

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 940**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2013 PCT/FR2013/050143**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13110894**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2013 E 13704195 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2807486**

54 Título: **Procedimiento para pronosticar, in vitro, en una muestra sanguínea la probabilidad para un paciente de evolucionar hacia un dengue severo**

30 Prioridad:

**24.01.2012 FR 1250646**

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

**01.08.2017**

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)  
69280 Marcy l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**BEDIN, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 627 940 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 para pronosticar, *in vitro*, en una muestra sanguínea la probabilidad para un paciente de evolucionar hacia un dengue severo

5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento para el pronóstico precoz de dengue severo o dengue hemorrágico que utiliza unos marcadores proteicos.

10 Esos últimos 30 años, el dengue, una enfermedad viral transmitida por los mosquitos hematófagos urbanos del género *Aedes*, se ha extendido a través del mundo de manera preocupante. Actualmente es un verdadero problema de salud pública para más de un centenar de países situados en la zona subtropical, particularmente en las zonas del Pacífico Occidental, América del sur y Asia del Sureste. La emergencia de la enfermedad se debe en gran parte a la explosión demográfica y a la urbanización anárquica. Las anomalías climáticas tienen también un papel no insignificante. En este sentido, el dengue podría emerger en las regiones occidentales del globo que hasta ahora se han librado del virus. Así, *Aedes albopictus*, uno de los vectores de la enfermedad, se ha encontrado recientemente en el norte de Italia y en el Sur de Francia. Últimamente, unos casos de dengue autóctonos se han señalado en el sur de Francia. Se estima que cerca de 3 mil millones de personas están expuestas a los riesgos del dengue. Cerca de un millón de hospitalizaciones se registran anualmente y los fallecimientos se cuentan por miles. Los niños son las principales víctimas de la enfermedad. El virus del dengue es un virus recubierto de ARN monocatenario de polaridad positiva de la familia de los Flaviviridae. El genoma del virus (11000 nucleótidos) codifica una poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos que sufre una escisión co- y post-traducciona que da como resultado proteínas estructuras (C, prM, E) y proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Existen 4 estereotipos virales (DV1 a DV4), que pueden coexistir en zonas endémicas. Existe aproximadamente un 70% de homología de secuencias entre los diferentes serotipos. La infección por un serotipo dado confiere una inmunidad a largo plazo para este serotipo. La protección cruzada dura sólo algunos meses: la reinfección es por lo tanto posible con un serotipo diferente. La manifestación clínica más común (fiebre de dengue "clásica" o *Dengue Fever*: DF) es un estado febril de algunos días acompañado en particular de cefaleas severas, de lumbalgias, de dolores musculares y articulares, que regresan espontáneamente sin tratamiento específico después de algunos días. Sin embargo, se asiste a veces a complicaciones que conducen al dengue hemorrágico (*Dengue Hemorrhagic Fever*: DHF). En este caso, se observa un aumento transitorio de la permeabilidad vascular y una fuga del plasma responsable de una trombopenia y de una coagulopatía. En los casos más severos, la fuga de plasma puede conducir a un choque hipovolémico mortal (*Dengue Shock Syndrome*: DSS) si el paciente no se trata rápidamente. Unas afecciones hepáticas y neurológicas, raras pero mortales, están también asociadas a la gravedad de la enfermedad. Variable según las epidemias, el porcentaje de mortalidad puede alcanzar el 5% en casos declarados de DHF. Este porcentaje puede aumentar hasta 20% sin un tratamiento hospitalario o tratamientos adaptados.

40 El 90% de los casos de DHF tienen lugar durante una infección secundaria por un serotipo heterólogo y el 10% durante una infección primaria, habitualmente en recién nacidos de 6 meses a 1 año de edad. Existen varios factores que influyen sobre la gravedad de la infección, tales como los factores del hospedante, el serotipo y el genotipo del virus, el orden de sucesión de los virus infectantes, la calidad y la cantidad de anticuerpos a reacciones cruzadas y la respuesta CD4/CD8. Las causas exactas a la aparición de la DHF no están, no obstante, siempre conocidas con certeza. En una primera hipótesis, son las fuerzas de selección ejercidas en el virus que conducen a la selección de un "super-virus". Unos estudios han mostrado una correlación entre la carga viral y la gravedad de la enfermedad. Unos estudios han implicado también las proteínas virales E y NS1 en la patogenicidad. La secuencia de los serotipos infectantes, el intervalo entre cada infección son también unos determinantes clínicos importantes.

50 Una infección secundaria con un serotipo diferente está frecuentemente asociada a la gravedad de la enfermedad, pero no es un factor de certeza. Es la base de la segunda hipótesis, la hipótesis de la facilitación de la infección por unos anticuerpos anti-dengue de baja afinidad, que no se ha podido confirmar jamás *in vivo* en ausencia de modelo animal. Se basa en la presencia de anticuerpos neutralizantes de baja afinidad que facilitan la infección *in vitro* de los macrófagos mediante su receptor Fc a las inmunoglobulinas. La presencia de los complejos inmunes favorece por otro lado la activación del complemento.

55 La activación y la proliferación excesiva de los linfocitos T CD4 y CD8+ de memoria conllevarían la producción incrementada de citoquinas y de mediadores celulares. La concomitancia de estos diferentes elementos podría ser responsable de la patogenia. Aunque la puesta en evidencia del papel clave de la activación linfocitaria y de la secreción de mediadores en la fisiopatología es bastante bien aceptada, es muy difícil mostrar una correlación clara con la aparición de DHF.

60 Los factores genéticos juegan probablemente un papel ya que varios estudios han mostrado el papel o bien protector o bien patógeno de ciertos alelos de HLA clase 1. Sin embargo, los resultados son bastante contradictorios y varían según el origen de las extracciones.

65 Hasta ahora, ningún determinante específico de la virulencia se ha demostrado con certeza. Además, como no existe ninguna vacuna contra el virus del dengue, los únicos tratamientos disponibles son unos tratamientos sintomáticos. Es por ello que es importante poder vigilar las epidemias y pronosticar los casos severos para una

toma de tratamiento hospitalario adaptado [1, 2, 3].

Numerosos marcadores para el pronóstico de la evolución hacia un dengue severo ya se han descrito en la bibliografía científica. Así, Pawitan Jeanne A [5] describe la evaluación de la carga viral, la utilización de citoquinas, de interferones, de factores tumorales, de interleuquinas o también de la proteína NS1 como marcador biológico de la predicción del dengue severo. Srikiatkachorn A *et al.*, 2010 [6] divulgan también la utilización de citoquinas (tales como sCD4, sCD8, IL-1Ra, etc.), de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), o también de la proteína NS1 como marcadores precoces de evolución hacia un dengue severo.

