reducido o bien falta aparentemente del todo un componente que se encuentra de manera claramente
 15 destacada en los sueros y plasmas de personas normales sanas. Las investigaciones que a continuación se efectuaron
 20 sobre la naturaleza de este componente, que serán descritas más detalladamente a continuación, hicieron patente que
 25 en cuanto al componente significativamente reducido se trata de la apolipoproteína C-I. Las adicionales investigaciones
 30 que se efectuaron a continuación y que se describen asimismo más detalladamente de aquí en adelante, condujeron
 35 entonces a la obtención del adicional y sorprendente resultado de que los hallazgos que en una primera valoración
 provisional hablaban a favor de un paralelismo de las modificaciones en los pacientes de sepsis y de cáncer, en realidad
 deben delimitarse claramente entre sí y permiten, mediante la medición de apolipoproteína C-I en el suero o plasma de
 pacientes humanos, distinguir claramente las enfermedades de sepsis de las enfermedades cancerosas, lo cual
 representa como tal un conocimiento del que puede hacerse uso a efectos diagnósticos.

15 Puede expresarse como finalidad de la presente invención la de descubrir y utilizar a efectos diagnósticos un nuevo
 20 biomarcador proteínico adecuado para determinaciones diagnósticas para la detección de enfermedades cancerosas,
 25 cuya aparición cuantitativa en suero o plasma humano se diferencie de la manera siguiente de los valores hallados en
 30 personas normales aparentemente sanas: La inmunorreactividad de apolipoproteína C-I está incrementada en la
 35 muestra en comparación con las personas de control sanas y la porción de apolipoproteína C-I que se une a estructuras
 moleculares hidrofóbicas está significativamente reducida en comparación con las personas de control sanas, de forma
 tal que la concentración de apolipoproteína C-I determinada directamente en la muestra con un inmunoensayo y la
 concentración de apolipoproteína C-I en la muestra que fue tratada con un medio de adsorción con superficies
 hidrofóbicas presentan valores equiparables; representando su determinación por consiguiente una valiosa herramienta
 diagnóstica.

Esta finalidad es alcanzada mediante un procedimiento según la reivindicación 1.

Están indicados en las reivindicaciones dependientes perfeccionamientos preferidos.

25 Cuando en la presente solicitud o en las reivindicaciones se mencionan como especies a determinar además de la
 30 apolipoproteína C-I también "sus derivados", deben entenderse como tales en particular fragmentos y agregados, y en
 particular aquéllos que en el respectivo procedimiento de determinación elegido se comportan como la proteína
 35 apolipoproteína C-I libre. Los "derivados" pueden ser p. ej. moléculas de apolipoproteína C-I acortadas en distintos
 aminoácidos o distintas secuencias de aminoácidos, o bien también moléculas de apolipoproteína C-I completas
 modificadas estérica o conformacionalmente, p. ej. por agregación.

30 Los nuevos conocimientos, que permiten el uso de apolipoproteína C-I como biomarcador, indican que en pacientes que
 padecen de enfermedades cancerosas la cantidad detectable de apolipoproteína C-I que se une a estructuras
 moleculares hidrofóbicas está fuertemente reducida en comparación con las personas normales aparentemente sanas.
 35 Puede sacarse de ello la conclusión de que en las enfermedades mencionadas la indicada apolipoproteína C-I es
 formada o consumida en cantidades insuficientes y/o fijada anormalmente, lo cual en comparación con las personas
 sanas puede interpretarse como insuficiencia de apolipoproteína C-I.

40 Todas las circunstancias y enseñanzas o proteger que se describen al comienzo y en las reivindicaciones a las que se
 hace referencia se aclaran más detalladamente a continuación haciendo referencia a datos experimentales y a las
 correspondientes figuras, aclarándose también al mismo tiempo complementariamente el significado de distintos
 45 conceptos que se usan en la presente descripción. Para la interpretación de las reivindicaciones y para precisar lo
 expuesto hasta aquí en general se hace por consiguiente explícitamente referencia a lo que se expone a continuación.

Las distintas figuras muestran lo siguiente:

45 La Fig. 1, los perfiles de elución de la HPLC de C18 en fase inversa de fracciones de suero y plasma que eran eluibles
 con ácido acético (50mM) desde columnas cromatográficas de octilsefariosa que habían sido cargadas con sueros y
 plasmas de (a) personas normales aparentemente sanas, (b) pacientes con distintas enfermedades tumorales malignas
 y (c) de pacientes de sepsis, tras un lavado intermedio de las columnas cargadas con solución salina tamponada con
 fosfato (PBS);

50 la Fig. 2, las cantidades relativas de apolipoproteína C-I eluible obtenidas mediante integración de picos de perfiles de
 elución por HPLC del tipo que se muestra en la Fig. 1 en muestras de personas normales aparentemente sanas y de
 pacientes que padecían de enfermedades de distintos tipos (sepsis, tumor, infarto de miocardio, angina de pecho,
 enfermedades de obturación arterial, enfermedad de Crohn, enfermedad de Basedow, tiroiditis autoinmune, diabetes
 tipo I, diabetes tipo II, artritis reumatoidea, enfermedad de Alzheimer, sueros HIV positivos; diagnósticos
 respectivamente asegurados clínica e independientemente);

la Fig. 3, la curva patrón de un inmunoensayo en sándwich que trabaja con dos anticuerpos anti-apolipoproteína C-I
 policlonales purificados por afinidad, como la que es obtenida usando apolipoproteína C-I sintética como patrón;

55 la Fig. 4, los resultados de la determinación directa de apolipoproteína C-I en sueros y plasmas de personas normales
 aparentemente sanas, pacientes de sepsis y pacientes tumorales mediante el uso de un inmunoensayo en sándwich
 para la apolipoproteína C-I, del cual se muestra una típica curva de ajuste en la Fig. 3, y

la Fig. 5, los resultados de una repetición de las mediciones cuyos resultados se muestran en la Fig. 4, después de haber sido las respectivas muestras tratadas con octilsefarosa.

Descripción de los ensayos realizados y de los resultados obtenidos

A. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

5 1. Obtención de fracciones de suero o plasma que contienen los componentes de suero/plasma humano que se fijan a superficies hidrofóbicas y son eluibles de las mismas.

10 Muestras de respectivamente 0,5 ml de sueros/plasmas de personas normales aparentemente sanas y de pacientes que padecían de una serie de enfermedades diagnosticadas clínica e independientemente fueron mezcladas con 0,5 ml de material cromatográfico de octilsefarosa (fuente de adquisición: Pharmacia; 0,25 ml de material empaquetado, lavado en PBS) en PBS e incubadas por espacio de 10 min. a temperatura ambiente y con ligera agitación. A continuación se introdujo la mezcla en una columna de polipropileno (de 5 mm de diámetro), y mediante lavado con 20 ml de PBS las sustancias no fijadas fueron separadas de las sustancias fijadas al material de octilsefarosa.

La desorción de las sustancias (proteínas) fijadas al material de octilsefarosa se hizo mediante elución con ácido acético 50mM (pH 2,5).

15 2. HPLC de C18 en fase inversa

El eluido con ácido acético obtenido de las columnas de octilsefarosa fue en cada caso analizado directamente mediante HPLC de C18 en fase inversa por medio de una columna μ Bondapak C18 (3,9 x 300 mm, Millipore, Waters).

