

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 253**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2007 E 07724987 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2016416**

54 Título: **Procedimiento in vitro para la detección y la detección precoz y para el control acompañante de la terapia de lesiones hepáticas inducidas por medicamentos y drogas adictivas**

30 Prioridad:

08.05.2006 DE 102006021406

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

08.04.2013

73 Titular/es:

**B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf , DE**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS;
STRUCK, JOACHIM y
MORGENTHALER, NILS, G.**

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 400 253 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

Procedimiento *in vitro* para la detección y la detección precoz y para el control acompañante de la terapia de lesiones hepáticas inducidas por medicamentos y drogas adictivas

[0001] La invención se refiere a un nuevo procedimiento *in vitro* para la detección precoz de lesiones hepáticas inducidas por medicamentos o inducidas por drogas adictivas y para la detección de la ya alcanzada fase de la lesión hepática mediante determinación de un biomarcador aún no usado ni propuesto para esta finalidad en la circulación de un paciente humano dentro del marco de una determinación multiparamétrica.

[0002] Es sabido que en determinadas personas con predisposición a ello o bien bajo determinados presupuestos desfavorables (como p. ej. adicionales agresiones del organismo producidas por adicionales medicamentos, consumo de alcohol, otras agresiones externas o el estado de nutrición y los hábitos nutricionales) numerosos medicamentos que son en sí útiles y se prescriben en gran medida pueden conducir a lesiones hepáticas.

[0003] Tales medicamentos, que dentro del marco de la presente solicitud reciben también el nombre de “medicamentos potencialmente lesivos para el hígado”, se encuentran en las más diversas clases de sustancias activas con aplicaciones para casi todas las indicaciones clínicas, siendo para algunos medicamentos sabido que en su caso el riesgo es particularmente alto.

[0004] Las lesiones hepáticas producidas por los medicamentos se manifiestan clínicamente en forma de diversos síntomas que como tales no tienen un particular valor diagnóstico. Son a este respecto dignos de mención p. ej. la falta de apetito, el abatimiento, el vértigo, la pérdida de peso, las náuseas, los vómitos, la fiebre, los dolores en el vientre superior derecho, las artralgias, las mialgias, el picor, las erupciones y el cambio de color de las excreciones. El síntoma más llamativo, que por cierto no surge hasta un estado relativamente muy avanzado, es un amarilleo de los ojos o incluso de la piel, lo cual debe entonces dar pie a un inmediato diagnóstico gastroenterológico, puesto que son de temer severas y posiblemente irreversibles lesiones del hígado. Una discusión de la problemática se encuentra p. ej. en R. Teschke, Dt. *Ärztblatt* 2001, 98:A2584-2589; o en Victor J. Navarro, M.D., y John R. Senior, Drug-Related Hepatotoxicity, *N Engl J Med* 2006; 354:731-739.

[0005] Puesto que en interés de los pacientes, de la salud pública y de la evitación de negativos costes consecutivos para la economía las posibles lesiones hepáticas debidas a efectos secundarios de medicamentos deberían ser detectadas lo más precozmente posible, pero dado que los medios diagnósticos que están disponibles hasta la fecha no son adecuados o bien son adecuados tan sólo insuficientemente para una detección precoz de este tipo, hay gran necesidad de nuevos parámetros diagnósticos fiables y bien determinables para la detección precoz de lesiones hepáticas que se deban a la aportación externa de sustancias lesivas para el hígado tales como en particular medicamentos, pero también estimulantes y drogas adictivas perjudiciales (estupefacientes, excitantes, alcohol) o bien también otras sustancias a las que se vean expuestos grupos de personas y personas.

[0006] Puesto que los análisis de sangre pertenecen a la rutina médica, sería sumamente deseable en particular un nuevo y fiable biomarcador que fuese determinable de manera sencilla y segura en una muestra de sangre y satisficiera los requisitos que se han indicado anteriormente.

[0007] La presente invención se refiere a la identificación de un nuevo biomarcador de este tipo y a su uso dentro del marco de una determinación multiparamétrica para la detección precoz de lesiones hepáticas debidas al uso de medicamentos o drogas adictivas y para la detección de la fase que han alcanzado las lesiones hepáticas, tal como se describe mediante la reivindicación 1.

[0008] En las reivindicaciones dependientes 2 a 8 se encuentran preferidas y destacadas formas de realización.

[0009] La invención se refiere a procedimientos diagnósticos *in vitro* en los que el biomarcador humoral CPS 1 que aparece en la sangre o es mensurable con incrementadas concentraciones ya en un estadio temprano de lesiones hepáticas inducidas por medicamentos o bien también inducidas por drogas adictivas, o bien sus fragmentos, es (son) usado(s) para la detección de lesiones hepáticas que han sido ocasionadas por el uso de medicamentos (productos farmacéuticos, fármacos) o drogas adictivas (estupefacientes, alcohol).

[0010] Los conceptos “medicamentos” y “drogas adictivas” se usan en la presente solicitud en un sentido amplio y general para designar a las sustancias fisiológicamente activas que una persona toma o que le son recetadas a una persona y que bajo determinadas condiciones y/o en determinadas personas inclinadas a ello pueden ocasionar una lesión del hígado. Sin pretender que la enumeración que se hace a título de ejemplo más adelante sea exhaustiva, el concepto de “medicamentos” engloba además en particular a todas las sustancias y preparaciones de sustancias sujetas a prescripción o de venta libre (OTC) en el sentido de la ley de los medicamentos que están destinadas a mediante su aplicación tópica en el cuerpo humano o en el interior del mismo curar, aliviar, prevenir o detectar enfermedades, dolencias, lesiones corporales o trastornos morbosos. Los medicamentos pueden ser sustancias activas

y preparaciones de sustancias activas sintetizadas por la industria farmacéutica y/o transformadas en medicamentos, pero también pueden ser sustancias y preparaciones de sustancias usadas en la medicina naturista, como p. ej. fitofármacos o bien los así llamados complementos nutricionales funcionales.