En 2009, Lidiane M Albuquerque *et al.*, [7] describen la utilización de varias proteínas de las cuales la DBP (vitamin D-binding protein), la FGG (fibrinogen gamma chain), la apolipoproteína J o también el complemento C3 como biomarcadores para el diagnóstico, el pronóstico o también el tratamiento del dengue.

La publicación de Chaiyaratana Wathanee *et al.* [8] propone, por su parte, estudiar el nivel de ferritina en el suero de niños que padecen dengue en fase aguda con el objetivo de predecir el riesgo de contraer un dengue hemorrágico.

La solicitud de patente WO 2009/145810 describe la utilización de un miembro de la familia de los receptores de la citoquina (ST2) para el diagnóstico del dengue severo y no para el pronóstico de la probabilidad de evolucionar hacia un dengue severo.

La utilización de la LGR ya se ha descrito, pero para el diagnóstico de enfermedades diferentes. Así, la solicitud de patente WO 2011/092219 describe la utilización de LRG como biomarcador para el diagnóstico de las enfermedades cardio-vasculares, más particularmente unas disfunciones ventriculares e insuficiencias cardíacas y para la predicción de las paradas cardíacas. La publicación de Weivoda S *et al.* (2008) [9] describe también un estudio sobre el porcentaje de glicoproteína LRG en el suero de pacientes que padecen infección bacteriana, de SIDA, de artritis, de trastornos neurológicos o también de Parkinson.

Los métodos actualmente utilizados para el diagnóstico del dengue no permiten pronosticar una evolución hacia un dengue severo. Como mucho, los métodos serológicos permiten discriminar las infecciones primarias y secundarias y los métodos moleculares permiten detectar el virus y efectuar el serotipaje.

La presente invención responde a las problemáticas presentadas anteriormente, mediante un procedimiento que permite al mismo tiempo una detección precoz y específica de proteínas en una muestra sanguínea que permite pronosticar los casos de dengues severos (DHF y/o DSS). En efecto, la solicitante ha encontrado que unas proteínas eran cuantitativamente más abundantes o sobreexpresadas en los casos de dengues severos en comparación con su cantidad o expresión en casos de dengues clásicos en muestras sanguíneas que corresponden a la sangre total, del suero o del plasma. Muy particularmente, se muestran por primera vez y de manera totalmente inesperada que la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína (LRG) está sobreexpresado en el caso de DHF y que constituye por lo tanto un marcador de pronóstico del dengue severo.

Asimismo, la presente invención tiene por objeto un procedimiento para pronosticar, *in vitro*, en una muestra sanguínea, la probabilidad para un paciente de evolucionar hacia un dengue severo, en el que:

a) se determina la cantidad de al menos un marcador que es la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína en dicha muestra sanguínea

b) se compra la cantidad de la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia de dicho marcador obtenido a partir de un grupo de individuos que se diagnosticaron como padeciendo un dengue no severo,

en el que si la cantidad de leucina-rica en alfa-2 glicoproteína determinada en la etapa a) es superior a la cantidad de referencia establecida en la etapa b), se pronostica que el paciente evolucionará hacia un dengue severo.

En un modo de realización del procedimiento de la invención, en la etapa a) se determina además la cantidad de al menos otro marcador seleccionado entre la proteína de unión a vitamina D y la ferritina en la muestra sanguínea y en la etapa b) se compara la cantidad de dicho otro marcador de la etapa a) con una cantidad de referencia de dicho otro marcador obtenida a partir de un grupo de individuos que han sido diagnosticados como padeciendo un dengue no severo y si la cantidad de dicho al menos otro marcador determinada en la etapa a) es superior a la cantidad de referencia establecida en la etapa b), se pronostica que el paciente evolucionará hacia un dengue severo.

En otro modo de realización del procedimiento de la invención, en la etapa a), se determina además la cantidad de al menos otros dos marcadores seleccionados entre la proteína de unión a vitamina D y la ferritina en la muestra sanguínea y en la etapa b) se compara la cantidad de cada uno de los dos otros marcadores de la etapa a) con una cantidad de referencia para cada uno de dichos otros marcadores obtenidos a partir de un grupo de individuos que han sido diagnosticados como padeciendo un dengue no severo y si la cantidad de cada uno de los otros marcadores determinada en la etapa a) es superior a la cantidad de referencia de cada uno de los marcadores

establecida en la etapa b), se pronostica que el paciente evolucionará hacia un dengue severo.

La invención tiene también por objeto la utilización para el pronóstico *in vitro* de un dengue severo en un paciente de:

- 5 - la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína como marcador de la patología,
- la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína y proteína de unión a vitamina D o ferritina como marcadores de la patología, y
- 10 - leucina-rica en alfa-2 glicoproteína y proteína de unión a vitamina D y ferritina como marcadores de la patología.

La invención se refiere también a un kit para el pronóstico *in vitro* de un dengue severo que comprende:

- 15 - una pareja de unión de la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína,
- una pareja de unión de la Proteína de unión a Vitamina D, y
- 20 - una pareja de unión de la ferritina, más facultativamente
- al menos una pareja de unión de al menos una proteína del virus del dengue seleccionada entre la proteína NS1, la proteína de cubierta y la proteína prM.

#### Definiciones

Por muestra sanguínea, se entiende la sangre total, el suero y el plasma.

Por pareja de unión se entiende por ejemplo los receptores, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos, los análogos de anticuerpos y cualquier otro ligando capaz de unirse a una proteína.

Los anticuerpos parejas de unión son, por ejemplo, o bien unos anticuerpos policlonales, o bien unos anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos policlonales pueden ser obtenidos por inmunización de un animal con el inmunógeno apropiado, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los demás constituyentes del suero, en particular por cromatografía de afinidad sobre una columna sobre la cual se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante la técnica de los hibridomas cuyo principio general se recuerda a continuación.