20 Para la cromatografía HPLC se usaron gradientes de un eluyente A (mezcla de 95 partes volumétricas de agua, 5 partes volumétricas de acetonitrilo y 0,1 partes volumétricas de ácido trifluoroacético) y de un eluyente B (10 partes volumétricas de agua, 90 partes volumétricas de acetonitrilo, 0,1 partes volumétricas de ácido trifluoroacético).

Tras la aplicación del eluido con ácido acético a la columna de HPLC se hizo el análisis en el siguiente gradiente de eluyente A/eluyente B:

t = 0-5 min. de 100/0 (A/B) a 65/35 (A/B)

t = 5-20 min. de 65/35 (A/B) a 40/60 (A/B)

25 t = 20-22 min. de 40/60 (A/B) a 0/100 (A/B).

La velocidad de paso fue de 1 ml/min. El flujo de salida de la columna fue medido continuamente con respecto a la absorción a 214 nm.

La Fig. 1 muestra tres típicos perfiles de elución para fracciones de muestras de pacientes normales aparentemente sanos (a), de pacientes con distintas enfermedades tumorales (b), y de pacientes con sepsis (c).

30 Se puso sorprendentemente de manifiesto que los perfiles de elución por HPLC de los grupos de personas mencionados se diferencian clara y sistemáticamente entre sí. La banda decisiva para la presente solicitud es aquella que es eluida a los 17,05 min.

Esta banda fue cuantificada relativamente mediante integración del pico para todas las muestras de suero y plasma analizadas, y las cantidades relativas de sustancia determinadas de esta manera para una pluralidad de muestras de control y de pacientes están representadas gráficamente en la Fig. 2. Se analizaron en concreto las muestras siguientes:

40 42 muestras de pacientes tumorales (9 x cáncer intestinal, 7 x carcinoma bronquial, 13 x carcinoma de mama, 8 x carcinoma ovárico, 5 x carcinoma de páncreas), 22 muestras de pacientes con sepsis, 7 muestras de pacientes con infarto de miocardio (Hi), 4 muestras de pacientes con angina de pecho (APe), 5 muestras de pacientes con enfermedades de obturación arterial (AVK), 6 muestras de pacientes con enfermedad de Crohn (MC), 11 muestras de pacientes con enfermedad de Basedow, 4 muestras de pacientes con tiroiditis autoinmune (AIT), 10 muestras de pacientes con diabetes tipo I (D-Typ 1), 6 muestras de pacientes con diabetes tipo II (D-Typ II), 3 muestras de pacientes con artritis reumatoidea (RA), 2 muestras de pacientes con Alzheimer (AD) y 6 muestras de pacientes HIV-positivos.

45 Como se desprende inmediatamente de la Fig. 2, para las muestras de personas normales sanas se hallan valores claramente positivos para la sustancia que corresponde al pico medido a los 17,05 min. En las muestras de pacientes enfermos, y concretamente muy en particular con claridad en las muestras de pacientes con sepsis, pacientes tumorales, pacientes con las afecciones cardíacas manifiestas/agudas (Hi, APe, AVK), así como pacientes con enfermedad de Crohn, se miden porciones muy significativamente reducidas de la misma sustancia. También para pacientes con diabetes tipo I y diabetes tipo II se hallan valores significativamente reducidos, si bien no en igual medida, en comparación con las personas sanas. Para los pacientes con enfermedad de Basedow, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoidea y enfermedad de Alzheimer, así como para los pacientes HIV-positivos, las correspondientes desviaciones

de la concentración son menores, o sea que no son estadísticamente significantes.

Están resumidos en la tabla siguiente los valores medios de las cantidades relativas halladas obtenidos para los distintos grupos de muestras:

Clase de muestra	Media (unidades de absorción relativas)
Controles	640
Sepsis	30
Tumor	80
Infarto de miocardio	80
Angina de pecho	140
Enfermedades de obturación arterial	80
Enfermedad de Crohn	80
Enfermedad de Basedow	320
Tiroiditis autoinmune	1130
Diabetes tipo I	180
Diabetes tipo II	200
Artritis reumatoidea	1130
Alzheimer	440
HIV-positivos	480

5 3. Identificación de las bandas usadas para la caracterización de las muestras (bandas eluidas a los 17,5 min.)

10 Para la identificación se recogió, se secó (speed vac) y se sometió a análisis de péptidos la sustancia eluida correspondiente a estas bandas. En un análisis de secuencia del terminal N fue determinada la secuencia TPDVS. El peso molecular determinado mediante espectro de masas (ESI MS) (ESI MS = espectro de masas por ionización por electronebulización) es de 6630 ± 15 D. Estos resultados estaban en inequívoca correlación con los datos conocidos para la apolipoproteína C-I humana (véase p. ej. (3)), que presenta la secuencia de péptidos según la ID SEC N° 1 (véase también el N° 3660227 de Acceso a la base de datos SWISS PROT) y presenta un peso molecular teórico de 6627 D.

Tras la digestión con tripsina de la sustancia y la subsiguiente espectroscopia de masas (ESI MS; "Trypsin-Fingerprinting") quedó plenamente confirmada la correspondencia establecida.

15 A la apolipoproteína C-I determinable trabajando cromatográficamente de la manera que se ha descrito se la denomina también dentro del marco de la presente solicitud "apolipoproteína C-I libre". Dicha apolipoproteína presenta las propiedades de unirse desde una muestra de suero o plasma (en dilución en PBS) a estructuras moleculares hidrofóbicas, como p. ej. los residuos octilo de un material cromatográfico hidrofóbico de octilsefarosa, del cual puede ser eluida bajo condiciones típicas de la elución de proteínas, en particular con ácido acético diluido. El uso del concepto de "apolipoproteína C-I libre" no significa sin embargo necesariamente que el material separable mediante cromatografía de interacción hidrofóbica tenga que estar en forma totalmente libre en las muestras originales. Los asociados o agregados, también con lípidos, que bajo las condiciones de ensayo se disgreguen al establecer contacto con octilsefarosa con unión de la apolipoproteína C-I al material cromatográfico, deben asimismo considerarse como "apolipoproteína C-I" en el sentido del uso de este concepto en la presente solicitud.

25 Con ello, las "estructuras moleculares hidrofóbicas" pueden también ser partes de la superficie de un material cromatográfico hidrofóbico. Dichas estructuras moleculares hidrofóbicas pueden sin embargo también ser moléculas individuales con regiones estructurales hidrofóbicas por medio de las cuales pueda producirse una unión de una molécula de este tipo a apolipoproteína C-I, o sea que pueden ser p. ej. moléculas con estructuras hidrofóbicas que puedan ser marcadas y que p. ej. en ensayos homogéneos puedan servir para la marcación de apolipoproteína C-I en un líquido de muestra. Existe la capacidad de unión a "estructuras moleculares hidrofóbicas" cuando las regiones de la apolipoproteína C-I de la muestra que están disponibles para una unión de este tipo no están bloqueadas por otras sustancias, como p. ej. los lípidos de las lipoproteínas. Incluso cuando p. ej. se habla de que se determinan aquellas porciones de apolipoproteína C-I que se unen a octilsefarosa, esto no significa que para la determinación tenga que utilizarse realmente una unión a octilsefarosa. Antes bien, una indicación de este tipo debe entenderse como caracterización de la sustancia a determinar, también cuando ésta sea determinada según procedimientos del todo distintos. P. ej., la correspondiente apolipoproteína C-I puede ser la misma que también se determina mediante un inmunoensayo, como se describe a continuación.