5 **[0011]** Además, el ámbito de la presente invención no quedará limitado a los “medicamentos” en el amplio sentido anteriormente definido, sino que englobará también a los efectos de otras sustancias farmacológicamente activas que los humanos toman con otros fines distintos de los de curación, quedando tales otras sustancias reunidas en la presente bajo el concepto de “drogas adictivas” y comprendiendo tales otras sustancias p. ej. a los estupefacientes y a los
10 estimulantes potencialmente lesivos para la salud.

[0012] Desde una óptica aún más fundamental, el procedimiento según la invención se refiere a un por cierto para la práctica médica y para la salud pública especialmente importante caso especial de detección precoz de determinadas lesiones hepáticas que son ocasionadas por casi cualesquiera sustancias lesivas para el hígado (tóxicas para el hígado). Con ello, el ámbito de la invención puede también extenderse a los efectos dañinos para la salud de sustancias farmacológicamente activas que las personas toman no conscientemente, sino que las toman p. ej. en forma de impurezas de comestibles o bien como sustancias químicas tóxicas del medio ambiente. El procedimiento es p. ej. también adecuado para la detección precoz de lesiones hepáticas que son provocadas por la acción de sustancias posiblemente desconocidas a las cuales se ven expuestos los pacientes, o sea individuos singulares o bien determinados grupos de población o profesionales. Así, el procedimiento puede p. ej. servir para buscar sustancias tóxicas para el hígado en grupos de población con determinadas formas de vida o bien en determinados grupos profesionales, si en un grupo de población de este tipo se detectan de manera estadísticamente significativa incrementos de las concentraciones de CPS 1 en la sangre.

[0013] A título de ejemplo y sin que de ello pueda derivarse una limitación del ámbito de protección de la invención, pueden mencionarse como grupos de medicamentos a los que pueden corresponder los medicamentos potencialmente lesivos para el hígado los miembros del grupo que consta de medicamentos antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs), otros analgésicos, esteroides anabólicos, contraceptivos hormonales, antigotosos, estatinas, narcóticos de inhalación, antibióticos, sulfonamidas, tuberculostáticos, agentes antitumorales, psicofármacos, agentes cardiocirculatorios, y en particular agentes reductores de la presión sanguínea y fitofármacos.

[0014] Como medicamentos o grupos de medicamentos de este tipo más específicos pueden mencionarse a título de ejemplo los miembros del grupo que consta de paracetamol, tetraciclina, ibuprofeno, clorpromazina, captopril, enalapril, halotano, kavakava, estreptomina, isoniazida y/o rifampicina.

[0015] No quedan dentro del ámbito propiamente dicho de la presente invención las lesiones hepáticas que son ocasionadas por partículas infecciosas de origen microbiano o viral que no pueden calificarse de “medicamentos” o “drogas adictivas”.

[0016] La presente invención se basa en la sorprendente constatación de que en las lesiones hepáticas inducidas por medicamentos, así como en las lesiones hepáticas afines inducidas por drogas adictivas, ya en un estadio temprano en el que no es aún clínicamente manifiesta una lesión hepática son determinables concentraciones claramente incrementadas en la enzima carbamoilfosfato sint(et)asa (CPS 1) o bien una fuerte inmunorreactividad a la CPS 1, y concretamente en clara diferencia con las personas que ciertamente fueron tratadas con los mismos medicamentos, pero en las que sin embargo (p. ej. debido al hecho de que las mismas como individuos reaccionan menos sensiblemente o bien no están expuestas a otros determinados factores de riesgo adicionales) no se desarrollan lesiones hepáticas. Este descubrimiento hace de la CPS 1 un biomarcador humoral que es en particular adecuado para la detección precoz de lesiones hepáticas inducidas por medicamentos.

[0017] Usando un inmunoensayo que fue desarrollado por la Solicitante en relación con la diagnosis de la sepsis y que permite selectivamente la determinación y la medición de la concentración de CPS 1 en un suero o plasma de un paciente humano, se demostró en los locales de la Solicitante que mediante una determinación de la CPS 1 pueden detectarse de manera particularmente precoz lesiones hepáticas, y concretamente antes de que surjan síntomas clínicos de una lesión hepática y antes de que se encuentren significativamente incrementados otros marcadores conocidos (enzimas hepáticas) que están introducidos como marcadores clínicos para afecciones hepáticas, y antes de que las lesiones hepáticas lleguen a ser posiblemente irreversibles.

[0018] Para la diagnosis médica no han desempeñado aún hasta la fecha papel práctico alguno la CPS 1 o los fragmentos de CPS 1 con inmunorreactividad a la CPS 1.

