



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 156**

51 Int. Cl.:
G01N 33/94 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05742347 .7**
96 Fecha de presentación : **11.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1745297**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

54 Título: **Uso de precursores de encefalinas y/o sus fragmentos en diagnosis médica.**

30 Prioridad: **13.05.2004 EP 04090191**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.07.2011

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

72 Inventor/es: **Bergmann, Andreas y**
Ernst, Andrea

74 Agente: **Mir Playa, Mireia**

ES 2 363 156 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

Uso de precursores de encefalinas y/o sus fragmentos en diagnosis médica

5 **[0001]** La presente invención se refiere al uso de un fragmento de proencefalina en diagnosis médica.

Antecedentes de la invención

10 **[0002]** El gen de la proencefalina A humana (PENK-A) contiene 4 exones y codifica para una serie de oligopéptidos estructuralmente relacionados tales como metionina-encefalina (Met-ENK), leucina-encefalina (Leu-ENK) y metionina-encefalina-arginina-fenilalanina (Met-ENK-Arg-Phe), así como metionina-encefalina-arginina-glicina-leucina (Met-ENK-Arg-Gly-Leu), en donde una molécula de proencefalina comprende las secuencias de 4 Met-ENKs y una Leu-ENK, una Met-ENK-Arg-Phe y una Met-ENK-Arg-Gly-Leu. La Met-ENK-Arg-Phe y la Met-ENK-Arg-Gly-Leu son adicionalmente metabolizadas a Met-ENK. Las encefalinas tienen una función como neurotransmisores, como neuromoduladores y como neurohormonas. La PENK-A además de las encefalinas comprende las secuencias de encelitina y péptido B en su terminal N, así como de sinencefalina en su terminal C, teniendo las mismas una función antibacteriana.

15 **[0003]** La expresión de proencefalina se produce en el sistema nervioso central, así como en el sistema nervioso periférico. En el cerebro se observan incrementadas concentraciones de PENK en el nucleus caudatus y en el nucleus accubens, en la sustancia gris periacueductal y en el hipocampo, así como en los núcleos del rafe.

20 **[0004]** Las encefalinas desempeñan un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos tales como la percepción del dolor, la regulación de la respuesta al estrés, comprendiendo la regulación hormonal, y la regulación de la formación de hueso, así como la regulación de las respuestas inmunes. La Met-ENK estimula la proliferación de linfocitos B y T, y la Leu-ENK estimula la proliferación de células T ayudantes y células T citotóxicas. Debido a las propiedades inmunorregulatorias de la Met-ENK, esta encefalina está clasificada como citoquina. Los péptidos de las encefalinas endógenas están también implicados en la regulación normal de funciones cardiovasculares tales como la frecuencia cardíaca, la fuerza de contracción y la presión sanguínea arterial.

25 **[0005]** La encelitina tiene función antibacteriana contra bacterias gram-positivas tales como las *Streptococcus aureus*, *Bacillus megaterium* y *Micrococcus luteus*, si bien no inhibe el crecimiento de bacterias gram-negativas tales como la *Escherichia coli*, así como el crecimiento de los hongos. La sinencefalina presenta propiedades antibacterianas contra bacterias gram-positivas así como bacterias gram-negativas.

30 **[0006]** El nivel de encefalina se encuentra alterado en tejido y fluidos corporales en una variedad de enfermedades. La reactividad inmune de Met-ENK en el plasma de pacientes que padecen de un infarto cerebral en fase aguda y de pacientes de diabetes con isquemia del miocardio sintomática está significativamente incrementada en comparación con individuos de control sanos, así como en el plasma y licor de pacientes que padecen de migraña y cefalea y en licor de pacientes con esquizofrenia.

35 **[0007]** En la enfermedad de Parkinson el contenido de Met-ENK-Arg-Gly-Leu en el licor de los pacientes está significativamente reducido en comparación con los individuos de control sanos.

40 **[0008]** Pacientes que padecían de la enfermedad de Alzheimer presentaban una reactividad inmune del tipo de la de Met-ENK 4 veces mayor.

45 **[0009]** La concentración de RNAm de encefalina en el estriado de pacientes que padecen de la enfermedad de Huntington está significativamente reducida, y en licor se observaba una disminución de la concentración de Met-ENK-Arg-Gly-Leu.

50 **[0010]** En las enfermedades tumorales los adenomas secretores de prolactina (PL) y de adrenocorticotropina (ACTH) de la hipófisis presentan una incrementada concentración de Met-ENK, así como una concentración de péptidos de proencefalina 10 veces mayor en ésta última.

55 **[0011]** Las encefalinas desempeñan un papel en la respuesta patofisiológica del tejido nervioso en lesiones traumáticas tales como lesiones de la cabeza y lesiones de la piel por ejemplo durante cirugía y después de la misma.

60 **[0012]** Las encefalinas desempeñan además un papel importante en la patogénesis de las inflamaciones sistémicas. En modelos animales la inducción de una peritonitis o la aplicación de lipopolisacáridos conducen a un incremento de la expresión de PENK, así como a un incremento de las concentraciones de Met-ENK en plasma.

[0013] En abscesos de ganado bovino periartrítico pudieron detectarse distintos fragmentos de PENK que comprenden la secuencia de la encelitina. En monocitos periféricos humanos y en linfocitos de rata pudo demostrarse la inducción de expresión de RNAm de PENK por lipopolisacáridos.

[0014] La infección de ratas por bornavirus redundó en una incrementada transcripción de PENK-A en el estriado.

[0015] La Met-ENK, la Met-ENK-Arg-Phe y los péptidos B y F de proencefalina están significativamente incrementados en plasma durante la hipotensión hemorrágica.

[0016] La biosíntesis de encefalinas (véase la Fig. 2) se produce, como en el caso de otras hormonas peptídicas, como preprohormona en ribosomas fijados (al Golgi). Tras la separación de la secuencia señal N-terminal hidrofóbica por las llamadas peptidasas señal y el plegamiento de las proteínas en el lumen del retículo endoplasmático, los propéptidos son empaquetados en vesículas en el aparato de Golgi y son transportados a la membrana celular. Durante el transporte los propéptidos son procesados siendo así convertidos en hormonas maduras por las llamadas prohormona convertasas en secuencias de aminoácidos habitualmente dibásicos. Por medio de distintos estímulos los péptidos son secretados al espacio extracelular o al plasma. Los péptidos maduros son rápidamente inactivados tras la secreción por proteólisis.

[0017] Las encefalinas tienen una vida media de 12 a 15 minutos en plasma (*ex vivo*).

[0018] El procesamiento de la proencefalina se produce en varios pasos en un estricto orden en el tiempo y es histo específico. Un paso inicial en el procesamiento es la separación del péptido B C-terminal que comprende las secuencias de encelitina y Met-ENK-Arg-Phe. El procesamiento de la proencefalina conduce a la formación de distintos péptidos de proencefalina.