En primer lugar, se inmuniza un animal, generalmente un ratón con el inmunógeno apropiado, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra este antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos son después fusionados con unas células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a unos hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente a la proteína podrán ser ensayadas por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia (transferencia western) en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un bisensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados son a continuación purificados, en particular según la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser también unos anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

Por "análogos de anticuerpos" se entienden unos compuestos biológicos y/o químicos que poseen las mismas capacidades de unión que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o unas capacidades de unión similares. En particular, los análogos de anticuerpos incluyen pequeñas proteínas que, como los anticuerpos son capaces de unirse a una diana biológica que permite así detectarla, capturar o simplemente determinarla dentro de un organismo o de una muestra biológica. Los campos de aplicaciones de estos análogos de anticuerpos son prácticamente tan amplios como los de los anticuerpos. A título de ejemplo, se pueden citar las Nanofitines<sup>TM</sup>, pequeñas proteínas comercializadas por la compañía AFFILOGIC.

Las parejas de unión específicas de la proteína buscada pueden ser utilizadas como reactivo de captura, como reactivo de detección o como reactivos de captura y de detección.

La visualización de las reacciones inmunológicas, es decir de la unión proteína/pareja de la unión, se pueden efectuar mediante cualquier medio de detección por medio de un marcado, de la pareja de unión.

5 Por marcado, se entiende la fijación de un reactivo marcador capaz de generar una señal detectable, es decir un compuesto, una sustancia o una partícula que puede ser detectada por medios visuales, fluorescentes, instrumentales.

Una lista no limitativa de estos reactivos marcadores consiste en:

10 - las partículas metálicas o de aleaciones, tales como las partículas de oro coloidal,

- las partículas de polímero, tales como las partículas de látex colorados,

15 - las partículas magnéticas,

- las moléculas fluorescentes,

- las moléculas quimioluminiscentes.

20 A título de ejemplo de ensayos inmunológicos tales como se ha definido anteriormente, se pueden citar los métodos "sándwich" y de "competición".

Figuras:

25 Las figuras ilustran la confirmación y la validación de los resultados de ICPL para cada marcador candidato seleccionado por un ensayo ELISA cuantitativo efectuado en muestras individuales de pacientes extraídas durante la fase aguda de la enfermedad (pacientes DF y DHF), antes de la defervescencia. En todos los casos, la lectura se efectúa a una densidad óptica (DO) de 450 nm. Los resultados se han obtenido sobre muestras de tahitianos, sobre las muestras de colombianos y sobre una mezcla de los dos. La media calculada se representa mediante una línea horizontal (Programa GraphPad Prism). Los valores corresponden a dos ensayos independientes efectuados por duplicado.

35 La figura 1 ilustra los resultados obtenidos para la determinación cuantitativa por ensayo ELISA del marcador LRG sobre unas muestras de plasma que provienen de pacientes tahitianos.

La figura 2 ilustra los resultados obtenidos para la determinación cuantitativa por ensayo ELISA del marcador LRG sobre unas muestras de suero que provienen de pacientes colombianos.

40 La figura 3 ilustra los resultados obtenidos para la determinación cuantitativa por ensayo ELISA del marcador ferritina sobre unas muestras de plasma que provienen de pacientes tahitianos.

La figura 4 ilustra los resultados obtenidos para la determinación cuantitativa por ensayo ELISA del marcador ferritina sobre unas muestras de plasma que provienen de pacientes colombianos.

45 La figura 5 ilustra los resultados obtenidos para la determinación cuantitativa por ensayo ELISA del marcador ferritina sobre una mezcla de plasmas de origen tahitiano y de sueros de origen colombiano.

La figura 6 ilustra los resultados obtenidos para la determinación cuantitativa por ensayo ELISA del marcador CRP sobre unas muestras de plasma que provienen de pacientes tahitianos.

50 La figura 7 ilustra los resultados obtenidos para la determinación cuantitativa por ensayo ELISA del marcador CRP sobre unas muestras de plasma que provienen de pacientes colombianos.

55 La figura 8 ilustra los resultados obtenidos para la determinación cuantitativa por ensayo ELISA del marcador Proteína de unión a Galectina-3 sobre unas muestras de plasma que provienen de pacientes tahitianos.

La figura 9 ilustra los resultados obtenidos para la determinación cuantitativa por ensayo ELISA del marcador Proteína de unión a Vitamina D sobre una mezcla de plasmas de origen tahitiano y de sueros de origen colombiano.

60 La figura 10 ilustra los resultados obtenidos para la determinación cuantitativa por ensayo ELISA del marcador Afamina sobre unas muestras de plasma que provienen de pacientes tahitianos.

Ejemplos

65 Ejemplo 1: Selección y pre-tratamiento de las muestras

Se han seleccionado 10 muestras de plasma de pacientes que provienen de un estudio retrospectivo llevado a cabo por el Institut Louis Malardé, Papeete, Tahiti (Polinesia Francesa), entre las cuales 5 muestras de pacientes que han desarrollado un dengue clásico (DF) y 5 muestras de pacientes que han desarrollado un dengue severo (DHF) que se agruparon constituyendo así un pool DF y un pool DHF. Los criterios de selección eran una homogeneidad en edad (11 años +/- 1 año) y fecha de extracción después de la aparición de los síntomas (4 días +/- 1 día). En efecto, un marcador pronóstico de las formas severas debe ser detectable después de la aparición de los síntomas de la infección por el virus del dengue (aparición de fiebre) pero antes de la defervescencia, que corresponde al paso hacia las formas severas. La proporción hombre/mujer era idéntica (relación=3/2). En los dos pool, los pacientes padecían una infección secundaria por un virus de serotipo 2 (DV2). El porcentaje de inmunoglobulina M específicas era débil o indetectable. La carga viral era detectable en todos los casos. Para cada pool, se han mezclado 40 µl de cada una de las 5 muestras, lo que constituye 2 grupos de muestras DF y DHF de un volumen total de 200 µl.

Con el fin de excluir las proteínas más representadas (albumina, inmunoglobulina, transferina, fibrinógeno, alfa-2 microglobulina, haptoglobulina, etc.) cuya presencia puede ocultar las proteínas débilmente representadas y por lo tanto inducir un sesgo a nivel de la elección de las proteínas de interés, una depleción se ha realizado gracias al kit Proteo-prep20™ comercializado por Sigma-Aldrich (USA). Este kit permite una depleción de las 20 proteínas plasmáticas más abundantes. El protocolo utilizado fue aquel preconizado por el proveedor. Al final de esta inmunodepleción, 2 grupos de muestras estaban disponibles: un pool DF depletado y un pool DHF depletado. Los pool se controlaron sobre gel de poliacrilamida 4-12% Bis-tris (InVitrogen™, UK) a fin de validar la etapa de depleción.

Ejemplo 2: Identificación de las proteínas específicas de cada pool

Después de la reducción y la alquilación de los residuos de cisteínas, cada pool se analizó de manera diferencial mediante la técnica de ICPL (*Isotope Coded Labelled Protein*), desarrollado por la compañía Brucker™.