[0019] La enzima CPS 1 (E.C. 6.3.4.16) es en sí misma sin embargo perfectamente conocida desde hace largo tiempo. Esta enzima cataliza la conversión de amoníaco, bicarbonato y 2 ATP con formación de fosfato de carbamoilo en el primer paso del ciclo de la urea. Además también desempeña un papel en la biosíntesis de arginina, que por su lado es un sustrato para la biosíntesis de NO, p. ej. en un shock por endotoxinas (véase Shoko Tabuchi et al., Regulation of Genes for Inducible Nitric Oxide Synthase and Urea Cycle Enzymes in Rat Liver in Endotoxin Shock, Biochemical and

Biophysical Research Communications 268, 221-224 (2000)). La CPS 1 debe diferenciarse de la enzima citosólica CPS 2 (E.C. 6.3.5.5.), que asimismo desempeña un papel en el ciclo de la urea, pero elabora el sustrato glutamina. Es sabido que la CPS 1 está localizada en las mitocondrias y aparece en el tejido hepático en esta forma en grandes cantidades (constituye un 2-6% de la proteína total del hígado). Es conocida desde hace mucho su secuencia de aminoácidos y su localización genética (véase Haraguchi Y. et al., Cloning and sequence of a cDNA encoding human carbamyl phosphate synthetase I: molecular análisis of hyperammonemia, *Gene* 1991, Nov. 1; 107 (2):335-340; véase también la publicación WO 03/089933 A1 de la Solicitante). Con respecto a su papel fisiológico puede hacerse referencia a artículos de revistas tales como p. ej. H.M. Holden et al., Carbamoyl phosphate synthetase: an amazing biochemical odyssey from substrate to product, *CMLS, Cell.Mol.Life Sci.* 56 (1999) 507-522 y la literatura a la que ahí se hace referencia, así como la introducción de la publicación Mikiko Ozaki et al., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Carbamoylphosphate Synthetase I: Plasma Enzyme in Rat Experimental Hepatitis and Its Clearance, *Enzyme Protein* 1994, 95:48:213-221.

[0020] Según Li Yin et al., Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol, *Journal of Hepatology* 1999, 31:497-507, en una lesión hepática por alcohol alílico puede observarse en análisis histológicos tras tres días en todos los hepatocitos un incremento de la expresión de CPS 1.

[0021] Se constató además que en el modelo de la rata y en una hepatitis aguda producida experimentalmente mediante administración de galactosamina se encuentra en el plasma de la rata una actividad inmunológica de CPS 1 marcadamente incrementada (determinada con un inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA) con IgG CPS 1 anti-rata de conejo), concretamente al haber transcurrido 24-48 h después del tratamiento con la galactosamina productora de la hepatitis. Durante la hepatitis aguda se detectaron también de manera creciente en el plasma de las ratas fragmentos de CPS 1 con masas molares de aproximadamente 140 y 125 kDa sin otra caracterización (asignación de secuencia) más precisa, mientras que en un concomitante análisis inmunoblot en muestras de autopsias de humanos no pudieron observarse fragmentos de CPS 1 con inmunorreactividad a la CPS 1 (Mikiko Ozaki et al., loc. cit.).

[0022] En un trabajo de Liu Tong-hua et al., Carbamoyl Phosphate Synthetase 1, A Novel Marker for Gastric Carcinoma, *Chinese Medical Journal*, 102(8):630-638, 1989 se dan a conocer resultados de análisis inmunocitométricos llevados a cabo en muestras de tejido de distintos tumores eliminados por vía operatoria con respecto a una posible presencia de CPS 1. Los autores encontraron tan sólo en tejido de carcinoma del estómago indicaciones de inmunorreactividad a la CPS 1, pero por el contrario no las encontraron en otros tejidos tumorales (del esófago, del intestino grueso, del páncreas, del pulmón, de la mama, del ovario, del riñón, de la próstata y de la vejiga). De ello deducen una posible aptitud de la CPS 1 como marcador tisular selectivo, es decir, como marcador tumoral celular, para el cáncer de estómago. No se trata acerca de una posible aparición de CPS 1 en la circulación.

[0023] Hasta la fecha se ha descrito la determinación de CPS 1 humana en suero o plasma humano, concretamente en publicaciones de la Solicitante, tan sólo en pacientes con sepsis (véase la WO 03/089933 A1; véase también: Joachim Struck et al., Release of the Mitochondrial Enzyme Carbamoyl Phosphate Synthase under Septic Conditions, en: *Shock*, Vol. 23, No. 6. pp. 533-538, 2005) y pacientes con tumores (DE 10 2004 045 705 A1). Los pacientes con sepsis representan una población de pacientes que es claramente distinta de los pacientes que debido a distintas afecciones o distintos problemas de salud son tratados con medicamentos a lo largo de prolongados espacios de tiempo. Lo mismo es válido para las personas que a lo largo de extensos espacios de tiempo toman drogas adictivas o estimulantes potencialmente lesivos (estupefacientes, alcohol) o están expuestas a particulares riesgos de otro tipo.

[0024] En los pacientes con sepsis una afección altamente aguda y que constituye una potencial amenaza para la vida es típicamente supervisada y tratada estacionariamente en la estación de cuidados intensivos de un hospital, mientras que un habitual tratamiento medicamentoso, tal como p. ej. un tratamiento con analgésicos, agentes reductores de la presión sanguínea o psicofármacos, a menudo sirve tan sólo para aliviar o eliminar determinados síntomas de enfermedad en personas que sin estos síntomas se sienten bastante sanas.

[0025] Para la determinación de CPS 1 humana en sueros y plasmas de pacientes según la presente invención puede fundamentalmente procederse como se ha descrito en la publicación WO 03/089933 A1 de la Solicitante en relación con la determinación de CPS 1 como marcador de sepsis. El procedimiento de determinación inmunodiagnóstica que se describe en la parte experimental de la presente solicitud está muy relacionado con el procedimiento que ya ha sido descrito en la anteriormente mencionada solicitud WO 03/089933 A1 de la Solicitante.