[0019] Mediante separación de fases de licor (CSF) (CSF = fluido cerebroespinal) en cloroformo-metanol-agua y HPLC (HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución) de fase inversa y subsiguiente caracterización de los polipéptidos aislados mediante análisis de secuencias y espectrometría de masas, fue detectada la presencia del fragmento 119-159 de PENK en licor (Stark et al. (2001): Journal of Chromatography Vol. 754, pp. 357-367).

[0020] Este fragmento es el fragmento que es determinado según la presente invención, y habitualmente se le llama "huella de encefalina" (ENK-fp) en la presente solicitud.

[0021] Pueden detectarse encefalinas en distintos fluidos, tejidos y otros biomateriales corporales.

[0022] La corta vida media de las encefalinas en sangre *ex vivo* ha obstaculizado sin embargo hasta la fecha el uso de las encefalinas en la diagnosis rutinaria. Debido a la corta vida media de las encefalinas, en diagnosis rutinaria no es posible tomar muestras, obtener el plasma, transportar la muestra al laboratorio y hacer la diagnosis en el laboratorio, incluyendo los ensayos requeridos, antes de que las encefalinas alcancen un nivel crítico de detección.

[0023] Así, debido a la baja estabilidad *in vivo* de las encefalinas, su uso como biomarcador se ve extremadamente limitado incluso con una optimizada logística de toma de muestras, puesto que la influencia de la degradación de los péptidos diluye extremadamente la influencia de la biosíntesis y la liberación de encefalinas.

Breve exposición de la invención

[0024] La invención en su máximo alcance está definida en las reivindicaciones independientes 1 y 5:

1. Método *in vitro* para detectar un trastorno seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de sepsis, enfermedades inflamatorias sistémicas, infecciones locales, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad cardíaca coronaria, malaria y enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad de Alzheimer (AD), o para determinar el funcionamiento de la barrera hematoencefálica, en donde en una muestra de plasma de un paciente la concentración de una inmunorreactividad asociada al fragmento ENK-fp de proencefalina que consta de los aminoácidos 119 a 159 de la secuencia de aminoácidos completa de la proencefalina según la ID SEC N°: 1 es determinada por un método inmunodiagnóstico que usa dos anticuerpos que se fijan específicamente a dicho fragmento ENK-fp de proencefalina, fijándose uno de dichos anticuerpos específicamente al péptido según la ID SEC N°: 2 y fijándose el otro anticuerpo específicamente al péptido según la ID SEC N°: 3.

5. Kit (kit = conjunto de materiales y utensilios) que es para ejecutar un método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y comprende dos anticuerpos que se fijan a dicho fragmento ENK-fp de proencefalina, en donde el primero de dichos anticuerpos se fija específicamente al péptido que tiene la secuencia de aminoácidos ID SEC N°: 2, y el segundo de dichos anticuerpos se fija específicamente al péptido que tiene la secuencia de aminoácidos ID SEC N°: 3.

Descripción detallada de la invención

[0025] El objeto de la invención era el de superar la desventajosa vida media de las encefalinas y desarrollar un método y un kit para la determinación de encefalinas en fluidos corporales.

[0026] Este objeto ha sido alcanzado por un método según las reivindicaciones 1 a 4 y un kit según la reivindicación 5.

[0027] La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que el fragmento ENK-fp de proencefalina puede ser usado como herramienta para la determinación de encefalina en fluidos, tejidos y otros biomateriales corporales.

[0028] Esta presencia del fragmento ENK-fp de proencefalina está correlacionada con la presencia de las encefalinas maduras tales como las Met-ENK en los distintos fluidos, tejidos o biomateriales corporales.

[0029] Además la estabilidad de la proencefalina y de los fragmentos y/o combinaciones de los mismos *ex vivo* es sorprendentemente alta y hace que las proencefalinas sean plenamente adecuadas a efectos de diagnóstico rutinario.

[0030] Lo mismo es de aplicación para la vida media *in vivo* de la proencefalina, que es significativamente mayor que las de la(s) encefalina(s) madura(s), lo cual hace que dichas proencefalinas sean adecuadas para ser usadas en la detección de la concentración y del porcentaje de liberación de encefalina(s).

[0031] Este vínculo entre las proencefalinas de la presente invención y los péptidos maduros hace que las mismas sean adecuadas como herramientas de diagnóstico para todas las enfermedades y/o todos los trastornos en los que desempeñan un papel las proteínas maduras tales como las Met-ENK.

[0032] El fragmento ENK-fp de proencefalina según la presente invención puede ser por consiguiente usado para la diagnosis para una variedad de enfermedades / trastornos.

[0033] Adicionalmente pueden tomarse en consideración datos clínicos para sustentar la determinación de la enfermedad / del trastorno.

[0034] Péptidos de proencefalina sintetizados fueron usados para producir antígenos y fueron inyectados a animales para inducir anticuerpos contra la proencefalina. Para alcanzar este objetivo pueden ser usados por el experto en la materia distintos métodos. En una realización preferida se usó hemocianina de *Limus polyphemus* para la inmunización de ovejas y ratones. En otra realización preferida fueron producidos anticuerpos monoclonales según métodos conocidos para un experto en la materia. En el método que aquí se da a conocer se usó hemocianina de *Limus polyphemus* para la inmunización de ratones, efectuándose a continuación la infusión de linfocitos del bazo de los ratones inmunizados con una línea celular de mieloma para producir anticuerpos monoclonales.

[0035] Fueron sintetizadas cuatro secuencias de aminoácidos P571, PTE18, PRR16, PDR18 (IDs de Secuencia 2-5, véase la Fig. 1) de proencefalina. Estas secuencias están comprendidas en la secuencia de proencefalina (ID de Secuencia 1). La secuencia de proencefalina completa está comprendida en la ID de Secuencia 1, la ID de Secuencia 2 comprende al péptido usado para la producción del anticuerpo anti-P571, la ID de Secuencia 3 comprende al péptido usado para la producción del anticuerpo anti-PTE18, la ID de Secuencia 4 comprende al péptido usado para la producción del anticuerpo anti-PRR16, y la ID de Secuencia 5 comprende al péptido usado para la producción del anticuerpo anti-PDR18. Fue añadido a cada péptido un residuo de cisteína amino-terminal. Los péptidos fueron conjugados con una hemocianina de *Limus polyphemus* y los anticuerpos para PTE18, PRR16 y PDR18 fueron producidos en ovejas, y los anticuerpos monoclonales para P571 fueron producidos en ratones según métodos conocidos.

[0036] Los anticuerpos fueron purificados según métodos conocidos, por cromatografía de afinidad ligando-específica acoplado los péptidos por medio del residuo de cisteína amino-terminal a Gel SulfoLink de Pierce (Boston, EE.UU.) según los métodos de Pierce.

[0037] Los anticuerpos fueron etiquetados con un marcador para permitir su detección. El marcador que se usa es preferiblemente un marcador luminiscente. El anticuerpo contra PTE18 fue etiquetado con un marcador luminiscente.