Esta técnica permite los estudios diferenciales por marcado de las muestras a comparar [4]. Las proteínas son marcadas sobre sus lisinas de manera específica con un reactivo que contiene <sup>12</sup>C: isotopo ligero para el pool DF y con un reactivo que contiene <sup>13</sup>C: isotopo pesado para el pool DHF. Resulta una diferencia de masa, aportada por los dos isotopos. Después de la mezcla de las dos muestras marcadas de manera diferente, las proteínas son fraccionadas por electroforesis sobre gel de poliacrilamida en 1 dimensión. El gel está entonces fraccionado en 20 bandas. Estas bandas son hidrolizadas por tripsina. Las proteínas de cada hidrolizado son separadas por cromatografía líquida NANOLC, ionizadas por ionización por electrospray e identificadas por espectrometría de masa con trampilla iónica (2 depósitos por banda). El programa WARPLC permite una selección automática de los picos diferenciales a identificar por MS/MS. La tabla siguiente alista las proteínas candidatas identificada al final de este estudio. Se detalla el diferencial proteico identificado por ICPL sobre los pool DF y DHF. La tabla indica la naturaleza de la proteína y la relación de señal isotopo pesado/isotopo ligero (Avg.). Para ciertas proteínas, la relación pesado/ligero está a favor de una fuerte proporción de señal "ligera" (Avg. < 0,5), por lo tanto cada proteína es potencialmente un marcador específico de los dengues clásicos, no severos (DF). Para otras proteínas, la relación pesada/ligero está a favor de una fuerte proporción de señal "pasada" (Avg. > 1,6) y cada proteína es potencialmente un marcador específico de los dengues severos. Los inventores han seleccionado unas proteínas como candidatos marcadores potenciales de DF o DHF. Se trata de:

- la peroxirredoxina-2 (peroxirredoxina-2),
- la proteína de unión de la vitamina D (vitamin D-binding protein),
- la afamina (Afamin),
- la afla-2 glicoproteína rica en leucina (Leucin rich alpha-2 glycoprotein),
- la proteína de unión de la galectina-3 (Galectin-3 binding protein),
- la proteína C-reactiva (C-reactiv protein),
- la cadena ligera de la ferritina (Ferritin light chain)

Se ha excluido la haptoglobina ya que pertenece a proteínas mayoritarias del plasma y debería ser normalmente eliminada por la columna Proteoprep20. La proteína del complemento C7 no se ha conservado tampoco debido a su carácter ubiquitario.

Tabla 1: proteínas identificadas por ICPL sobre los pools de plasmas de Tahití

Proteína	Aceso	H/L	Avg	Max. Avg	Max.cv
Peroxirredoxina 2	P322119	9	0,33	0,08	41,55
Haptoglobina	P00738	13	0,43	0,150	45,03
complemento C7	P10643	8	0,48	0,030	12,026
Apolipoproteína A	P06727	3	0,68	0,310	48,72
Fibrinógeno cadena Alfa	P02671	4	0,79	0,030	5,16
Apolipoproteína E	P02649	6	0,8	0,0140	26,45
Proteína A amiloide	P02735	7	0,92	0,070	16,59
Fibrinógeno cadena beta	P002675	9	0,93	0,050	10,68
Inter alfa-tripsina inhibidor H1	P19827	7	0,94	0,230	37,76
Complemento factor H proteína 1	Q03591	14	0,95	0,140	21,99
Inter alfa-tripsina inhibidor H2	P19823	15	0,98	0,27	39,51
Fibrinógeno cadena gama	P02679	3	0,99	0,01	1,87
Vitronectina	P04004	2	1	0,1	14,28
Complemento factor B	P00751	8	1,06	0,1	17,54
Complemento C4	POCOL4	3	1,06	0,304	9,24
Albumina	P02768	27	1,09	0,18	25,57
alfa-2 antiplasmina	P08697	5	1,18	0,203	4,13
Antitrombina III	P01008	16	1,23	0,13	24,64
Apolipoproteína A1	P02647	74	1,24	0,21	69,85
Proteína de unión al Retinol	P02753	5	1,24	0,13	13,3
Protrombina	P00734	4	1,26	0,15	14,18
Complemento factor 1	P05156	3	1,27	0,02	2,96
Beta-microglobulina	P61769	3	1,27	0,05	4,94
Ig alfa-1 cadena C	P01876	2	1,27	0,042	0,18
Hemopexina	P02790	28	1,27	0,14	37,26
Alfa 1B glicoproteína	P04217	4	1,28	0,08	9,49
Proteína Amiloide A4	P35542	6	1,29	0,14	16,83
Cinínógeno 1	P01042	3	1,3	0,346	11,97
IgMu cadena C	P01871	2	1,3	0,057	0,32
Cisteína rica en proteína 2	P16562	2	1,3	0,212	4,5
Zinc alfa-2glicoproteína	P25311	7	1,3	0,12	19,75
Proteína de la Matriz extracelular	Q16610	2	1,32	0,057	0,32
factor epitelial pigmentario	P36955	3	1,35	0,1	15,72
Complemento C3	P01024	7	1,37	0,19	25,84
Atractina	O75882	4	1,38	0,2	22,01
Complemento-factor H proteína 2	P36980	2	1,41	1,443	208,08
Apolipoproteína B-100	P04114	6	1,43	0,26	32,29
Complemento factor H	P08603	24	1,46	0,41	29,06
Antiquimotripsina Alfa-1	P01011	6	1,48	0,2	21,84
Angiotensinógeno	P01019	4	1,54	0,25	22,71
Histidina-rica en glicoproteína	P04196	2	1,54	1,259	158,42
Inter-alfa inhibidor de tripsina de cadena H4	Q14624	5	1,54	0,09	7,18
Componente suero-amiloide P	P02743	15	1,56	0,23	29,2
Clusterina	P10909	7	1,57	0,25	29,73
Proteína de unión a Vitamina D	P02774	13	1,63	0,75	64,18
Afamina	P43652	6	1,85	0,34	29,98
Fibronectina	P02751	9	1,99	0,28	27,97
Leucina-rica en alfa-2 glicoproteína	P02750	2	2,26	0,884	78,12
Proteína de unión a Galectina-3	Q08380	5	2,66	0,26	10,97
Proteína C-reactiva	P02741	3	3,87	0,365	13,29
Ferritina de cadena ligera	P02792	5	5,75	1,7	39,29

## 5 Ejemplo 3: ELISA de confirmación

## Material y métodos:

- 10 A fin de confirmar y validar los resultados de ICPL, cada marcador-candidato se ha ensayado en ELISA cuantitativa sobre unas muestras individuales. Estas muestras eran unas muestras de pacientes que han desarrollado o bien un dengue "clásico" o bien un dengue severo y extraídos durante la fase aguda de la enfermedad (fase vírémica).