[0026] Se indica explícitamente además que en la determinación de CPS 1 según la invención y según el diseño del análisis puede darse una simultánea determinación de CPS 1 tanto en forma de la molécula en esencia completa como también en forma de otros fragmentos más cortos (péptidos parciales que se dan fisiológicamente) de la CPS 1 completa que posiblemente aparecen en el fluido biológico. Cuando en la presente solicitud se habla de una "determinación de CPS 1", debe entenderse que se hace también referencia a una determinación en la que además o en lugar de la enzima CPS 1 completa se determinan o se codeterminan sus fragmentos inmunológicamente correactivos. Debe quedar excluida toda inadecuada y restrictiva interpretación de la enseñanza de la presente invención, en particular en lo relativo a la más específica naturaleza del analito CPS 1 que se determina. Queda también

explícitamente dentro del marco de la presente invención una medición en combinación en la que se determinen al mismo tiempo otras enzimas hepáticas.

[0027] A la luz de los resultados de la medición de un primer colectivo de pacientes que se indican más adelante, la CPS 1 detectable en plasma o suero es muy adecuada para la detección, y en particular para una detección precoz antes de su manifestación clínica, y para el control de la evolución y la terapia de lesiones hepáticas inducidas por medicamentos.

[0028] Para la determinación de la CPS 1 propiamente dicha se prefieren los inmunoensayos de cualquier diseño de ensayo adecuado.

[0029] Los procedimientos inmunodiagnósticos para la determinación de CPS 1 en una muestra biológica pueden estar basados en cualesquiera principios procedimentales conocidos de la inmunodiagnos que se aplican para la detección y la medición de antígenos. La CPS 1 se determina preferiblemente con ayuda de un ensayo de fijación de ligandos en el que para la fijación y la marcación se usan adecuados anticuerpos específicos en forma inmovilizada o bien en forma marcada o marcable.

[0030] También formatos de ensayo competitivo pueden ofrecer particulares ventajas. Preferiblemente no se trabaja además con una marcación enzimática, sino que se elige otra marcación, como p. ej. una marcación para una reacción de determinación por quimioluminiscencia, tal como p. ej. un éster de acridinio. Naturalmente, para la determinación de la CPS 1 debe usarse preferiblemente un ensayo de este tipo que garantice la necesaria alta sensibilidad dentro de la gama de valores de las concentraciones de CPS 1 que se dan y permita separar las señales de medición del fondo del ensayo. El procedimiento de determinación puede estar adaptado a la tecnología de los chips, o bien puede configurarse como prueba rápida (Point-of-Care-Test), que p. ej. hace uso de pasos de separación y determinación inmunocromatográfica.

[0031] En una forma de realización preferida la determinación inmunodiagnóstica se realiza como inmunoensayo en sándwich heterogéneo en el que uno de los anticuerpos está inmovilizado en una fase fija cualquiera, como por ejemplo las paredes de tubitos de ensayo recubiertos (p. ej. de poliestirol; "Coated Tubes"; CT), o bien en placas de microtitulación, por ejemplo de poliestirol, o bien en partículas, como por ejemplo partículas magnéticas, mientras que el otro anticuerpo lleva un resto que representa una etiqueta directamente determinable o permite un enlace selectivo con una etiqueta y sirve para la detección de las estructuras en sándwich formadas. También es posible una posterior inmovilización retrasada en el tiempo usando adecuadas fases fijas.

[0032] Fundamentalmente pueden aplicarse todas las técnicas de marcación que son utilizables en ensayos de la clase descrita, a las que pertenecen las marcaciones con radioisótopos, enzimas o etiquetas de fluorescencia, de quimioluminiscencia o de bioluminiscencia y las marcaciones de color ópticamente directamente detectables, tales como por ejemplo átomos de oro y partículas de colorante, como las que se usan en particular para las llamadas pruebas de Point-of-Care (POC) o pruebas rápidas. Ambos anticuerpos pueden también en el caso de los inmunoensayos en sándwich heterogéneos presentar partes de un sistema de determinación de la clase que se describe a continuación en relación con ensayos homogéneos.

[0033] El procedimiento según la invención puede ser además configurado como procedimiento homogéneo en el que los complejos en sándwich formados por ambos anticuerpos y la CPS 1 a determinar quedan en suspensión en la fase líquida. En un caso de este tipo se prefiere marcar ambos anticuerpos con partes de un sistema de determinación que luego al ser integrados ambos anticuerpos en un único sándwich permite una producción de señal o una emisión de señal. Las técnicas de este tipo son en particular susceptibles de ser configuradas como procedimientos de refuerzo de la fluorescencia o procedimientos de extinción de la fluorescencia. Un procedimiento de este tipo que es particularmente preferido se refiere al uso de reactivos de determinación que se aplican por parejas, tales como los que están por ejemplo descritos en los documentos US-A-4 822 733, EP-B1-180 492 o EP-B1-539 477 y en el estado de la técnica que ahí se cita. Dichos procedimientos permiten directamente en la mezcla de reacción una medición que detecta selectivamente tan sólo productos de reacción que contengan en un único inmunocomplejo ambos componentes de marcación. Como ejemplo debe hacerse referencia a la tecnología que se ofrece bajo las marcas TRACE® (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) o KRYPTON®, la cual pone en práctica las enseñanzas de las solicitudes anteriormente mencionadas.

[0034] En lugar de una determinación inmunodiagnóstica de CPS 1 o de la inmunorreactividad a la CPS 1, con finalidades diagnósticas la determinación de la CPS 1 deberá dado el caso también poder hacerse indirectamente como determinación de una actividad enzimática que corresponda a la actividad de CPS 1 o a la actividad residual de los fragmentos de CPS 1 en la sangre. Puesto que en las personas sanas la CPS 1 no aparece en la circulación, una actividad enzimática de CPS 1 mensurable en la sangre de un paciente puede ser un indicio significativo desde el punto de vista diagnóstico de una seria perturbación del perfecto estado de salud del paciente.