B. DETERMINACIONES INMUNODIAGNÓSTICAS DIRECTAS DE APOLIPOPROTEÍNA C-I EN SUEROS/PLASMAS

1. Inmunoensayo de la apolipoproteína C-I

Para la determinación inmunodiagnóstica directa de apolipoproteína C-I en suero se construyó un inmunoensayo del tipo sándwich a partir de los componentes que se describen a continuación:

- 5 a) Tubos recubiertos: Tubitos de poliestireno (Greiner) fueron recubiertos con un anticuerpo policlonal purificado por afinidad contra la apolipoproteína C-I de los que están disponibles comercialmente (fuente de adquisición: Acris Antibody, de Bad Neuheim, Alemania). El anticuerpo había sido obtenido según las indicaciones del fabricante mediante
 10 inmunización de conejos con apo C-I humana y había sido purificado por medio de una columna de afinidad de sefarosa con apolipoproteína C-I humana. Para el recubrimiento fueron unidos 0,2 µg de anticuerpo en 300 µl de PBS a tubitos de poliestireno (Greiner, Alemania) que estaban recubiertos con anticuerpos IgG de cordero anti-conejo (Sigma). La unión quedó concluida tras 18 horas a temperatura ambiente. Los tubitos fueron a continuación lavados 2 veces con 3 ml de albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% en PBS cada vez. Tras su secado en vacío los tubitos fueron usados como fase estacionaria para el inmunoensayo de la apolipoproteína C-I.
- 15 b) Anticuerpo marcado con éster de acridinio: 100 µg de otro anticuerpo contra la apolipoproteína C-I humana (de conejo; fuente de adquisición: Academie Bio-Medical Company, de Texas, EE.UU.) en 100 µl de PBS fueron transformados con 10 µg de HNS-éster de acridinio (en 10µl de acetónitrilo). Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente se hizo la purificación del anticuerpo marcado separando los componentes no transformados de la mezcla de reacción mediante HPLC en SW 300 (Waters). Para su uso en el inmunoensayo, el anticuerpo marcado fue ajustado a aprox. 1 millones de RLU/300 µl (RLU = unidades relativas de luz) en PBS con un 0,5% de BSA y 1 mg/ml de IgG de conejo para la saturación de las paredes de los tubitos.
- 20

2. Realización de la determinación inmunodiagnóstica de apolipoproteína C-I en muestras de suero y plasma

Muestras de suero y plasma fueron diluidas a 1:10.000 con PBS y BSA al 0,5%. En cada caso 300 µl de ello fueron pipetados al interior de los tubitos anteriormente mencionados recubiertos con el anticuerpo inmovilizado, y fueron a continuación incubados por espacio de 4 horas a temperatura ambiente bajo agitación (300 rpm en un agitador orbital
 25 Heidolph). El contenido de los tubitos fue a continuación lavado con PBS (efectuando 4 veces llenado y decantación con 1 ml de PBS cada vez), y la apolipoproteína C-I fijada a la pared del tubito fue transformada por espacio de 20 horas a temperatura ambiente y a 300 rpm con 300 µl por tubito del anticuerpo anti-apolipoproteína C-I marcado con éster de acridinio. A continuación fue retirado el anticuerpo marcado no fijado mediante 5 lavados con 1 ml de PBS cada vez, y la quimioluminiscencia restante fue medida de manera conocida en un luminómetro Berthold 952 T.

30 Para la calibración del ensayo se usó una apolipoproteína C-I sintética. Se muestra en la Fig. 3 una típica curva patrón como la que es obtenida para el ensayo anteriormente descrito.

3. Resultados

Con ayuda del inmunoensayo tipo sándwich que se ha descrito se procedió a la medición de sueros de control de personas normales aparentemente sanas como los que fueron también utilizados para los análisis cromatográficos, así
 35 como de muestras de pacientes con sepsis y de pacientes tumorales. La medición de las muestras de pacientes con sepsis confirmaron en esencia los resultados de los análisis por HPLC, habiéndose obtenido para la apolipoproteína C-I unos valores de medición significativamente reducidos en comparación con las personas normales. En la medición de muestras de pacientes tumorales, para las que en los análisis cromatográficos fueron asimismo determinadas unas concentraciones reducidas, fueron sin embargo obtenidos valores de medición tendencialmente incrementados. Los resultados están representados gráficamente en la Fig. 4.

40

Para verificar la cuestión de si los distintos resultados obtenidos para los pacientes tumorales en las determinaciones cromatográficas por un lado y en las determinaciones inmunodiagnósticas por otro lado se debían al precedente paso de selección mediante cromatográfica de interacción hidrofóbica, las muestras medidas en el inmunoensayo fueron antes de una adicional determinación tratadas con octilsefarosa para la fijación de las porciones de apolipoproteína C-I
 45 "libres".

4. Tratamiento de las muestras con octilsefarosa

150 µl de las mismas muestras de suero y plasma que habían sido medidas en el inmunoensayo como se ha descrito fueron mezclados con 200 µl de octilsefarosa (Pharmacia, 50 µl de gel en PBS) e incubados por espacio de 1 hora a temperatura ambiente bajo ligera agitación, después de lo cual la octilsefarosa con las porciones de apolipoproteína C-I
 50 fijadas a la misma fue separada mediante centrifugación (15 min. a 2.000 g). El supernatante obtenido fue diluido a 1:5.000 en PBS/BSA al 0,5%, y fue a continuación medido en el inmunoensayo como se ha descrito anteriormente.

Se muestran en la Fig. 5 los resultados obtenidos. Puede apreciarse que mediante el tratamiento con octilsefarosa toda la apolipoproteína C-I "libre" que es detectable en la medición con el inmunoensayo tipo sándwich que se ha descrito fue fijada a la octilsefarosa, con lo cual ya no era detectable apolipoproteína C-I alguna en el supernatante. Se hicieron
 55 similares observaciones para las muestras de pacientes con sepsis tratadas, ya que la mayor parte de las cantidades de

apolipoproteína C-I determinable, ya fuertemente reducidas en comparación con las muestras normales, fue eliminada de la muestra mediante el tratamiento con la octilsefarosa.

Sorprendentemente, la apolipoproteína C-I determinable en un inmunoensayo de la clase que se ha descrito no fue sin embargo eliminada de las muestras de los enfermos tumorales mediante el tratamiento con octilsefarosa.