Todos los pacientes tenían un dengue secundario. Sólo los serotipos 1, 2 y 3 estaban representados (ningún serotipo 4). Estas extracciones eran originarias de la *Univesidad Industrial de Santander* (Bucaramanga, Colombia). Estas últimas eran parte de un estudio retrospectivo llevado a cabo en acuerdo con el comité ético local.

5 Las ELISA cuantitativas se efectuaron gracias a la utilización de kits comerciales, siguiendo las instrucciones proporcionadas por los fabricantes. Todas las muestras se ensayaron dos veces y en duplicado. La lista de los kit comerciales utilizados es la siguiente:

- 10 Para la proteína de unión a Vitamina D: el kit Human DBP™, USCN Life (Wuhan, China),  
 para la afamina: el kit AFM™, USCN life (Wuhan, China),  
 para la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína: el kit Human-LRG™, IBL International (Hamburg, Alemania),  
 15 para la Proteína de unión a Galectina-3: el kit Mac-2 BP™, IBL International (Hamburg, Alemania),  
 para la proteína C-reactiva: el kit high-sensitive CRP ELISA™, IBL International (Hamburg, Alemania)  
 para la cadena ligera de la ferritina: el kit Ferritine™, IBL International (Hamburg, Alemania).

20 Para la peroxirredoxina-2, la ausencia de ensayos comerciales ha necesitado el desarrollo de un ELISA. Para ello, se han utilizado unos anticuerpos policlonales anti-peroxirredoxina-2 obtenidos o bien en el conejo (SAB2101878, Sigma-Aldrich USA) o bien en la cabra (SAB2500777, Sigma-Aldrich). Estos anticuerpos son diluidos al 2 µg/ml en un tampón Tris-maleato, pH 6,2 y utilizados en fondo de placa. Después del lavado, las placas sensibilizadas por  
 25 estos anticuerpos son saturadas durante 1h a 37°C con un tampón PBS-0,5% gelatina. La muestra a ensayar se añade entonces a diferentes diluciones en PBS-0,05% Tween 20-0,1% gelatina e incubado durante 1h a 37°C. Después de tres lavados con PBS-0,5% Tween 20, se añade un anticuerpo monoclonal de ratón anti-peroxirredoxina-2 (WHO007001M1, Sigma-Aldrich; dilution:1µg/ml) y se incuba durante 1h a 37°C. La revelación se efectúa con la ayuda del kit One-Step NBT-BCIP™ (Thermo Scientific, USA) en presencia de un conjugado anti-especie marcado con fosfatasa alcalina diluido al 0,1 g/ml (Jackson, USA).

30 Resultados:

35 Los resultados son detallados en las figuras 1 a 10 y en la tabla 2 siguiente:

Tabla 2 : valores de p para los diferentes marcadores candidatos ensayados en muestras de tahitianos y/o de colombianos.

Marcadores	Valor de p		
	Colombia (suero)	Tahití (plasma)	mezcla
Vitamina D BP	0,01	0,008	0,0017
LRG	0,1	0,015	0,072
Ferritina	0,07	0,005	0,0018
CRP	0,1	0,4	NT
Afamina	NT	0,7	NT
Peroxirredoxina 2	NT	0,4	0,38
G3BP	NT	0,6	NT

40 Las diferencias obtenidas entre las dos poblaciones (DF/DHF) se validaron por un ensayo estadístico (*Unpaired t-test*, software Prism V4.03 Graphpad). El límite de significatividad  $p < 0,05$  se ha retenido, que corresponde a un intervalo de confianza del 95%. Los resultados muestran una cantidad significativamente superior en las muestras DHF para las proeínas siguientes: Proteína de unión a Vitamina D (Vitamina D BP), leucina-rica en glicoproteína (LRG) y ferritina, lo que hace de ellos unos marcadores muy interesantes, tomados individualmente o en asociación,  
 45 para el pronóstico del dengue severo sobre muestras sanguíneas a partir de la aparición de los primeros síntomas del dengue.

Referencias bibliográficas

- 50 1. SB Halstead. The lancet 2007; 370: 1644-52  
 2. AS Leong *et al.* Semin. Diagn. Pathol. 2007; 24(4):227-236  
 3. K. Clyde *et al.* J. Virol. 2006; 23: 11418-11431  
 55 4. Lottspeich F, Kellermann J. ICPL labeling strategies for proteome research. Methods Mol Biol. 2011;753:55-64

5. Pawitan Jeanne A. *Acta Medica Indonesiana*. 2011; 43(2):129-135
6. Srikiatkachorn A *et al.*, 2010. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2010; vol.338: 67-82
- 5 7. Lidiane M Albuquerque *et al.* *Journal of Proteome Research*. American Chemical Society, Washington, DC, US. 2009; 8(12):5431-5439
- 10 8. Chaiyaratana Wathanee *et al.* *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, Project Od Seameo, Bangkok*. 2008; 39(5):832-836
9. Weivoda S *et al.* *Journal of Immunological Methods*. 2008; 336(1): 22-29