[0035] A continuación se aclara más detalladamente la determinación de CPS 1 en plasmas de pacientes sanos, de pacientes tratados con medicamentos sin lesión hepática y de pacientes tratados con los mismos medicamentos y en los que llegó a producirse una lesión hepática inducida por medicamentos, haciéndose referencia a una figura y a una correspondiente tabla.

5

[0036] La figura muestra lo siguiente:

Figura 1 los resultados de la medición de la concentración de CPS 1 (en U/ml) en plasmas de personas normales sanas (A) y de pacientes que fueron tratados con distintos medicamentos y en los que llegaron a producirse lesiones hepáticas (C) o en los cuales no llegaron a producirse lesiones hepáticas (B), obtenidos usando el inmunoensayo que se describe más detalladamente en la parte experimental.

10

PARTE EXPERIMENTAL

15

Descripción del ensayo

1. Fabricación de los anticuerpos

a) Inmunógenos

20

[0037] Fueron seleccionadas dos distintas secuencias de péptidos de la secuencia completa de la CPS 1 humana, y concretamente, una primera secuencia de péptidos 1 (EFEGQPVDFVDPNKQN), que corresponde a los aminoácidos 184-199 de la secuencia de la CPS 1 humana (véase el péptido PCEN17 según la WO 03/089933 A1), y una segunda secuencia de péptidos (FHGTSSRIGSSMKS), que corresponde a los aminoácidos 781-794 de la secuencia de la CPS 1 humana. Cada péptido fue sintetizado por la firma Jerini (de Berlín, Alemania) en una forma provista de un residuo de cisteína aminoterminal (Cys0). Los péptidos sintetizados usados para las siguientes inmunizaciones se muestran en el protocolo de secuencias como ID SEC N°: 1 o ID SEC N°: 2.

25

b) Anticuerpos

30

[0038] Para la inmunización ambos péptidos sintetizados fueron conjugados con la hemocianina de *Limulus polyphemus*, y, como también se describe en la WO 03/089933 A1, fueron producidos anticuerpos policlonales en ovejas por la firma Ltd. Micropharm (de Carmarthenshire, Gran Bretaña).

35

2. Purificación de los anticuerpos

[0039] Los anticuerpos fueron purificados mediante purificación por afinidad ligando-específica. Para ello los péptidos Cys(0) 1 y 2 fueron primeramente acoplados a gel SulfoLink de la firma Pierce (de Boston, EE.UU.). La fijación se hizo según la prescripción del fabricante.

40

[0040] Se procedió de la manera siguiente: Columnas de policarbonato (de 15 mm x 80 mm) fueron llenadas con 5 ml de matriz de afinidad. Tras el equilibrado de las columnas con PBS (PBS = salina tamponada con fosfato) (NaCl 136mM, KH₂PO₄ 1,5mM, Na₂HPO₄ 2H₂O 20,4mM, KCl 2,7mM, pH 7,2), 5 mg de los respectivos péptidos fueron pesados, disueltos en PBS y pasados a las columnas cerradas. El material de gel fue homogeneizado mediante agitación. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente y tras la sedimentación del material de gel, las columnas fueron lavadas 5 veces con 3 ml de PBS. Para la saturación de los sitios de fijación libres le fueron añadidos al material de las columnas respectivamente 5 ml de una solución de L-cisteína 50mM, y tras homogeneización el material de gel fue incubado de nuevo a temperatura ambiente por espacio de 15 min. Tras la sedimentación del material de gel cada columna fue enjuagada 6 veces con 5 ml de una solución de NaCl 1M, y fue a continuación enjuagada de nuevo con PBS.

50

[0041] El material de gel fue mezclado con 25 ml de la respectiva combinación antiséptica y fue incubado durante la noche a temperatura ambiente y bajo ligera agitación. Las mezclas de suero y gel fueron pasadas a columnas de policarbonato, y el suero sobrante fue eliminado. Las columnas fueron a continuación lavadas con 250 ml de PBS, para retirar las proteínas séricas no fijadas. La desorción de los anticuerpos fijados se hizo mediante elución de la columna con ácido cítrico 50mM (pH 2,2). El eluido fue recogido en fracciones de 1 ml. La concentración de proteína de cada fracción fue determinada con ayuda del kit de ensayo de proteínas BCA de la firma Perbio (de Bonn, Alemania), y fueron reunidas las fracciones con un contenido de proteína > 1 mg/ml. Los anticuerpos purificados por afinidad fueron pasados a tampón de PBS mediante diálisis, y tras una nueva determinación del contenido de proteína fueron a continuación almacenados a 4°C.

55

60

3. Inmovilización / marcación de los anticuerpos

5 [0042] Los anticuerpos purificados contra el péptido que corresponde a la secuencia de aminoácidos 781-794 fueron inmovilizados en tubitos de poliestirol (Startubes, de 12 mm x 75 mm, de la firma Greiner, de Alemania). Para ello las soluciones de anticuerpos fueron diluidas con PBS a una concentración de proteína de 6,7 µg/ml, y se pipetaron 300 µl por cada tubito (lo cual corresponde a 2 µg de anticuerpos por tubito). Éstos fueron incubados por espacio de 20 h a temperatura ambiente y fueron a continuación lavados 3 veces con 4 ml de PBS cada vez. Hasta su posterior uso, los tubitos fueron almacenados a 4°C.