[0038] Los métodos para la detección de la fijación del anticuerpo a la respectiva molécula son también conocidos por el experto en la materia. En una realización de la invención, la fijación del anticuerpo a la diana (que contiene proencefalina) es detectada por luminiscencia.

[0039] La presente solicitud da a conocer el uso de anticuerpos generados contra P571, PTE18, PRR16 y PDR18. Se usaron distintas combinaciones de anticuerpos (Tabla 1) para la detección de proencefalina en individuos de control, en el plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer y de pacientes con sepsis y en el licor de controles sanos; véase la Fig. 4. Están indicados en la Tabla 1 los fragmentos de proencefalina detectados por los anticuerpos.

[0040] La invención permite además la determinación de la presencia y estabilidad de proencefalina en fluidos, tejido y otros biomateriales corporales y de la diferencia entre las concentraciones de proencefalina en controles sanos y en pacientes con varios trastornos / enfermedades.

[0041] La invención se basa en y hace uso de la descubierta estabilidad a largo plazo de la huella de encefalina *ex vivo* en plasma (Fig. 3a). En plasma la proencefalina y la huella de encefalina sorprendentemente tienen una vida media de más de 24 horas. La proencefalina y la huella de encefalina son asimismo estables en licor.

5 **[0042]** La vida media *in vivo* de la proencefalina es sorprendentemente de poco más o menos de 24 horas.

[0043] Así, la proencefalina, al igual como la huella de encefalina, es a efectos diagnósticos con mucho más adecuada que las encefalinas maduras, que tienen una vida media de tan sólo 12 a 15 minutos en plasma y de dos minutos *in vivo*.

10

[0044] Se muestra (véanse la Fig. 4 y el ejemplo 4) el nivel de reactividad inmune de proencefalina con las tres combinaciones de anticuerpos de la Tabla 1 de plasma de control, plasma de sepsis, plasma de enfermedad de Alzheimer y licor de controles sanos. En el plasma de los controles y de los pacientes con sepsis y Alzheimer pudo detectarse proencefalina usando las tres combinaciones de anticuerpos. Se ve que la ENK-fp en licor presenta con mucho la concentración más alta y presenta una señal más de 100 veces más alta que en el plasma de los controles sanos. También en el plasma de los pacientes con sepsis está significativamente incrementada la reactividad inmune de ENK-fp. La señal es aproximadamente 66 veces más alta que en el plasma de control. Los pacientes con Alzheimer presentan una señal incrementada 1,7 veces en comparación con los controles. Las combinaciones de anticuerpos II y III no presentan una señal detectable en licor, lo cual lleva a la conclusión de que la proencefalina está plenamente procesada en licor. En plasma, sin embargo, las combinaciones de anticuerpos II y III presentan señales detectables que están significativamente incrementadas en los controles y en los pacientes con Alzheimer en comparación con las señales de la combinación de anticuerpos I. Los pacientes con sepsis presentan sin embargo una señal más baja en comparación con la combinación de anticuerpos I.

15

20

25

[0045] La solicitud da a conocer el nivel de proencefalina en fluidos, tejidos y otros biomateriales corporales de individuos de control sanos y de personas enfermas.

30

[0046] La solicitud también da a conocer la distribución de concentraciones de proencefalina en el plasma de individuos de control sanos (Fig. 6). Los del 95% presentan una reactividad inmune de menos de 109 pg/ml, siendo la media de 74 pg/ml.

[0047] La invención da adicionalmente a conocer un significativo cambio de la concentración de ENK-fp en plasma en los trastornos de la reivindicación 1.

35

[0048] La solicitud también da a conocer el sorprendente descubrimiento de un significativo incremento de 130 veces de la ENK-fp en licor en comparación con el plasma de los controles sanos. En los individuos sanos el licor contiene de 150 a 450 µg de proteína por ml, estando el 83% formado en el suero y estando tan sólo el 17% formado en el cerebro. La más alta relación licor/suero conocida hasta la fecha es la de la prostaglandina-D-sintetasa, que tiene un valor de 33. Así, la sorprendentemente alta relación de aproximadamente 130 en la presente invención es significativamente más alta que la relación de todas las otras proteínas. Así, la determinación de la relación de la huella de encefalina y la huella de encefalina que contiene reactividad inmune sirve como un muy potente marcador en plasma por ejemplo para el funcionamiento de la barrera hematoencefálica. Puesto que la concentración de proencefalina tal como huella de proencefalina es más alta el licor que en plasma, un incremento de la ENK-fp en plasma indica el deterioro y la pérdida de la función de la barrera hematoencefálica: El licor se difunde al plasma, conduciendo a un incremento de la concentración de ENK-fp en plasma. Así, la presente invención en una realización adicional aporta un método y un kit de diagnóstico para los trastornos / enfermedades anteriormente mencionados, teniendo o usando ambos un anticuerpo específico de la huella de encefalina.

40

45

[0049] Otra realización preferida de la invención se refiere a un kit para someter a ensayo a muestras de sangre, y en particular de plasma, según la reivindicación 5.

50

[0050] La solicitud da a conocer un significativo incremento de la huella de encefalina en plasma en inflamación sistémica y en infección local (Fig. 7). Los pacientes que padecen de enfermedades inflamatorias sistémicas sorprendentemente presentan un valor significativamente incrementado en el 50% de los casos (> 109 pmoles/l), y los pacientes que tienen una infección local presentan una incrementada concentración de huella de encefalina en el 75% de los casos. Los pacientes de malaria tenían unas concentraciones de ENK-fp que iban desde aproximadamente 181,5 hasta aproximadamente 435 pmoles/l, en un caso de cefalea el valor era de aproximadamente 148 pmoles/l, y en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica fueron respectivamente medidos en dos pacientes 171,5 y 251 pmoles/l.

55

60

Descripción de las Figuras

[0051]

La Fig. 1 muestra la secuencia de proencefalina, los péptidos maduros y las secuencias que corresponden a los péptidos usados para la producción de anticuerpos. La secuencia de proencefalina corresponde a la ID de Secuencia 1,

la ID de Secuencia 2 comprende al péptido usado para la producción del anticuerpo anti-P571, la ID de Secuencia 3 comprende al péptido usado para la producción del anticuerpo anti-PTE1S, la ID de Secuencia 4 comprende al péptido usado para la producción del anticuerpo anti-PRR16, y la ID de Secuencia 5 comprende al péptido usado para la producción del anticuerpo anti-PDR18.

5 La Fig. 2 muestra la síntesis de neuropéptidos.

La Fig. 3 muestra la estabilidad de los fragmentos de proencefalina *ex vivo*.

La Fig. 4 muestra la inmunorreactividad relativa de las combinaciones de anticuerpos I-III en distintos fluidos corporales en individuos enfermos y de control.

La Fig. 5 muestra la curva de calibración de la concentración de ENK-fp.

10 La Fig. 6 muestra la distribución de frecuencias de la concentración de ENK-fp en el plasma de controles.

La Fig. 7 muestra las concentraciones de ENK-fp en el plasma de pacientes con inflamación sistémica, infección local, enfermedad intestinal inflamatoria, daño cerebral y enfermedad cardíaca coronaria.