5 C. DISCUSIÓN

Los resultados que se han descrito demuestran que al menos una gran parte de la apolipoproteína C-I en los sueros y plasmas de pacientes tumorales está en una forma en la que ha perdido su capacidad de fijación a superficies hidrofóbicas, pero sigue siendo determinable como inmunorreactividad en un inmunoensayo. Una posible aclaración para estas observaciones sería la de que en la apolipoproteína C-I que se presenta en los sueros de pacientes tumorales las regiones moleculares que están disponibles para interacciones hidrofóbicas están saturadas o bloqueadas, y concretamente mediante contrapartes de unión que no pueden ser desplazadas por la octilsefarosa. La naturaleza de estas contrapartes de unión es actualmente aún desconocida. No puede sin embargo excluirse la posibilidad de que se trate de sustancias tumor-específicas que como tales o bien debido a la inactivación de contrapartes de unión hidrofóbicas, como p. ej. la apolipoproteína C-I, desempeñan un papel importante para el desarrollo tumoral, p. ej. influenciando negativamente a la respuesta inmune natural o bien promoviendo activamente el crecimiento tumoral. A pesar de que en las muestras analizadas por vía inmunodiagnóstica no es constatable una significativa reducción de la porción de apolipoproteína C-I, los análisis cromatográficos paralelos demuestran que la misma no está "libre" en el sentido que se ha expuesto anteriormente, sino que está en otra forma con una reducida capacidad de unión a contrapartes de unión hidrofóbicas. Por el contrario, la apolipoproteína C-I "libre", es decir la que se une a contrapartes de unión hidrofóbicas, está reducida en los sueros de pacientes tumorales, como en las otras enfermedades, como p. ej. la sepsis.

Sobre la base de los resultados que se han descrito puede presumirse que para pacientes tumorales es ventajoso compensar el trastorno del equilibrio que en los mismos se produce en el sentido de una reducción de la porción de lipoproteína C-I "libre" mediante una aportación externa de apolipoproteína C-I, y que con ello podrá influenciarse positivamente el suceso de enfermedad, p. ej. saturando las contrapartes de unión típicas de tumor mediante apolipoproteína C-I externa y poniendo en disponibilidad apolipoproteína C-I libre adicional.

Una suposición similar, y concretamente la de que una aportación externa de apolipoproteína C-I es ventajosa para compensar la perturbación del nivel de apolipoproteína C-I "libre", es también válida para las otras enfermedades, como p. ej. es el caso de una sepsis. Si en una sepsis está trastornada la producción de apolipoproteína C-I, una aportación externa puede compensar una insuficiencia debida a ello. Si la reducción de apolipoproteína C-I "libre" en el suero/plasma de un paciente con sepsis es debida a que debido a su unión a estructuras tisulares patológicas o dado el caso a estructuras bacterianas insolubles la apolipoproteína C-I es eliminada de la circulación, una aportación externa de apolipoproteína C-I puede compensar la insuficiencia que se produce, o bien puede ocasionar una saturación de los sitios de unión en el tejido patológico o en las estructuras bacterianas. Mediante una supervisión de la concentración de apolipoproteína libre incrementada mediante la aportación externa o de la apolipoproteína determinable como inmunorreactividad en muestras de sangre del paciente tratado puede supervisarse de manera sencilla la cantidad necesaria en cada caso.

La presente invención hace con ello que sea posible también una nueva clase de utilización terapéutica de la apolipoproteína C-I o de adecuados derivados de la misma o de compuestos que simulen su comportamiento fisiológico para el tratamiento de cáncer, sepsis y otras enfermedades que van ligadas a una reducción de la apolipoproteína C-I libre determinable en comparación con las personas sanas.

Bibliografia:

1. Erika Polz et al., Human Apolipoprotein C-I: Concentration in Blood Serum and Lipoproteins, *Biochemical Medicine* 24, 229-237 (1980)
2. Kane, J.P., in "Lipid Metabolism in Mammals" (F.Snyder, Ed.), Vol.1, S. 209, Plenum, New York, 1977
3. Shulman, RS et al., The complete amino acid sequence of C-I (apoLP-Ser), an apolipoprotein from human very low density lipoproteins, *J Biol Chem.* 250, 182-190 (1975)
4. Xiao-Ren Pan et al., Abnormal Composition, of Apolipoproteins C-I, C-II, and C-II in Plasma and Very-Low-Density Lipoproteins of Non-Insulin-Dependent Diabetic Chinese, *Clin. Chem.* 32, No.10, 1914-1920 (1986)
5. Jutta Poensgen, Apolipoprotein C-I inhibits the hydrolysis by phospholipase A₂ of phospholipids in liposomes and cell membranes, *Biochim.Biophys.Acta*, 1042 (1990), 188-192
6. Ming Liu et al., Activation of plasma lysolecithin acyltransferase reaction by apolipoproteins A-I, C-I and E, *Biochim.Biophys.Acta*, 1168 (1993), 144-152
7. Nina D. Bren et al., Quantification of Human Plasma Apolipoproteins C-I, C-II, and C-III by Radioimmunoassays, *Mayo Clin Proc*, July 1993, Vol.68, 657-664
8. Rampratap S. Kushwaha et al., Characterization of cholesterol ester transfer protein inhibitor from plasma of baboons (*Papio sp.*), *J.Lipid Res.* 1993, 34:1285-1297
9. N. Savion et al., Role of apolipoproteins A-I, A-II and C-I in cholesterol efflux from endothelial and smooth muscle cells, *Eur Heart J* (1993) 14, 930-935

10. Janine H. van Ree et al., Inactivation of *ApoE* and *ApoC1* by two consecutive rounds of gene targeting: effects on mRNA expression levels of gene cluster members, *Human Molecular Genetics*, 1995, Vol.4, No.8, 1403-1409
11. Miek C. Jong et al., Role of ApoCs in Lipoprotein Metabolism - Functional differences Between ApoC1, ApoC2, and ApoC3, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*1999; 19:472-484
12. Thomas Gautier et al., Human Apolipoprotein C-I Accounts for the Ability of Plasma High Density Lipoproteins to Inhibit the Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity, *J. Biol. Chem.* 275, No.48, 37504-37509, (2000)
13. Jong M.C. et al., Insights into Apolipoprotein C Metabolism from Transgenic and Gene-Targeted Mice, *Int.J.Tissue React.* XXII (2/3) 59-66 (2000)
14. Neil S. Shachter, Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism, *Current Opinion in Lipidology* 2001, 12:297-304
15. Benjamin W. Atcliffe et al., The interaction of human apolipoprotein C-I with sub-micellar phospholipid, *Eur. J. Biochem.* 268, 2838-2846 (2001)
16. Thomas Gautier et al., Apolipoprotein CI Deficiency Markedly Augments Plasma Lipoprotein Changes Mediated by Human Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) in CETP Transgenic/ApoCI-knocked Out Mice, *J. Biol. Chem.* 277, No.35, 31354-31363 (2002)
17. Puiying A. Mak et al., Regulated Expression of the Apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II Gene Cluster in Murine and Human Macrophages, *J. Biol. Chem.* 277, No.35, 31900-31908 (2002)

18. Johan Björkegren et al., Postprandial Enrichment of Remnant Lipoproteins With ApoC-I in Healthy Normolipidemic Men With Early Asymptomatic Atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1470-1474
19. John G. Raynes et al., Purification of Serum Amyloid A and Other High Density Apolipoproteins by Hydrophobic Interaction Chromatography, *Analytical Biochemistry* 173, 116-124 (1988)
20. Lothar Thomas (Herausgeber): *Labor und Diagnose*, 5. erweiterte Auflage, Frankfurt 200, Kapitel 4 Fettstoffwechsel, S.177-190
21. Cesare R. Sitori, Evaluation of Lipoproteins/Apolipoproteins as Therapeutic Agents for the Treatment of Vascular and Nonvascular Disease, *Am J Cardiol.*, Vol 81, 36F-39F (1998)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft

<120> Procedimiento para el diagnóstico de enfermedades mediante la determinación de apolipoproteína C-I, y su uso en la terapia de enfermedades