10 [0043] El anticuerpo contra el péptido que corresponde a la secuencia de aminoácidos 184-199 (1 mg/ml en PBS) fue marcado por luminiscencia con éster de acridinio-N-hidroxi-succinimida (1 mg/ml en acetonitrilo, de la firma InVent, de Hennigsdorf, Alemania). Para la marcación 200 µl de anticuerpos fueron mezclados con 4 µl de éster de acridinio y fueron incubados por espacio de 20 min., y los sitios de fijación de éster de acridinio libres fueron saturados mediante adición de 40 µl de una solución de glicina 50mM. La preparación de marcación fue separada del éster de acridinio libre mediante HPLC (HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución) en una columna de filtración en gel BioSil 400 (de la firma BioRad, de Múnich, Alemania). Como eluyente se usó PBS.

4. Calibración relativa

20 [0044] Para poder determinar las concentraciones relativas de CPS 1, se usó como material patrón una colección de plasmas de pacientes humanos con SIRS (SIRS = síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) con concentraciones de CPS 1 particularmente altas. La concentración de CPS 1 de esta colección fue establecida arbitrariamente en 150 U/ml. Partiendo de esta colección y mediante dilución serial con plasma humano exento de CPS 1 de sujetos sanos fueron fabricados patrones cuyas concentraciones arbitrarias (en unidades relativas, U) fueron atribuidas en correspondencia con su dilución.

5. Realización de los ensayos

30 [0045] 50 µl de una muestra de plasma y 100 µl de tampón PBS (con EDTA 10mM) (EDTA = ácido etilendiaminotetraacético) fueron pipetados por cada tubito recubierto con anticuerpos e incubados por espacio de 16 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con 1 ml de PBS en cada uno fueron añadidos por cada tubito 15 ng del anticuerpo marcado (en 200 µl de tampón PBS, EDTA 10mM). Los tubitos fueron incubados por espacio de otras 2 h, y a continuación el anticuerpo-indicador no fijado fue eliminado mediante 5 lavados con 1 ml de PBS para cada uno. El anticuerpo marcado fijado en el tubito fue cuantificado mediante medición de la luminiscencia en un luminómetro (Berthold LB 952T/16).

Medición de plasmas con EDTA de personas sanas y de pacientes que son/fueron tratados con distintos medicamentos

40 [0046] Sirvieron de muestras de ensayo para la determinación de CPS 1 por un lado 50 plasmas de personas de control sanas, así como por otro lado 73 plasmas de pacientes que fueron tratados con distintos medicamentos que se indican en la Tabla 1 y para los que es sabido que pueden ser potencialmente lesivos para el hígado. Los 73 plasmas de pacientes comprendían los plasmas de 50 pacientes en los que no se constató lesión hepática alguna, así como otros 23 plasmas de pacientes que fueron tratados con los mismos medicamentos que se indican en la Tabla 1, pero en los que llegó a producirse una lesión hepática.

50 [0047] Se pipetaron al interior de los tubitos de ensayo anteriormente mencionados en cada caso 50 µl de patrón o muestra y 200 µl de tampón de ensayo. Se efectuó incubación con sacudimiento por espacio de 18 horas a 22°C. Luego se efectuaron por cada tubito 4 lavados con 1 ml de solución de lavado (Tween 20 al 0,1%) para cada uno. Entonces se pipetaron al interior de cada tubito 200 µl de tampón de ensayo que contenía 0,5 millones de RLU (RLU = unidades relativas de luz) del anticuerpo-indicador marcado con MA70. Se efectuó incubación con sacudimiento por espacio de dos horas a 22°C. Entonces se efectuaron 4 lavados con 1 ml de solución de lavado (Tween 20 al 0,1%) por tubito para cada uno, se dejó que se escurriesen los tubitos, y en un luminómetro (de la firma BERTHOLD, LB952T; reactivos de base de la BRAHMS AG) se midió la quimioluminiscencia fijada en el tubito.

55 [0048] Usando el software (software = soporte lógico informático) MultiCalc (Spline Fit) fue leída la concentración de inmunorreactividad a la CPS 1. Fueron obtenidos los resultados siguientes:
El valor mediano de las concentraciones de CPS 1 medidas en el colectivo de las 50 personas sanas estaba situado al nivel de 2,4 U/ml.

60 [0049] Los resultados para las personas tratadas con medicamentos sin lesión hepática (B) y para las personas tratadas con medicamentos en las que se produjo una lesión hepática (C) están indicados en la Tabla siguiente, y, además de los adicionales valores de medición para las personas sanas (A), están representados gráficamente en la Figura 1.

Tabla 1

Medicamento	Personas tratadas sin lesión hepática (B)	Personas tratadas con lesión hepática (C)
Paracetamol	5	2
Estatinas	5	4
Esteroides anabólicos	3	1
Halotano	7	2
Clorpromazina	5	3
Sulfonamidas	4	2
Tetraciclina	6	3
Rifampicina	3	3
Captopril	6	2
Ibuprofeno	6	1

[0050] Para los resultados de las mediciones en 50 pacientes del grupo (B) se halló un valor mediano de 2,8 U/ml, y para el grupo (C) se halló un valor mediano de 253 U/ml.

5 **[0051]** Concomitantes investigaciones de la Solicitante han puesto además de manifiesto que en las lesiones hepáticas como las que típicamente pueden producirse como efectos secundarios de medicamentos se produce un deterioro de las mitocondrias y una liberación de CPS 1 desde las células hepáticas que va ligada al mismo, antes de que tenga lugar una apoptosis de las células hepáticas o una necrosis del tejido hepático. La liberación de CPS 1 es con ello determinable en un punto en el tiempo en el que no son aún observables otros síntomas clínicos, que entre otras cosas a continuación pueden entonces también conducir a variaciones de las concentraciones de los parámetros hepáticos que se determinan tradicionalmente, como p. ej. otras enzimas hepáticas, que normalmente no aparecen incrementados al efectuarse la medición hasta haberse iniciado en el hígado procesos necróticos.