15 Ejemplo 1

Producción de Anticuerpos

(a) Inmunógeno

20 **[0052]** Fueron seleccionadas y sintetizadas por Jerini (Berlín, Alemania) cuatro distintas secuencias peptídicas (P571, PTE18, PRR16 y PDR18, véase la Fig. 1) de proencefalina. Los péptidos P571 y PTE18 comprenden la secuencia de la huella de encefalina. El PDR18 comprende 15 de 22 aminoácidos del péptido maduro encelitina. Cada péptido estaba provisto de un residuo de cisteína amino-terminal (Cys0).

25 (b) Anticuerpos

[0053] Para la inmunización los péptidos PTE18, PRR16 y PDR18 fueron conjugados con la hemocianina de *Limulus polyphemus*, y fueron producidos anticuerpos policlonales en ovejas por la Ltd. Micropharm (Carmarthenshire, Gran Bretaña). Para la producción del anticuerpo monoclonal contra el péptido P571 de PENK en ratones, el péptido fue conjugado con la hemocianina de *Limulus polyphemus* por la BioGenes (Berlín, Alemania). Linfocitos del bazo de ratones inmunizados fueron fusionados con una línea celular de mieloma, y fueron producidos anticuerpos monoclonales usando cultivos celulares.

35 Ejemplo 2

Purificación de los Anticuerpos

40 **[0054]** Los anticuerpos policlonales de ovejas fueron purificados usando purificación por afinidad ligando-específica. Para ese paso los péptidos con Cys(0) PTE18, PRR16 y PDR18 fueron unidos a Gel SulfoLink suministrado por Pierce (Boston, EE.UU.). La unión se hizo según el protocolo de Pierce.

45 **[0055]** En resumen, columnas de policarbonato (de 15 x 80 mm) fueron llenadas con 5 ml de matriz de afinidad. Tras el equilibrado de las columnas con PBS (salina tamponada con fosfato: NaCl 136mM, KH₂PO₄ 1,5mM, Na₂HPO₄*2H₂O 20,4mM, KCl 2,7mM, pH 7,2), 5 mg del péptido respectivo fueron disueltos en PBS aplicado a las columnas cerradas, y el material del gel fue homogeneizado mediante rotación lenta. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y sedimentación del material del gel, las columnas fueron lavadas 5 veces con 3 ml de PBS. Para saturar las posiciones de unión libre 5 ml de una solución de L-cisteína 50mM fueron añadidos al material de la columna, y el material del gel tras homogeneización fue incubado de nuevo por espacio de 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la sedimentación del material del gel cada columna fue lavada 6 veces con 5 ml de una solución de NaCl 1M, efectuándose a continuación lavado con PBS.

55 **[0056]** El material del gel fue mezclado con 25 ml de las respectivas reservas de antisuero e incubado durante la noche a temperatura ambiente mediante rotación lenta. La mezcla de suero y gel fue aportada a columnas de policarbonato y el suero sobrante fue eliminado. Las columnas fueron entonces lavadas con 250 ml de PBS para eliminar las proteínas séricas no fijadas. La desorción de los anticuerpos no fijados se hizo mediante elución de la columna con ácido cítrico 50mM (pH 2,2). El eluido fue capturado en fracciones de 1 ml. La concentración de proteína de cada fracción fue determinada usando el kit de ensayo de proteínas BCA de Perbio (Bonn, Alemania), y se combinaron las fracciones con un contenido de proteína > 1 mg/ml. Los anticuerpos purificados por afinidad fueron retamponados en PBS por medio de diálisis. Se determinó de nuevo el contenido de proteína, y los anticuerpos fueron almacenados a 4°C.

60 Anticuerpos Monoclonales

[0057] El anticuerpo monoclonal contra el péptido P571 de PENK fue purificado por medio de cromatografía de afinidad con proteína G a partir del supernatante celular. Una Columna Eco-plus (de 10 mm x 125 mm) de la Kronlab (de

Sinsheim, Alemania) fue cargada con 25 ml de medio de cromatografía de afinidad Prosep-G de la Millipore (de Schwalbach, Alemania).

Ejemplo 3

5

Inmovilización/Etiquetado de los Anticuerpos

[0058] Los anticuerpos purificados contra los péptidos P571, PRR16 y PDR18 fueron inmovilizados en tubos de poliestirol (Startubes, de 12 m x 75 mm, de Greiner, Alemania). Para ese procedimiento las soluciones de anticuerpos fueron diluidas hasta una concentración de proteína de 6,7 µg/ml con PBS, y se pipetaron 300 µl por tubo (lo que corresponde a 2 µg de anticuerpo por tubo). Estos tubos fueron incubados por espacio de 20 horas a temperatura ambiente y fueron luego lavados 3 veces con 4 ml de PBS, respectivamente. Hasta su posterior uso, los tubos estuvieron almacenados a 4°C.

[0059] El anticuerpo contra PTE18 (1 mg/ml en PBS) fue etiquetado con el marcador luminiscente éster de acridinio-N-hidroxisuccinimida (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent, Hennigsdorf, Alemania). Para el procedimiento de etiquetado 200 µl de anticuerpo fueron mezclados con 4 µl de éster de acridinio y fueron incubados por espacio de 20 minutos, y los enlaces éster de acridinio libres fueron saturados añadiendo 40 µl de una solución de glicina 50mM. La preparación de etiquetado fue separada del éster de acridinio libre mediante HPLC en una columna de filtración en gel BioSil 400 (BioRad, Munich, Alemania). Se usó PBS como solvente.

Ejemplo 4

Determinación de la Reactividad Inmune de Proencefalina

25

[0060] La reactividad inmune de proencefalina fue determinada en plasma usando tres distintas combinaciones de anticuerpos de cada uno de 5 controles y de pacientes con sepsis y Alzheimer, así como en el licor de 5 individuos de control.

[0061] 100 µl de muestra fueron pipetados al interior de cada tubo recubierto con anticuerpo, y fueron añadidos 20 ng del anticuerpo etiquetado (en 200 µl de tampón de PBS, EDTA 10mM). Los tubos fueron incubados por espacio de 20 horas a 4°C, y a continuación el anticuerpo indicador fue eliminado lavando 5 veces con 1 ml de PBS. El anticuerpo etiquetado fijado al tubo fue cuantificado midiendo la luminiscencia en un luminómetro (Berthold LB 952T/16).

[0062] Se muestran en la Fig. 4 las inmunorreactividades relativas medidas de las distintas combinaciones de anticuerpos.