<130> 4118PDE

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Pro Asp Val Ser Ser Ala Leu Asp Lys Leu Lys Glu Phe Gly Asn
 1 5 10 15

Thr Leu Glu Asp Lys Ala Arg Glu Leu Ile Ser Arg Ile Lys Gln Ser
 20 25 30

Glu Leu Ser Ala Lys Met Arg Glu Trp Phe Ser Glu Thr Phe Gln Lys
 35 40 45

Val Lys Glu Lys Leu Lys Ile Asp Ser
 50 55

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnóstico, la detección precoz, la valoración del riesgo y el control de la evolución de enfermedades cancerosas, caracterizado por el hecho de que
- 5 - en una muestra de suero o plasma de un paciente humano se determina aquella porción de la apolipoproteína C-I total que está presente en una muestra y que (I) es detectable mediante determinación directa mediante un inmunoensayo tipo sándwich ("inmunorreactividad de apolipoproteína C-I") y (II) cuyo valor de medición no se ve reducido o no se ve significativamente reducido mediante tratamiento de la muestra con un medio de adsorción con superficies hidrofóbicas, y
- de que se deduce la existencia de una enfermedad cancerosa cuando
- 10 - la inmunorreactividad de apolipoproteína C-I en la muestra está incrementada en comparación con las personas de control sanas y la porción de apolipoproteína C-I que se une a estructuras moleculares hidrofóbicas está significativamente reducida en comparación con las personas de control sanas, de forma tal que
- la concentración de apolipoproteína C-I determinada directamente en la muestra con el inmunoensayo y la concentración de apolipoproteína C-I en aquella muestra que fue tratada con un medio de adsorción con superficies hidrofóbicas presentan valores equiparables.
- 15
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que para el tratamiento de la muestra con un medio de adsorción con superficies hidrofóbicas se somete a una muestra de suero o plasma a una cromatografía de interacción hidrofóbica en la que se fija al material cromatográfico apolipoproteína C-I libre.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que como material cromatográfico se usa
- 20 octilsefarosa.