15 **[0052]** Si la acción de la sustancia externa lesiva, como p. ej. el medicamento, es detenida en la fase en la que en esencia tan sólo se mide una CPS 1 incrementada, las mitocondrias dañadas pueden ser sustituidas en las células hepáticas por lo demás no lesionadas, y el hígado se restablece. No se producen lesiones hepáticas irreversibles como las que pueden producirse al establecerse un posible diagnóstico con posterioridad sobre la base de los hallazgos clínicos convencionales y de los parámetros hepáticos conocidos cuya liberación está relacionada con procesos necróticos.

20 **[0053]** Una medición profiláctica de CPS 1 en personas que son tratadas con medicamentos a lo largo de prolongados espacios de tiempo, que toman estimulantes y drogas adictivas potencialmente dañinos o que debido a sus hábitos nutricionales y a sus condiciones de vida están expuestas a un incrementado riesgo de desarrollar lesiones hepáticas, puede hacer que sean detectables precozmente las lesiones hepáticas que estén desarrollándose, con lo cual pueden tomarse contramedidas con la debida antelación (p. ej. pueden dejarse los medicamentos que dan lugar al problema) y pueden evitarse los daños tardíos y los costes que van ligados a los mismos para los pacientes y para toda la economía.

30 **[0054]** Si además de la CPS 1 se codeterminan las tradicionales enzimas hepáticas que son mensurables en el suero en más avanzadas fases de la lesión hepática, de su simultánea determinabilidad o no determinabilidad pueden sacarse directamente conclusiones con respecto a la fase ya alcanzada de la lesión hepática. Así significa p. ej. una no determinabilidad de algunas de las o de todas las adicionales enzimas hepáticas determinadas paralelamente, tales como p. ej. la GOT (glutamato-oxalacetato transaminasa), la GPT (glutamato-piruvato transaminasa en suero), la GLDH (glutamato deshidrogenasa), la γ -GT (γ -glutamil transpeptidasa), la sorbitol deshidrogenasa, la fosfatasa alcalina, la ALT (alaninamino transferasa), la AST (aspartato aminotransferasa), la GDH (glicerofosfato deshidrogenasa), la LHD (lactato deshidrogenasa), la colinesterasa, la LAP (leucinamino peptidasa), la GGTP (glutamil transpeptidasa) y otras enzimas hepáticas determinadas dentro del marco de la diagnosis del hígado, que la lesión hepática no está aún muy avanzada y puede hacerse retroceder p. ej. poniendo fin a la exposición, mientras que la simultánea determinabilidad de algunas de las enzimas hepáticas mencionadas o de todas ellas es indicativa de una lesión hepática avanzada y eventualmente ya irreversible. La determinación de CPS 1 dentro del marco de una medición en combinación queda por consiguiente asimismo explícitamente dentro del marco de la presente invención.

45 **[0055]** Para una medición en combinación de este tipo pueden utilizarse todas las modernas técnicas de medición de las que se dispone hoy en día (como p. ej. la tecnología de chips) y todas las modernas técnicas de evaluación de las que se dispone hoy en día (ordenadores con los correspondientes algoritmos de evaluación).

50 **[0056]** Debido a la precoz aparición de la CPS 1 en la sangre, la realización de una determinación de CPS 1 se ofrece también dentro del marco de los ensayos de nuevos medicamentos durante el desarrollo de los medicamentos, para detectar con la máxima antelación posible los posibles efectos lesivos para el hígado de los medicamentos candidatos sometidos a ensayo y para evitar posteriores daños para la salud del paciente y pérdidas económicas y que resulte dañada la imagen del fabricante.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0057]

- 5 <110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft
- <120> Procedimiento in vitro para la detección y la detección precoz y para el control acompañante de la terapia de lesiones hepáticas inducidas por medicamentos
- 10 <130> 4927PCT
- <140>
- <141>
- 15 <160> 2
- <170> Patentin versión 3.2
- <210> 1
- 20 <211> 17
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> Sintética
- <400> 1
- 30 Cys Glu Phe Glu Gly Gln Pro Val Asp Phe Val Asp Pro Asn Lys Gln
1 5 10 15
- Asn**
- <210> 2
- 35 <211> 15
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 40 <223> Sintética
- <400> 2
- Cys Phe His Gly Thr Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ser Met Lys Ser
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *in vitro* para la detección precoz de lesiones hepáticas inducidas por medicamentos o inducidas por drogas adictivas y para la detección de la fase ya alcanzada de la lesión hepática, **caracterizado por el hecho de que** en muestras de suero o de plasma de pacientes que son o fueron tratados con medicamentos potencialmente lesivos para el hígado y/o que toman estimulantes y drogas adictivas perjudiciales y/o que están expuestos a sustancias potencialmente tóxicas para el hígado se determina la aparición de la enzima humana carbamoilfosfato sintasa 1 (CPS 1) o su concentración y se determina además la aparición de algunas de las o de todas las enzimas hepáticas seleccionadas de entre los miembros del grupo que consta de GOT (glutamato-oxalacetato transaminasa), GPT (glutamato-piruvato transaminasa en suero), GLDH (glutamato deshidrogenasa), γ -GT (γ -glutamil transpeptidasa), sorbitol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, ALT (alaninamino transferasa), AST (aspartato aminotransferasa), GDH (glicerofosfato deshidrogenasa), LHD (lactato deshidrogenasa), colinesterasa, LAP (leucinamino peptidasa) y GGTP (glutamil transpeptidasa), y a partir de la simultánea determinabilidad o no determinabilidad de las enzimas hepáticas mencionadas además de la CPS 1 se sacan conclusiones con respecto a la fase ya alcanzada de la lesión hepática.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** la determinación de CPS 1 se realiza por vía inmunodiagnóstica.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado por el hecho de que** la determinación inmunodiagnóstica de CPS 1 se efectúa con ayuda de un ensayo de fijación de ligandos del tipo sándwich selectivo para la CPS 1 humana.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por el hecho de que** la determinación de CPS 1 se efectúa con ayuda de procedimientos de determinación que detectan la enzima CPS 1 completa y/o fragmentos de la misma.
- 25 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por el hecho de que** está configurado como prueba rápida o Prueba en el Point-of-Care.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** la determinación de CPS 1 se efectúa como determinación de la actividad enzimática de CPS 1.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por el hecho de que** se determina la CPS 1 en muestras de suero o de plasma de pacientes que son tratados con medicamentos seleccionados de entre los miembros del grupo que consta de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), otros analgésicos, esteroides anabólicos, contraceptivos hormonales, antigotosos, estatinas, narcóticos de inhalación, antibióticos, sulfonamidas, tuberculostáticos, agentes antitumorales, psicofármacos, agentes cardiocirculatorios, fitofármacos y paracetamol.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado por el hecho de que** el tratamiento de los pacientes comprende un tratamiento con medicamentos seleccionados de entre los miembros del grupo que consta de tetraciclinas, ibuprofeno, clorpromazina, captopril, enalapril, halotano, kavakava, estreptomina, isoniazida y/o rifampicina.
- 45