[0063] En el plasma de los controles y de los pacientes con sepsis y con Alzheimer pudieron detectarse las secuencias de proencefalina usando las tres combinaciones de anticuerpos. El valor medio de los datos de control de la combinación de anticuerpos I fue establecido como calibre del 100% para una mejor comparación de los resultados, y los valores medios de los datos restantes fueron referidos a ese valor (véase la Tabla 1). Se ve cómo la huella de encefalina en licor presenta con mucho la concentración más alta y presenta una señal 280 veces más alta que la del plasma de los controles sanos. También en el plasma de los pacientes con sepsis está significativamente incrementada la reactividad inmune de la huella de encefalina. La señal es aproximadamente 66 veces más alta que en el plasma de los controles. Los pacientes con Alzheimer presentan una señal 1,7 veces mayor en comparación con los controles. Las combinaciones de anticuerpos II y III no presentan una señal detectable en licor, lo cual conduce a la conclusión de que la proencefalina está plenamente procesada en el licor. En plasma, sin embargo, las combinaciones de anticuerpos II y III presentaron señales detectables que estaban significativamente incrementadas en los controles y en los pacientes con Alzheimer en comparación con las señales de la combinación de anticuerpos I. Los pacientes con sepsis, sin embargo, presentan una señal más baja en comparación con la combinación de anticuerpos I. Así, esta combinación constituye un método mejor para la diferenciación de los pacientes con sepsis y los controles.

Tabla 1: Medición de la inmunorreactividad relativa de proencefalina en combinación con distintas combinaciones de anticuerpos

Combinación de anticuerpos	I (P571/PTE18)		II (PRR16/PTE18)		III (PDR18/PTE18)	
	IR rel.	relación	IR rel.	relación	IR rel.	relación
Plasma controles	100	1,0	305	1	227	1
Plasma sepsis	6.622	66,2	792	2,6	388,5	1,7
Plasma Alzheimer	172	1,7	482	1,6	289	1,3
CSF	28.278	282,8	8,5	0,028	4,5	0,0199

[0064] IR rel.: inmunorreactividad relativa (valores en % en respuesta al valor en plasma de control de la combinación de anticuerpos I, que fue establecido como calibre del 100%). Todos los valores son valores medios (n = 5).

55

[0065] Relación: relación del respectivo valor del paciente (en %) al correspondiente valor de control (en %) de la respectiva combinación de anticuerpos.

Ejemplo 5

5

Inmunoensayo para la determinación cuantitativa de la huella de encefalina

Componentes:

10 **[0066]** Se usaron en el inmunoensayo tubos recubiertos con anticuerpos P571 y el anticuerpo contra PTE-18 etiquetado con un marcador luminiscente. Se describe en el ejemplo 3 la producción de estos componentes.

Procedimiento:

15 **[0067]** 100 μ l de muestra fueron pipetados al interior de cada tubo recubierto con anticuerpo, y fueron añadidos 20 ng del anticuerpo etiquetado (en 100 μ l de tampón de PBS, EDTA 10mM). Los tubos fueron incubados por espacio de 20 horas a 4°C, efectuándose a continuación la eliminación del anticuerpo indicador lavando 5 veces con 1 ml de PBS. Los anticuerpos etiquetados fijados al tubo fueron cuantificados midiendo la luminiscencia en un luminómetro (Berthold LB 952T/16).

20

Calibración

25 **[0068]** Para poder determinar las concentraciones y las reactividades inmunes de huella de encefalina, el péptido fue sintetizado por Jerini (Berlín, Alemania). El péptido debidamente pesado fue usado como calibrador para el ensayo inmune. Se muestra en la Fig. 5 la curva estándar de la huella de encefalina. La sensibilidad analítica del análisis de la huella de encefalina es de aproximadamente 11 pmoles/l.

Ejemplo 6

30 Concentración de huella de encefalina en el plasma de individuos supuestamente sanos (controles)

[0069] Se muestra en la Fig. 6 la curva de distribución de la concentración de huella de encefalina en el plasma de individuos sanos. Los del 95% de los 150 individuos sanos presentan una concentración de huella de encefalina que queda situada en una estrecha agrupación entre 40 y 100 pmoles/l.

35

Ejemplo 7

Concentración de huella de encefalina en el fluido cerebroespinal (CSF)

40 **[0070]** Se determinó la concentración de huella de encefalina en el licor de muestras de control (n = 39), y fue determinada una media de 9623 pmoles/l. La media del CSF está significativamente incrementada con un factor de aproximadamente 130 por encima de la media del plasma de los individuos de control sanos. En los individuos sanos el licor contiene de 150 a 450 μ g de proteína por ml, estando el 83% formado en el suero y estando tan sólo el 17% formado en el cerebro. La relación licor/suero más alta conocida hasta la fecha es la de la prostaglandina-D-sintetasa, que tiene un valor de 33. Así, la sorprendentemente alta relación de aproximadamente 130 en la presente invención es significativamente más alta que la relación de todas las otras proteínas. Así, la determinación de la relación de la huella de encefalina y la huella de encefalina que contiene reactividad inmune sirve de muy potente marcador en plasma para el funcionamiento de la barrera hematoencefálica.

50

Ejemplo 8

Determinación de la concentración de huella de encefalina en la circulación sanguínea de pacientes que padecen de inflamaciones sistémicas, infecciones locales y otras enfermedades

55 **[0071]** Los pacientes que padecían de enfermedades inflamatorias sistémicas presentaron unos valores significativamente incrementados en el 50% de los casos (> 109 pmoles/l, véase la Fig. 7). También los pacientes que tenían una infección local (como p. ej. abscesos) presentaron una incrementada concentración de huella de encefalina en el 75% de los casos (véase la Fig. 7). Además fueron determinadas incrementadas concentraciones de huella de encefalina en enfermedad de Alzheimer, daño cerebral y enfermedad cardíaca coronaria en un 75 y un 54% respectivamente (Fig. 7). Pudo detectarse una significativa disminución de la concentración de huella de encefalina en el 75% de los pacientes que tenían enfermedad intestinal inflamatoria tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

60

[0072] Los pacientes con malaria tenían unas concentraciones de huella de encefalina que iban desde aproximadamente 181,5 hasta aproximadamente 434 pmoles/l, en un caso de cefalea el valor era de aproximadamente

148 pmoles/l, y en enfermedad pulmonar obstructiva crónica fueron medidos 171,5 y 251 pmoles/l en dos pacientes respectivamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

5

[0073]

<110> SpingoTec GmbH

10 <120> USO DE PRECURSORES DE ENCEFALINAS Y/O SUS FRAGMENTOS EN DIAGNOSIS MÉDICA

<130> 4611 PCT

<150> EP 04090191.0

15 <151> 2004-05-13

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.2

20

<210> 1

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Sintética

<400> 1

30

Glu Cys Ser Gln Asp Cys Ala Thr Cys Ser Tyr Arg Leu Val Arg Phe
1 5 10 15

35

Ala Asp Ile Asn Phe Leu Ala Cys Val Met Glu Cys Glu Gly Lys Leu
20 25 30

40

Pro Ser Leu Lys Ile Trp Glu Thr Cys Lys Glu Leu Leu Gln Leu Ser
35 40 45

45

Lys Pro Glu Leu Pro Gln Asp Gly Thr Ser Thr Leu Arg Glu Asn Ser
50 55 60

Lys Pro Glu Glu Ser His Leu Leu Ala Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met
65 70 75 80