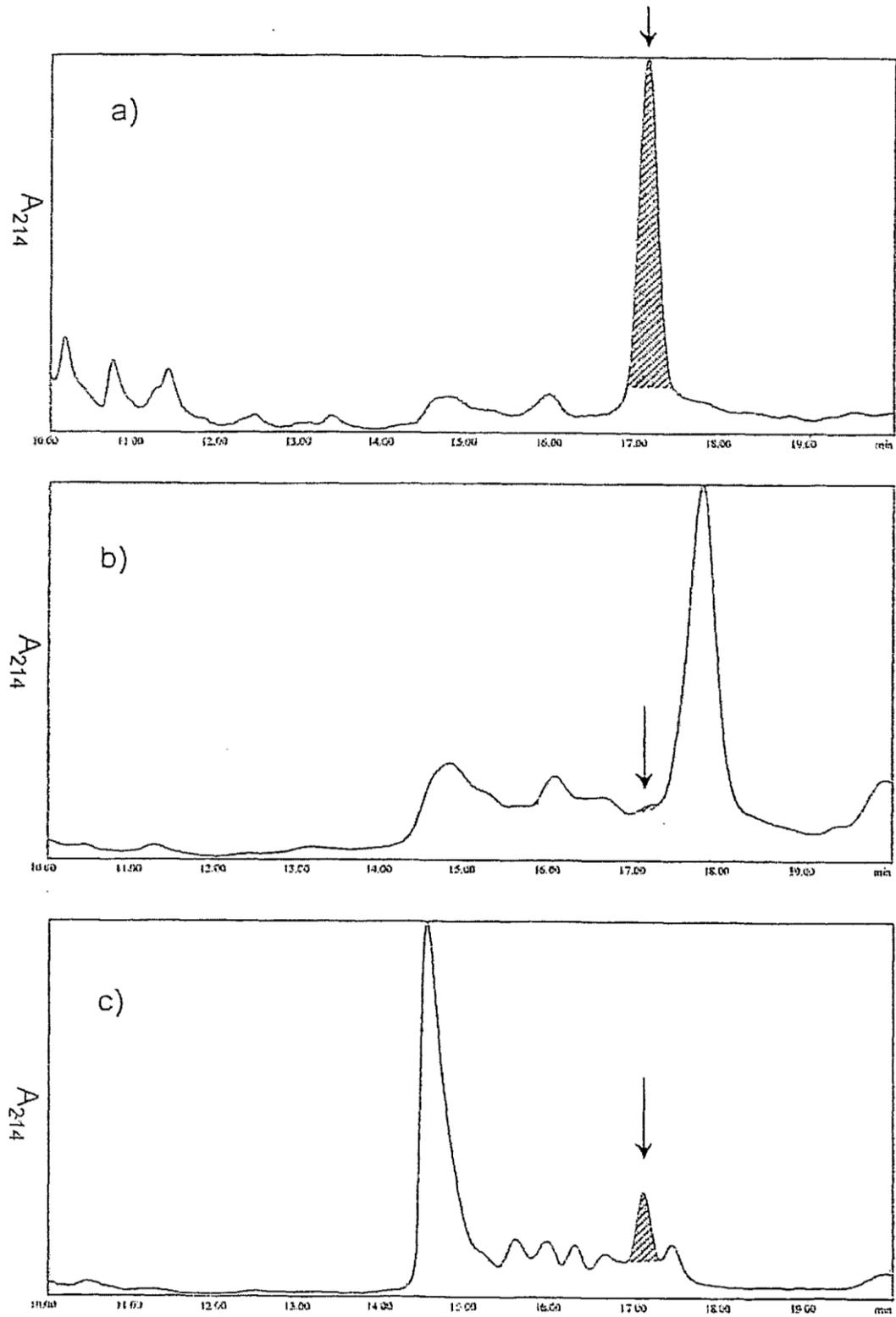


FIG. 1

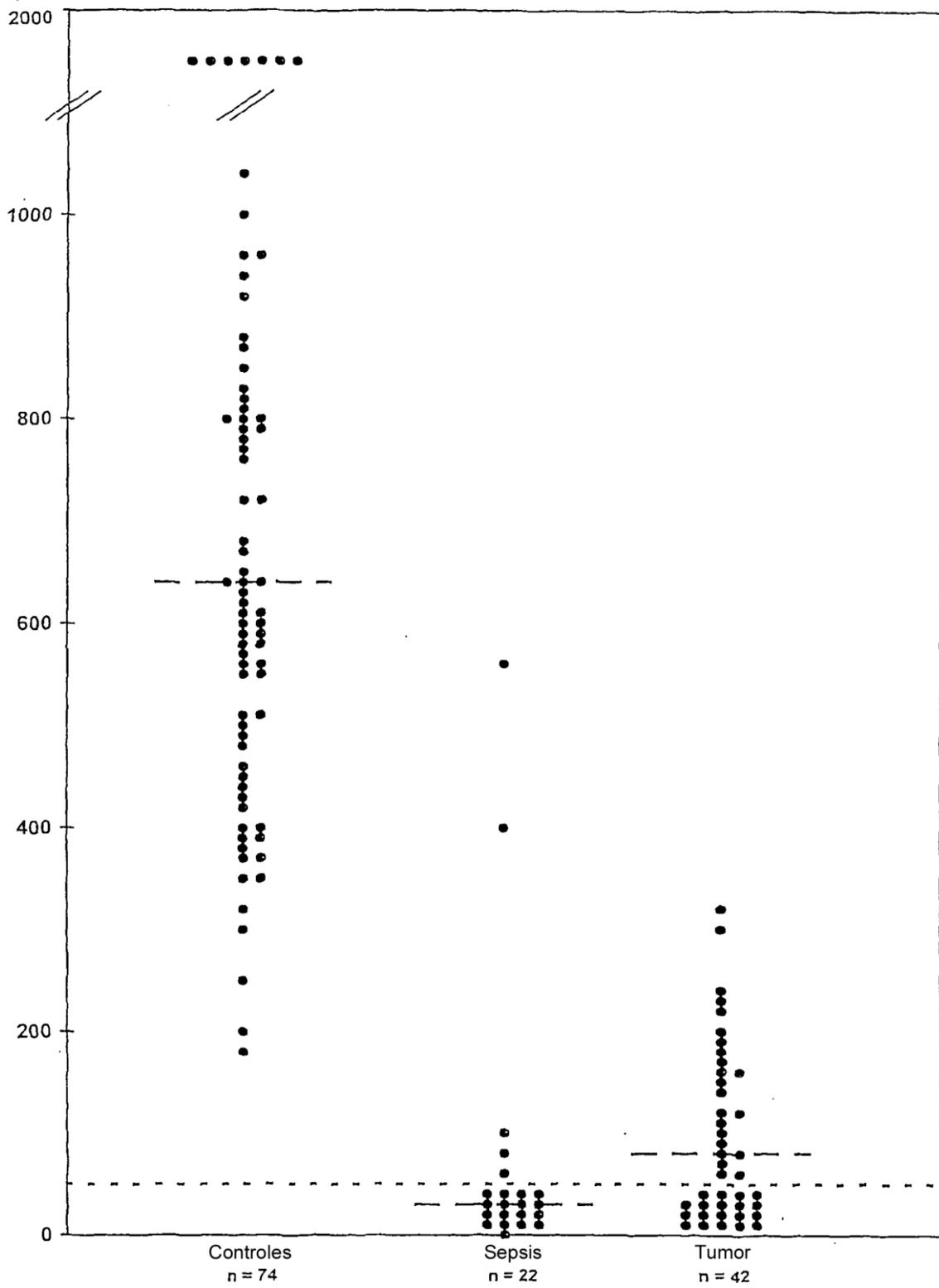


FIG. 2a