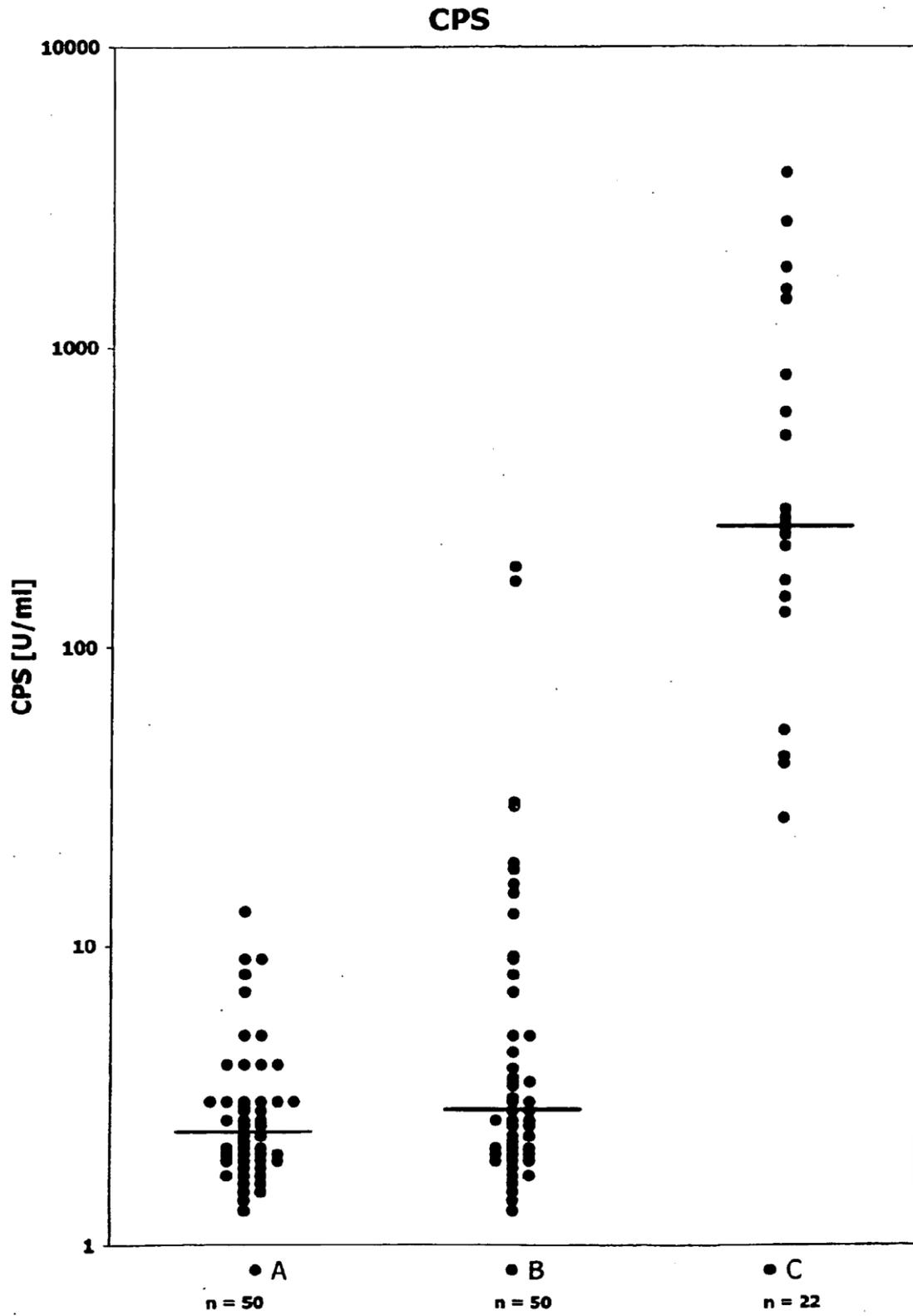


Fig. 1.