50

Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Lys Lys Met Asp Glu Leu Tyr Pro Met
85 90 95

55

Glu Pro Glu Glu Glu Ala Asn Gly Ser Glu Ile Leu Ala Lys Arg Tyr
100 105 110

60

Gly Gly Phe Met Lys Lys Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Leu Ala Asn
115 120 125

Ser Ser Asp Leu Leu Lys Glu Leu Leu Glu Thr Gly Asp Asn Arg Glu
130 135 140

Arg Ser His His Gln Asp Gly Ser Asp Asn Glu Glu Glu Val Ser Lys
145 150 155 160

5

10

15

Arg Tyr Gly Gly Phe Met Arg Gly Leu Lys Arg Ser Pro Gln Leu Glu
 165 170 175

20

Asp Glu Ala Lys Glu Leu Gln Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg
 180 185 190

25

Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly Gly
 195 200 205

30

Phe Leu Lys Arg Phe Ala Glu Ala Leu Pro Ser Asp Glu Glu Gly Glu
 210 215 220

35

Ser Tyr Ser Lys Glu Val Pro Glu Met Glu Lys Arg Tyr Gly Gly Phe
 225 230 235 240

Met Arg Phe

40

<210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> Sintética

<400> 2

50

Glu Glu Asp Asp Ser Leu Ala Asn Ser Ser Asp Leu Leu Lys
 1 5 10

55

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Sintética

<400> 3

Thr Gly Asp Asn Arg Glu Arg Ser His His Gln Asp Gly Ser Asp Asn
 1 5 10 15

5 <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 4

15 Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintética

25 <400> 5

Asp Glu Glu Gly Glu Ser Tyr Ser Lys Glu Val Pro Glu Met Glu Lys
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para detectar un trastorno seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de sepsis, enfermedades inflamatorias sistémicas, infecciones locales, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad cardíaca coronaria, malaria y enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad de Alzheimer (AD), o para determinar el funcionamiento de la barrera hematoencefálica, en donde en una muestra de plasma de un paciente la concentración de una inmunorreactividad asociada al fragmento ENK-fp de proencefalina que consta de los aminoácidos 119 a 159 de la secuencia de aminoácidos completa de la proencefalina según la ID SEC N°: 1 es determinada por un método inmunodiagnóstico que usa dos anticuerpos que se fijan específicamente a dicho fragmento ENK-fp de proencefalina, fijándose uno de dichos anticuerpos específicamente al péptido según la ID SEC N°: 2 y fijándose el otro anticuerpo específicamente al péptido según la ID SEC N°: 3.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en donde dicha determinación de ENK-fp en plasma es llevada a cabo para determinar el funcionamiento de la barrera hematoencefálica, indicando un incremento de la concentración de ENK-fp en plasma en comparación con controles sanos el deterioro o la pérdida de función de la barrera hematoencefálica.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde uno de dichos anticuerpos es etiquetado con un marcador detectable.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, en donde dicho marcador es un marcador luminiscente.
- 25 5. Kit que es para ejecutar un método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y comprende dos anticuerpos que se fijan a dicho fragmento ENK-fp de proencefalina, en donde el primero de dichos anticuerpos se fija específicamente al péptido que tiene la secuencia de aminoácidos ID SEC N°: 2, y el segundo de dichos anticuerpos se fija específicamente al péptido que tiene la secuencia de aminoácidos ID SEC N°: 3.

Fig. 1

Secuencia de Proencefalina
(ID Secuencia 1)

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 | | | | | | | | | | | |
 ECSQCATCS YRLVRPADIN FLACVMECEG KLPSLKTWET CKELLQSKP ELPQDGTSTL RENSKEPEESH LLAKRYGGFFM KRYGGFFMKKM DELYPMEPEE
 110 120 130 140 150 160 170 180 190
 | | | | | | | | | |
 EANGSEILAK RYGGFFMKKDA EEDDSLANS DDKKLETTG DNRERSHHQD GSDNEEVSK RYGGFFMRGLK RSPQLEDEAK ELQKRYGGFFM
 (P571 EEDDSLANS DLLKE)* (7G DNRERSHHQD GSDNE PTE18)*
 (ID Secuencia 2) (ID Secuencia 3)

200 210 220 230 240 243
 | | | | | |
 RRYGRPEWWM DYQKRYGGFFL KRFAEALPSD EEGESYSKEV PEMEKRYGGF MRF
 (ARVGRPEWWM DYQKR PRR16)* (D EEGESYSKEV PEMEKR PDR18)*
 (ID Secuencia 4) (ID Secuencia 5)

Péptidos Maduros:

- 1 - 73 Sinencefalina
- 76 - 80 Met-Enk
- 83 - 87 Met-Enk
- 90 - 109 Propéptido 1
- 112 - 116 Met-Enk
- 119 - 159 PDS41
- 162 - 169 Met-Enk-Arg-Gly-Leu
- 172 - 183 Propéptido 2
- 186 - 190 Met-Enk
- 193 - 203 Propéptido 3
- 206 - 210 Leu-Enk
- 213 - 234 Propéptido 4
- 237 - 243 Met-Enk-Arg-Phe

*Las secuencias entre paréntesis corresponden a los péptidos usados para la producción de anticuerpos