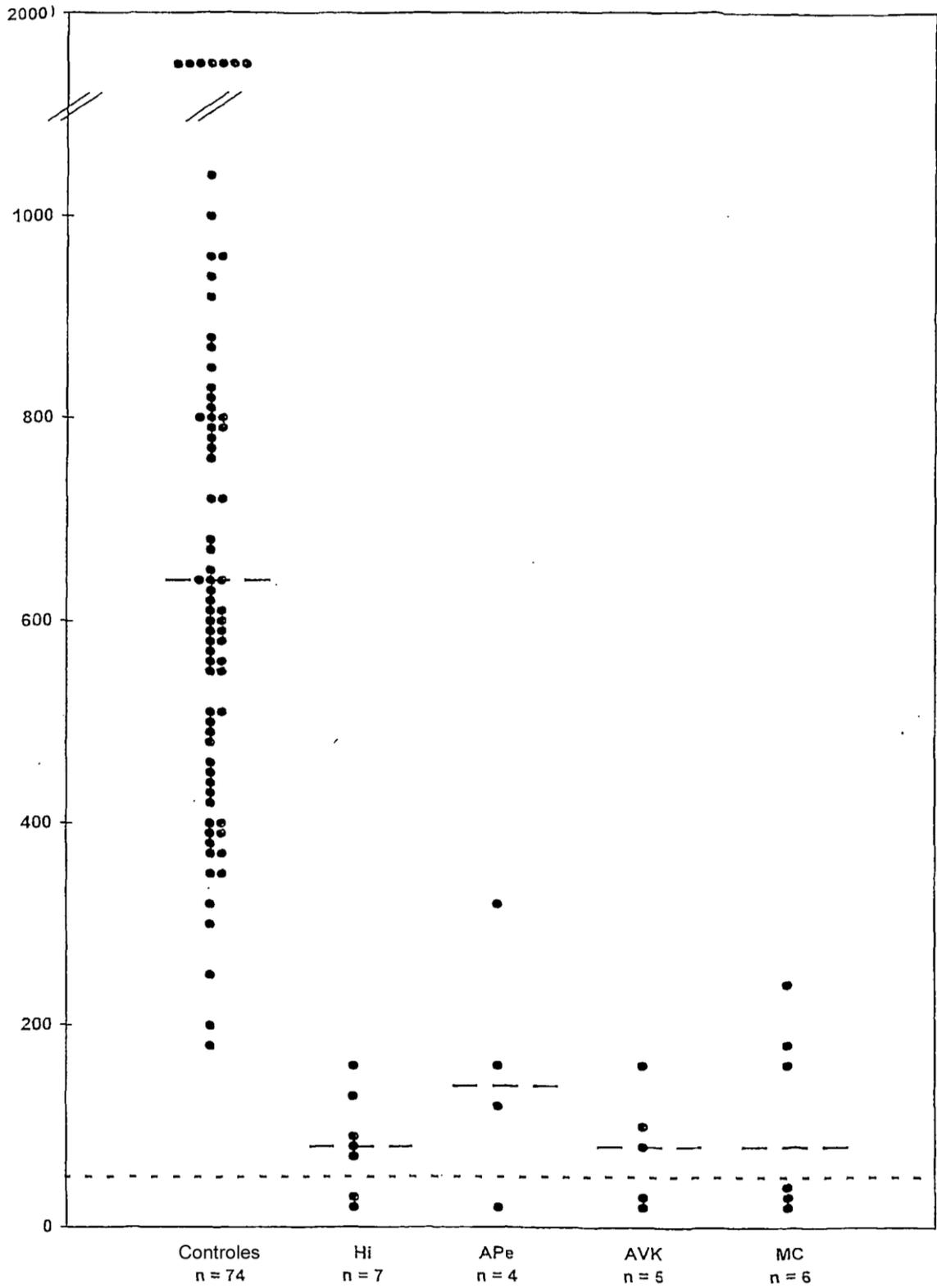


FIG. 2b

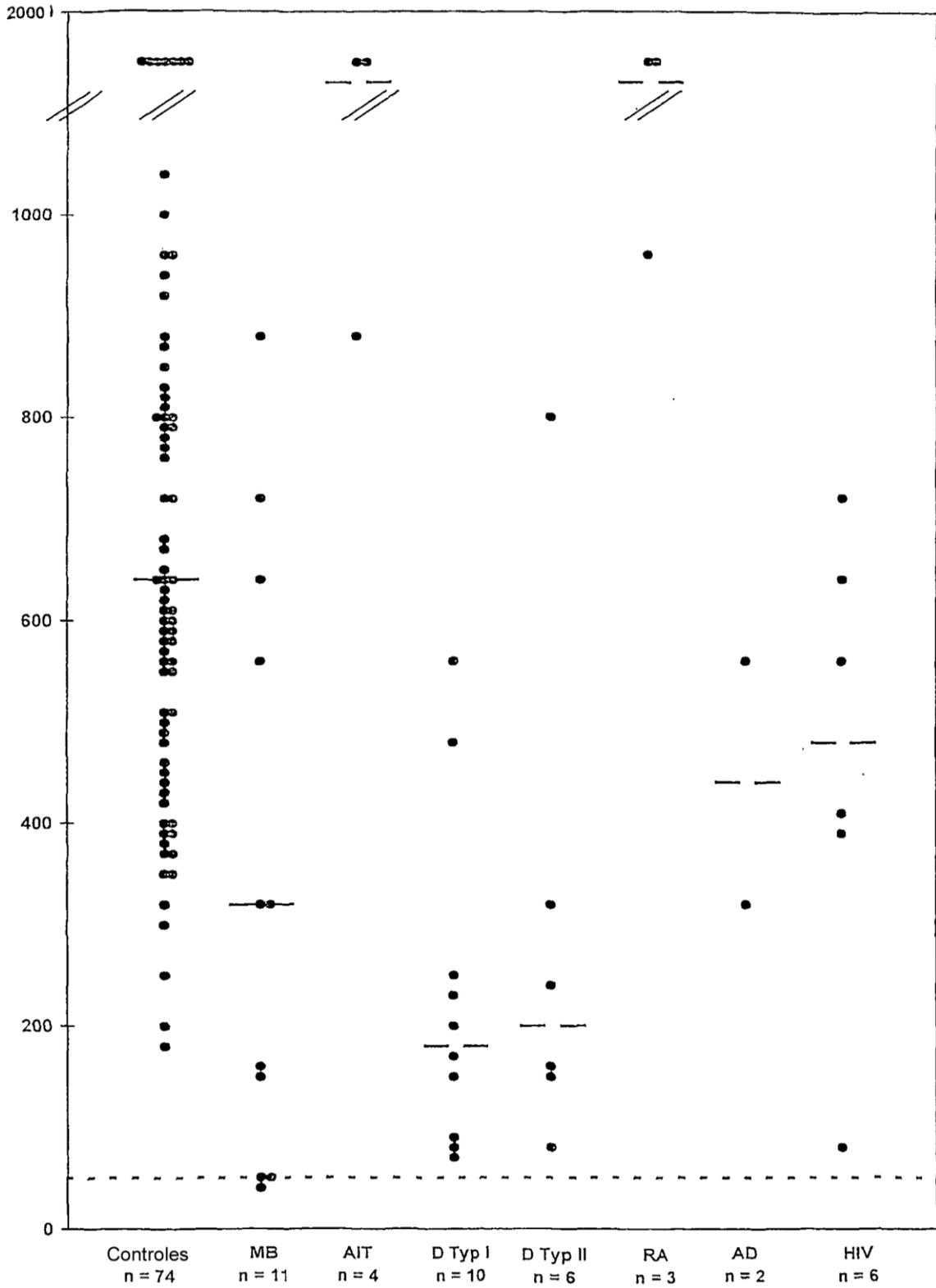


FIG. 2c

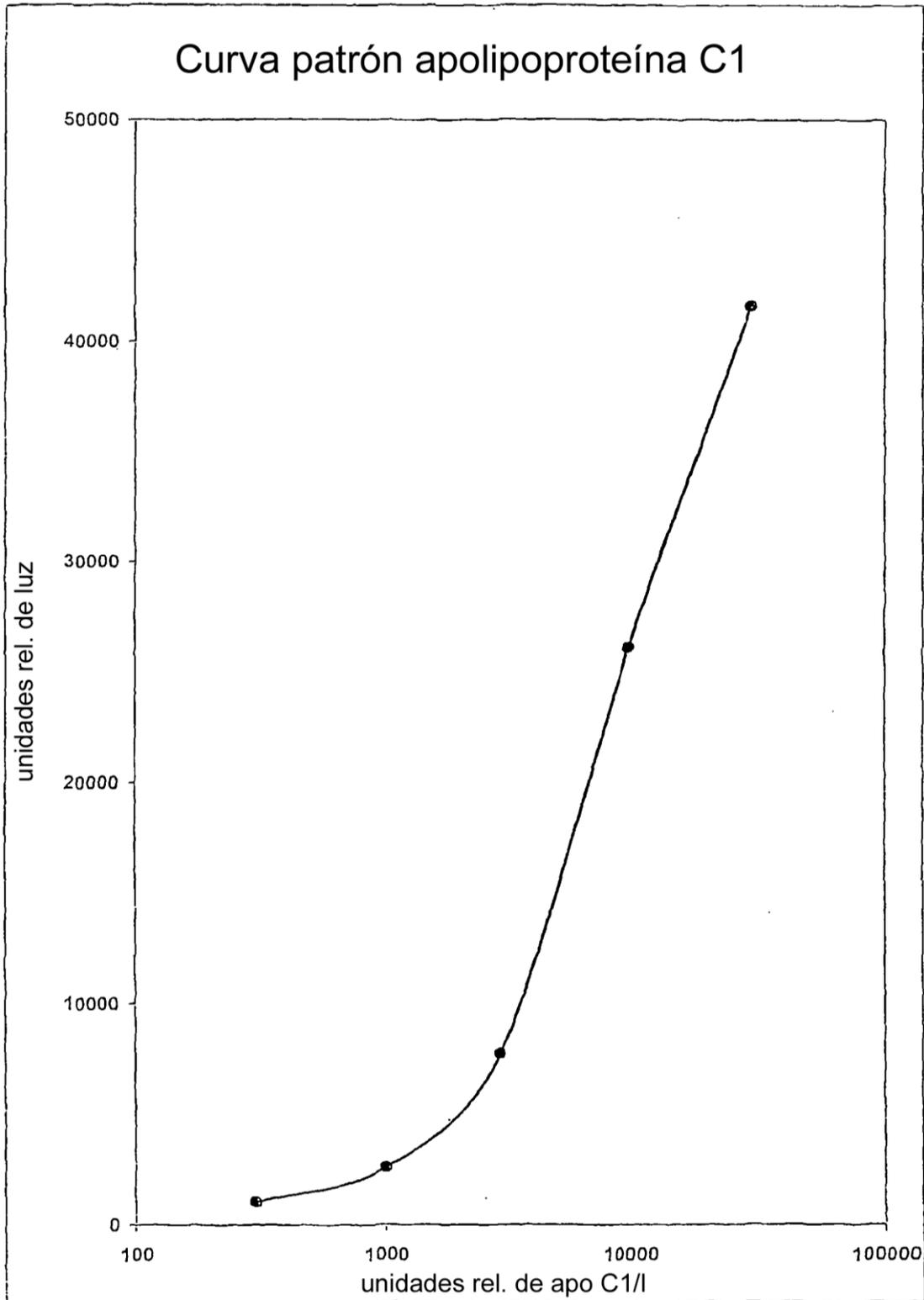