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para pronosticar, *in vitro*, en una muestra sanguínea, la probabilidad para un paciente de evolucionar hacia un dengue severo, en el que:
- 5 a) se determina la cantidad de al menos un marcador que es la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína en dicha muestra sanguínea,
- 10 b) se compra la cantidad de la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia de dicho marcador obtenido a partir de un grupo de individuos que se diagnosticaron como padeciendo un dengue no severo,
- 15 en el que si la cantidad de leucina-rica en alfa-2 glicoproteína determinada en la etapa a) es superior a la cantidad de referencia establecida en la etapa b), se pronostica que el paciente evolucionará hacia un dengue severo.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa a) se determina además la cantidad de al menos otro marcador seleccionado entre la proteína de unión a vitamina D y la ferritina en la muestra sanguínea y en la etapa b) se compara la cantidad de dicho otro marcador de la etapa a) con una cantidad de referencia de dicho otro marcador obtenida a partir de un grupo de individuos que han sido diagnosticados como padeciendo un dengue no severo y si la cantidad de dicho al menos otro marcador determinada en la etapa a) es superior a la cantidad de referencia establecida en la etapa b), se pronostica que el paciente evolucionará hacia un dengue severo.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa a) se determina además la cantidad de al menos otros dos marcadores seleccionados entre la proteína de unión a vitamina D y la ferritina en la muestra sanguínea y en la etapa b) se compara la cantidad de cada uno de los otros dos marcadores de la etapa a) con una cantidad de referencia para cada uno de dichos otros marcadores obtenidos a partir de un grupo de individuos que han sido diagnosticados como padeciendo un dengue no severo y si la cantidad de cada uno de los otros marcadores determinada en la etapa a) es superior a la cantidad de referencia de cada uno de los marcadores establecida en la etapa b), se pronostica que el paciente evolucionará hacia un dengue severo.
- 30 4. Utilización de la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína como marcador para el pronóstico *in vitro* de un dengue severo en un paciente.
- 35 5. Utilización según la reivindicación 4, de la proteína de unión a vitamina D o de la ferritina como marcador suplementario para el pronóstico *in vitro* de un dengue severo en un paciente.
- 40 6. Utilización según la reivindicación 4 de la proteína de unión a vitamina D y de la ferritina como marcadores suplementarios para el pronóstico *in vitro* de un dengue severo en un paciente.
- 45 7. Kit para el pronóstico *in vitro* de un dengue severo que comprende una pareja de unión de la leucina-rica en alfa-2 glicoproteína, una pareja de unión de la proteína de unión a vitamina D y una pareja de unión de la ferritina.
8. Kit según la reivindicación 7, que comprende además al menos una pareja de unión de una proteína del virus del dengue seleccionada de entre la proteína NS1, la proteína de cubierta y la proteína prM.