Síntesis de Neuropeptidos

Fig. 2

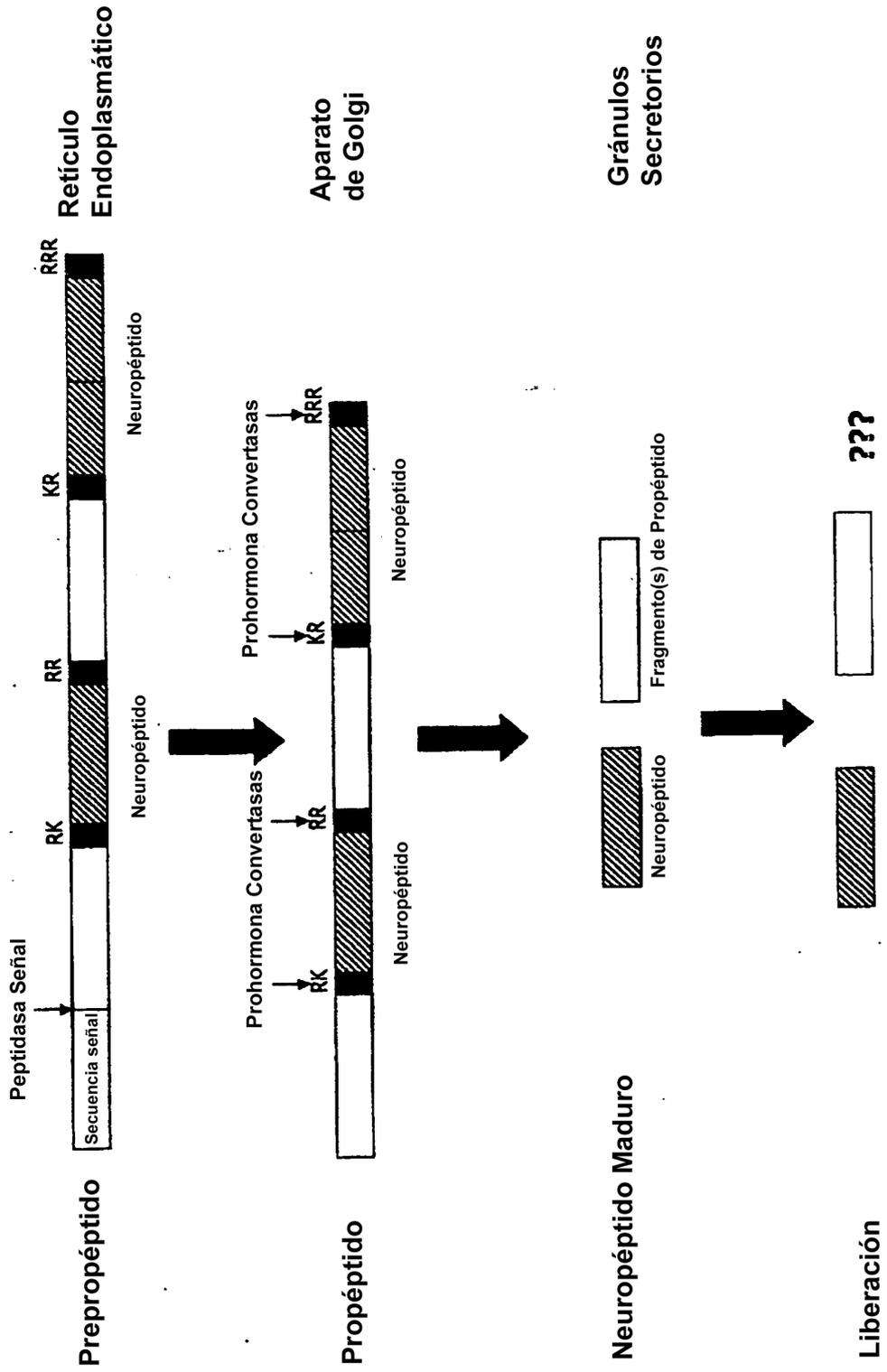


Fig. 3 Estabilidad de los fragmentos de Proencefalina ex vivo (EDTA-Plasma, n = 4)

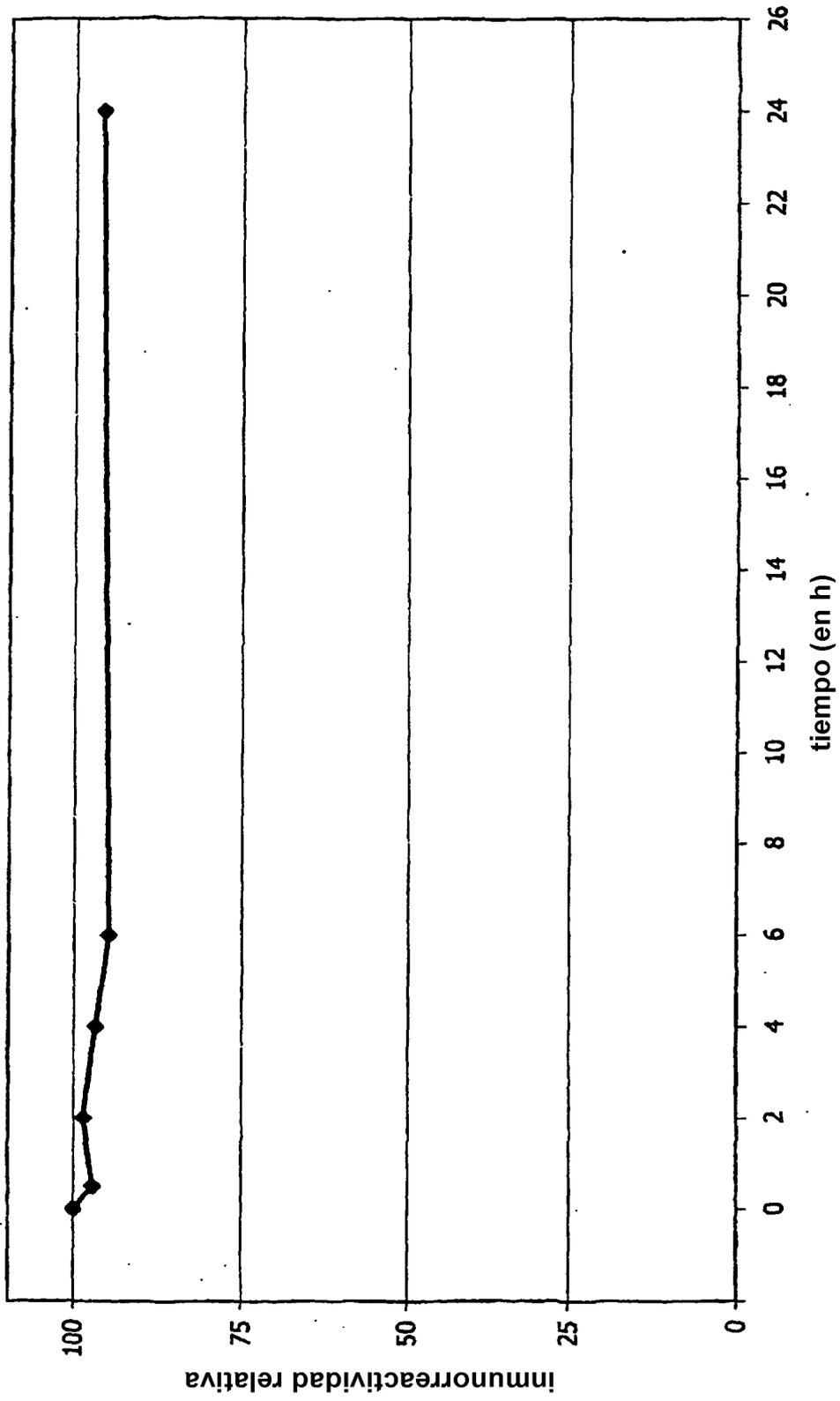
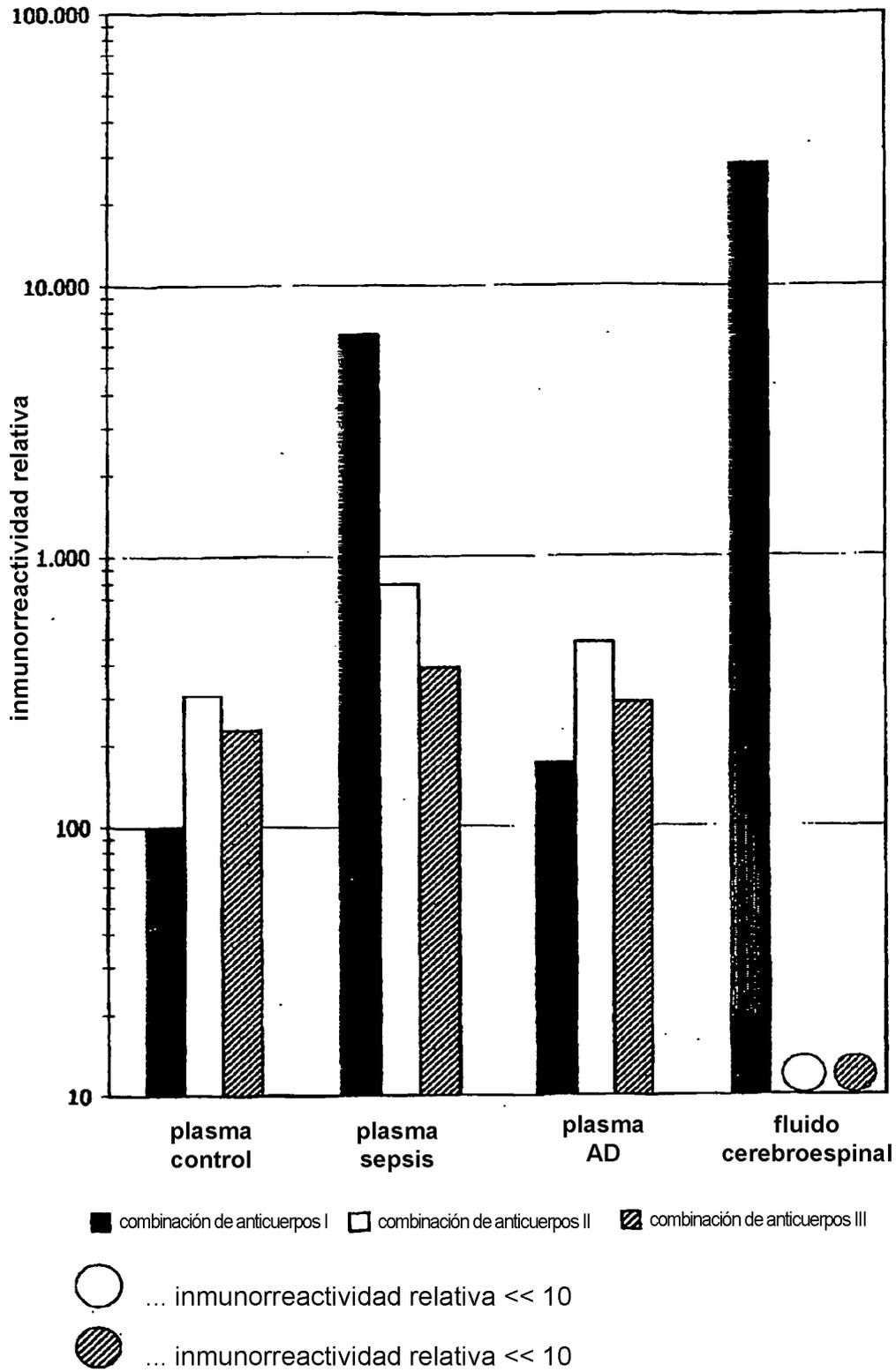