FIG. 3

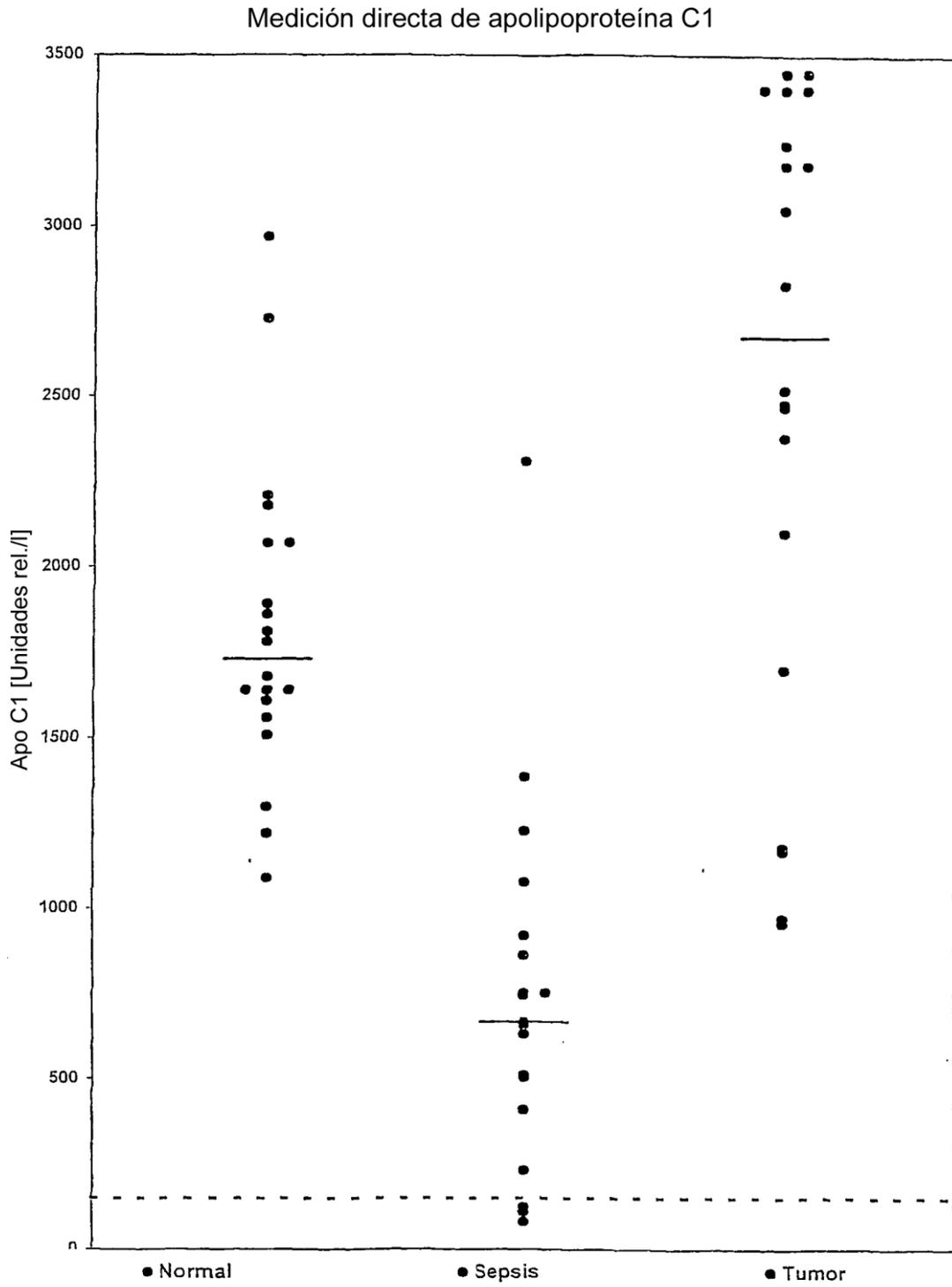


FIG. 4

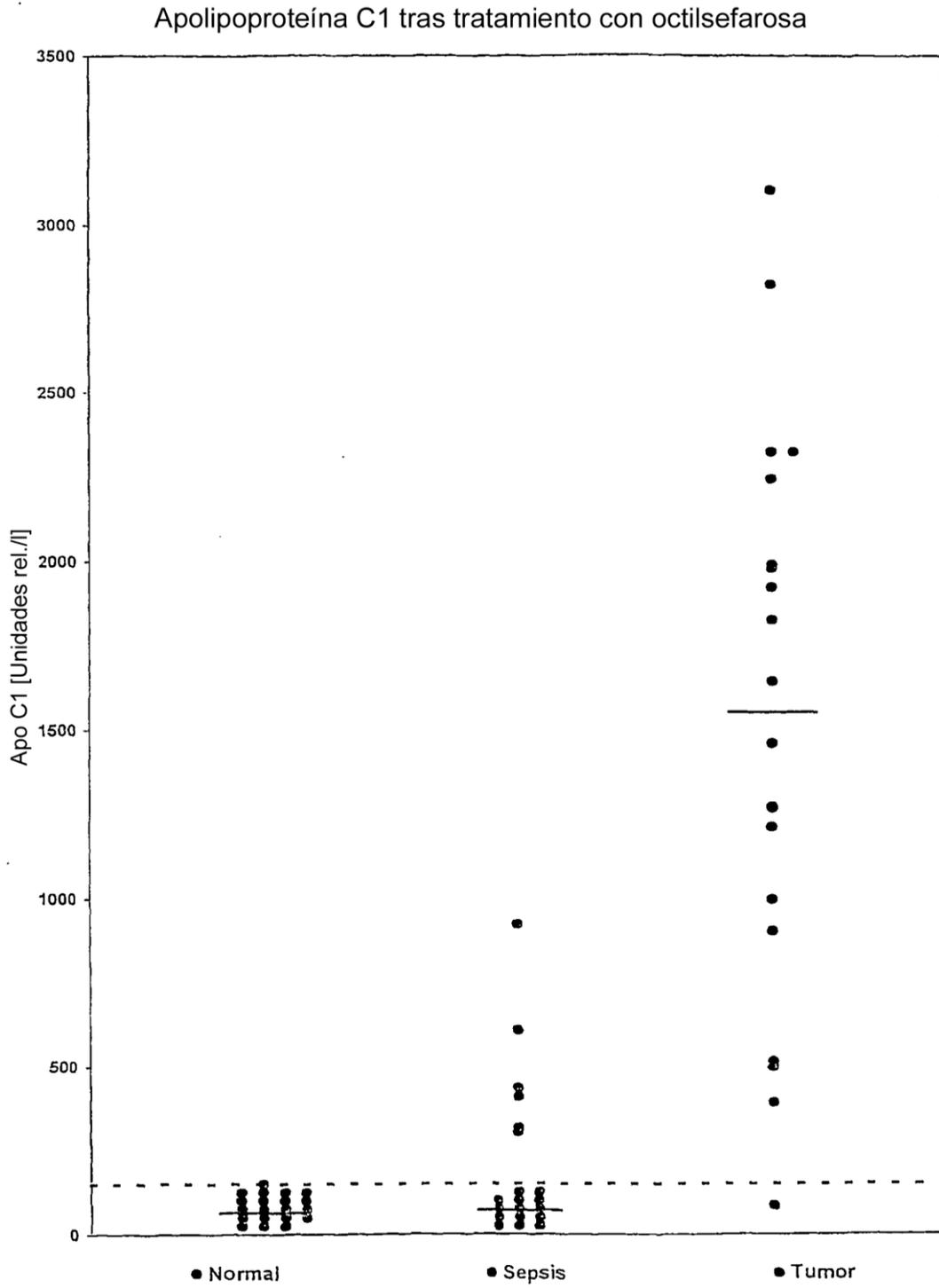


FIG. 5