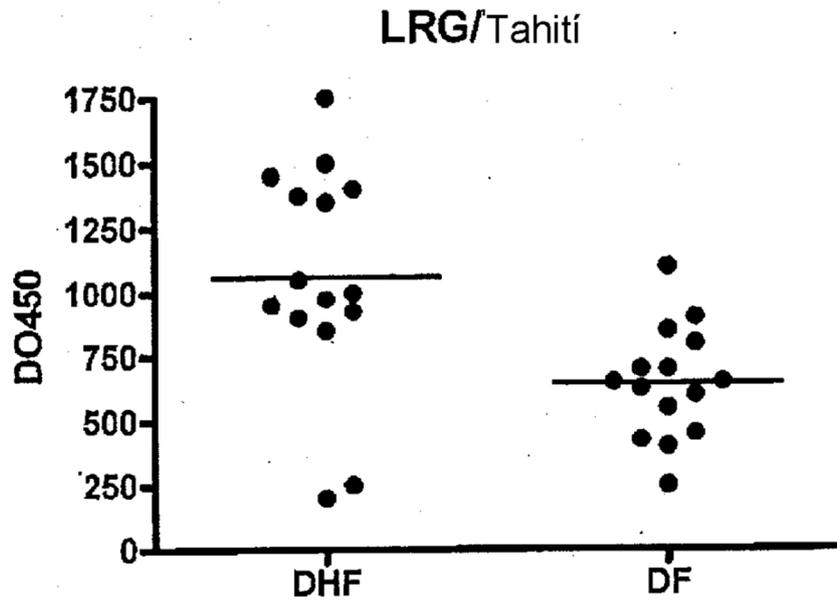


Figura 1

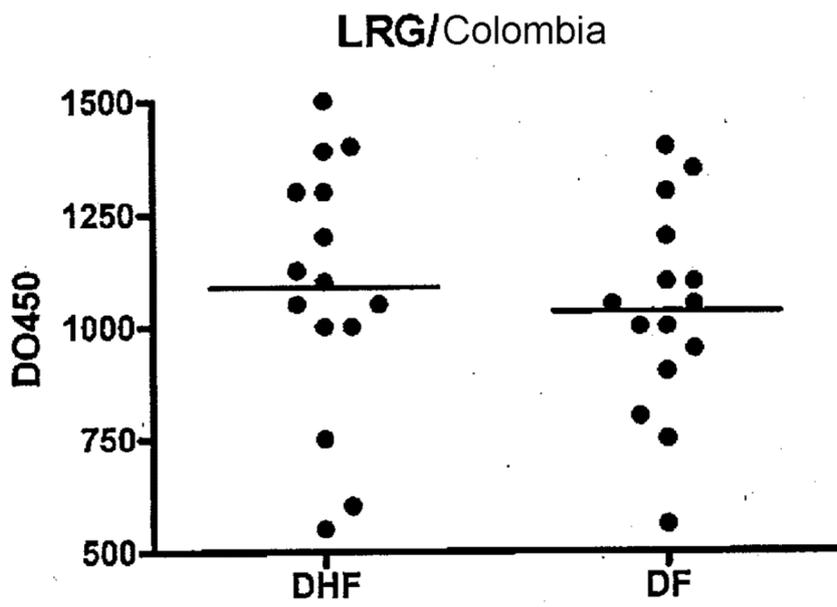


Figura 2

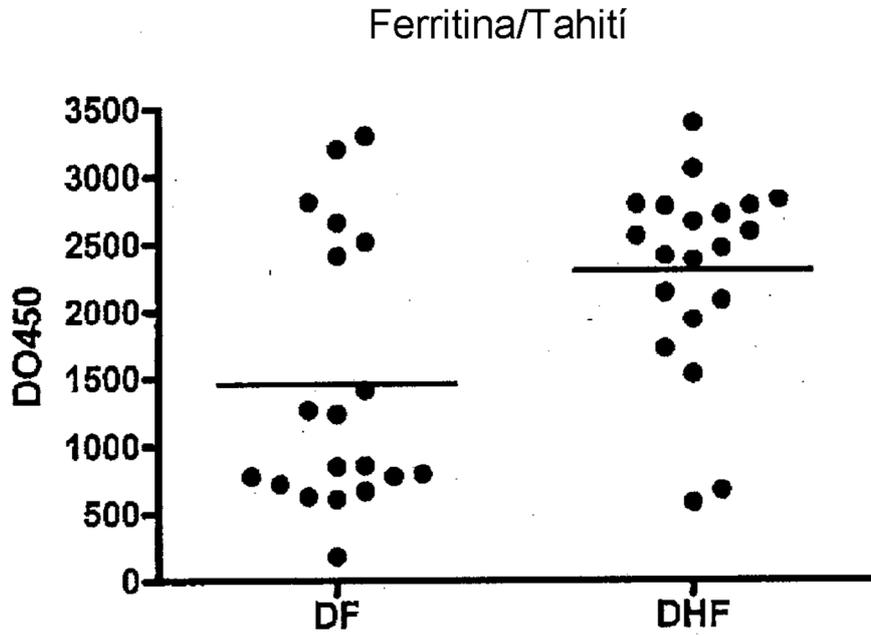


Figura 3

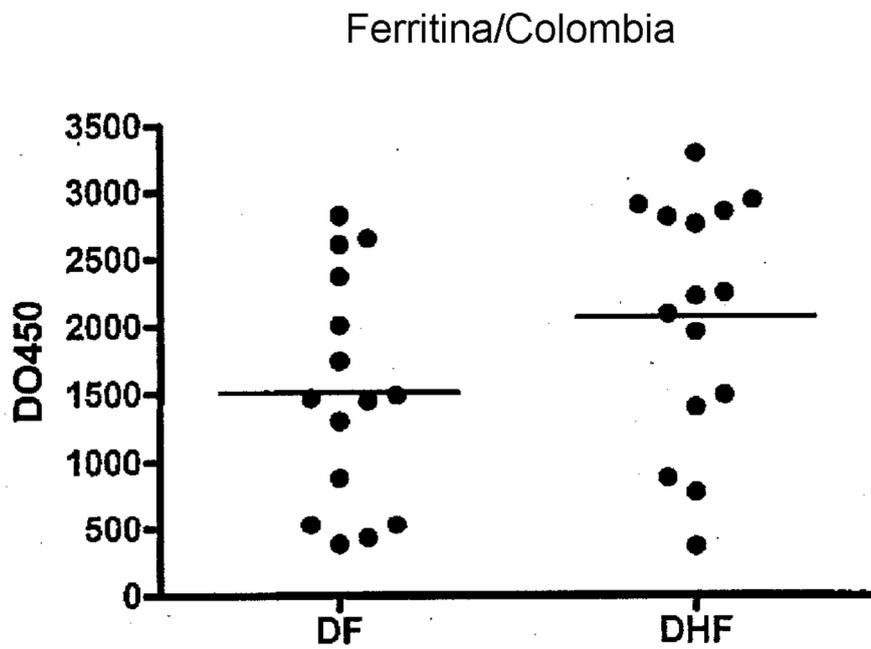


Figura 4

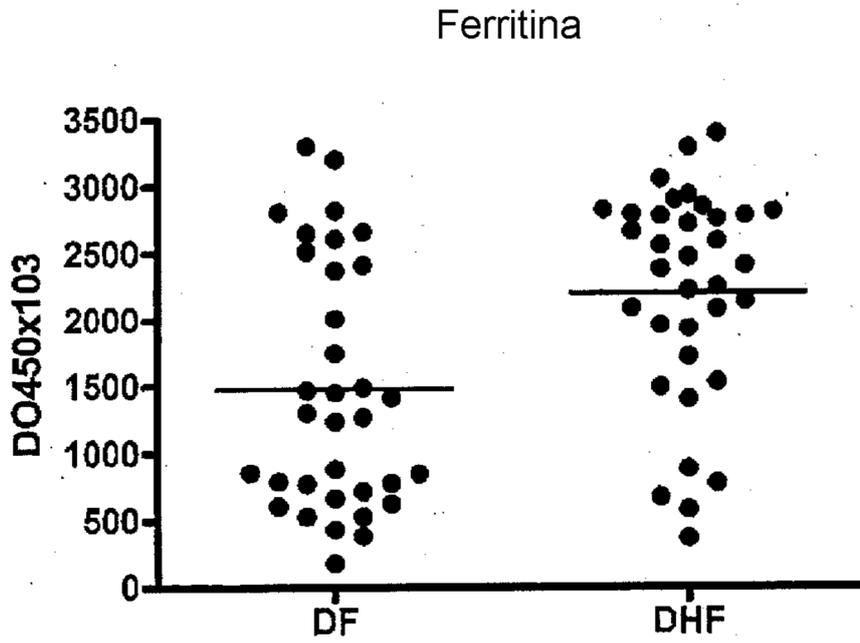


Figura 5