Fig. 4



Curva de calibración

Fig. 5

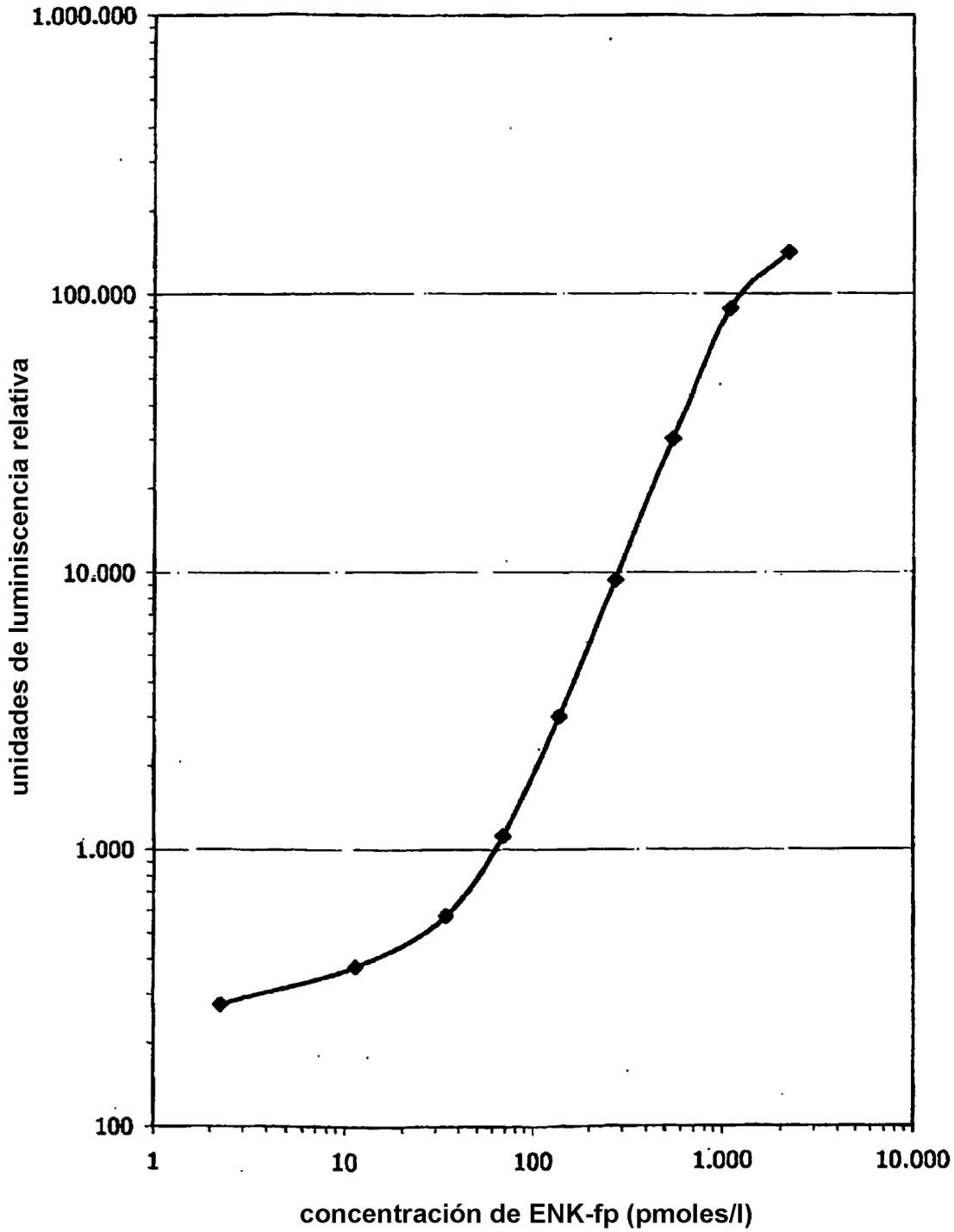


Fig. 6

distribución de frecuencias de la concentración de ENK-fp en plasma de controles
(n = 150)