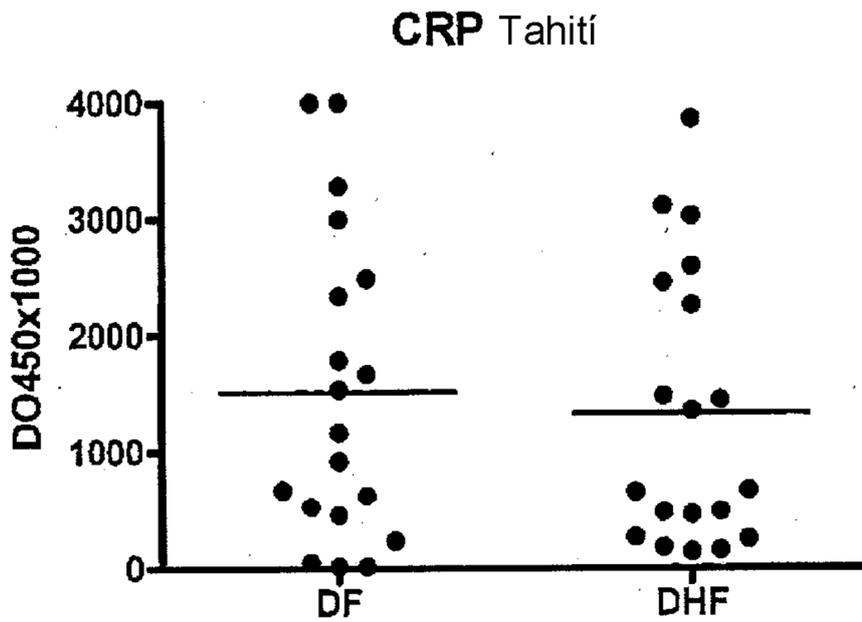


Figura 6

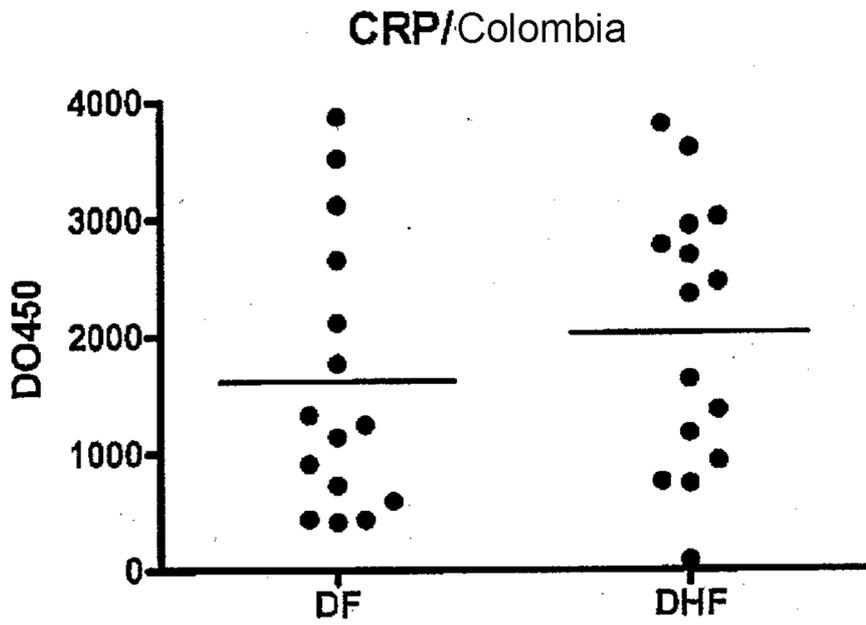


Figura 7

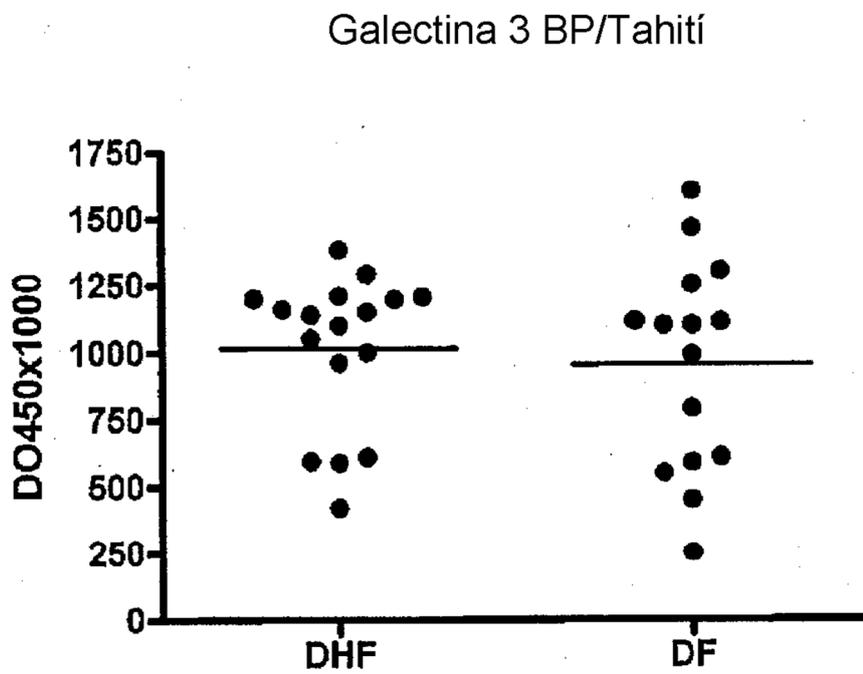


Figura 8

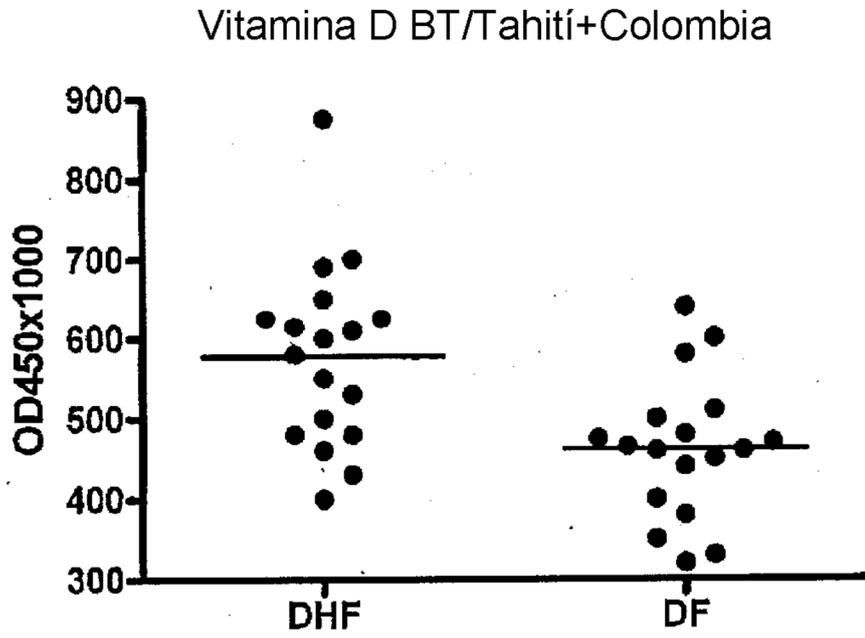


Figura 9

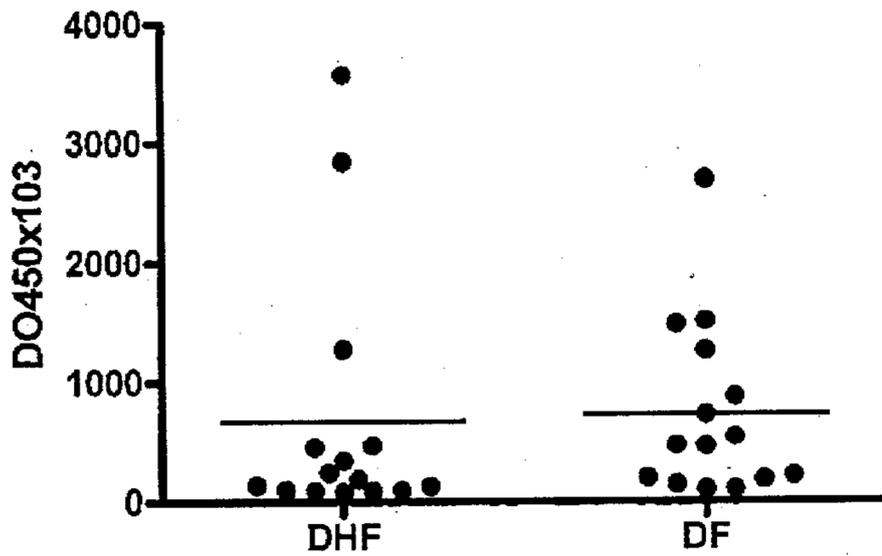


Figura 10